



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

KAREN BRAJÃO DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO RECEPTOR
DE QUIMIOCINA CCR5 EM PACIENTES COM
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA DA REGIÃO
NORTE DO PARANÁ**

Londrina
2006

KAREN BRAJÃO DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO RECEPTOR
DE QUIMIOCINA CCR5 EM PACIENTES COM
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA DA REGIÃO
NORTE DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof^a Dr^a Maria Angelica Ehara Watanabe

Londrina
2006

KAREN BRAJÃO DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO RECEPTOR
DE QUIMIOCINA CCR5 EM PACIENTES COM
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA DA REGIÃO
NORTE DO PARANÁ**

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Maria Angelica Ehara Watanabe
Universidade Estadual de Londrina

Prof^ª. Dr^ª. Sueli Donizete Borelli
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Dirceu Estevão
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 12 de fevereiro de 2006.

*Dedico esta à minha mãe... que tanto se orgulhou
Quando entrei na Universidade... e sonhava
com o dia de minha formatura... muitas saudades...*

*E ao meu pai, que com muito amor sempre fez
de tudo por mim! Meu porto seguro...
Exemplo de vida, dignidade, responsabilidade,
garra, dedicação e amor!*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr.^a Maria Angelica Ehara Watanabe, que me acolheu em seu laboratório com muito carinho e amizade. Obrigada por todas as oportunidades, pela confiança e motivação, pela orientação segura, profissionalismo e disciplina com que conduziu este trabalho e principalmente por acreditar em minha capacidade, o que sem dúvida contribuiu muito para meu crescimento pessoal e profissional. Pela sua postura humana, espírito de desafio científico, por estar sempre presente e pela paciência; minha profunda e eterna admiração, respeito, carinho e gratidão.

Ao Programa de Mestrado em Patologia Experimental pelo incentivo à pesquisa e apoio institucional.

Aos Professores Dr. Mário Augusto Ono e Dr. Dirceu Estevão que aceitaram o convite de fazer parte de minha banca de qualificação.

Aos Professores Dra. Sueli Donizete Borelli e Dr. Dirceu Estevão por aceitarem o convite de fazer parte de minha banca de defesa.

As Prof^{as}. Edna Maria Vissoci Reiche e Helena Kaminami Morimoto, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, CCS - UEL, pela coloraboração, e auxílio na seleção das amostras, meu muito obrigada.

Ao Dr. Rubens Pontello, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, CCS - UEL, pela orientação dos dados clínicos.

A Prof. Dra. Maria Helena Peregrinelli Fungaro, Departamento de Biologia Geral - Genética, pela orientação com a análise estatística.

As Professoras Dra. Márcia Cristina Furlaneto e Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro pelos sábios conselhos e agradável convívio, e por servirem de exemplo de competência, seriedade e dedicação.

Ao meu pai Gilberto Celestino de Oliveira, responsável pela pessoa que sou hoje, pela formação de meu caráter. Meu porto seguro. Obrigada por todo amor, carinho, incentivo, suporte e por estar sempre ao meu lado me apoiando, confortando, aconselhando e motivando. Meu eterno amor, carinho, respeito e admiração.

A minha irmã Gisely Brajão de Oliveira pela sua companhia constante, por seus conselhos valiosos, seu carinho, sua amizade, paciência e seu amor. Meu eterno amor, carinho, respeito e admiração.

Aos amigos do Laboratório, Carlos Eduardo Coral de Oliveira, Helen Cristina Miranda, Jaqueline Carvalho de Oliveira, Juliana Laino do Val Carneiro, Marla Karine Amarante, Mateus Nóbrega Aoki, Thiago Franco Nasser, por todas as horas que passamos juntos, pela amizade e por todo apoio durante o desenvolvimento de minha pesquisa.

Aos amigos dos laboratórios vizinhos, Claudia A. de Paula, Ivan G. P. Lima, Rubens T. D. Duarte, Bruno A. Dias, Daniele Sartori, Lara M. Ferracin, Maria Elena Schapovaloff, Ligia U. Lunardi, André Luiz M. de Oliveira, Márcia M. Mata, Luis Gustavo Morello, Daniel, Ariane Gaspar, Ariane, Daniel Favero, Marcelo Tempesta, Carla B. Fier, Renan A. Ribeiro, Maria Rosana de Paula pelo tempo que passamos juntos, pelas discussões, pelo apoio e amizade.

Aos amigos de infância por estarem sempre presentes em minha vida, tornando esta caminhada mais alegre. Em especial à Camila Letícia Brustoloni, que esteve sempre presente. Meu eterno amor.

Aos amigos da Terceira Turma de Mestrado em Patologia Experimental, pelo convívio e aprendizado. Meu muito obrigada e meus votos de sucesso a todos.

Aos professores do Programa de Mestrado em Patologia Experimental por tudo que me ensinaram.

Aos funcionários do Setor de Arquivo do Ambulatório do Hospital de clínicas e do Hospital Universitário pelo auxílio prestado durante a consulta dos prontuários dos pacientes inseridos no estudo.

A todos os pacientes e doadores inseridos no estudo pois sem eles não seria possível a realização deste.

A todas as pessoas, que provavelmente por um momento de descuido, acabei por não mencionar os nomes, mas que contribuíram direta ou indiretamente, mas de não de maneira menos importante para a realização deste trabalho, deixo o meu muito obrigada.

OLIVEIRA, Karen Brajão de. **Análise do polimorfismo genético do receptor de quimiocina CCR5 em pacientes com leishmaniose tegumentar americana da região Norte do Paraná.** 2006. 114f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental), – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

RESUMO

As quimiocinas são importantes determinantes da resposta inflamatória. A variante $\Delta 32$ do receptor de quimiocina 5 (CCR5) resulta na forma não funcional desse receptor, e tem sido relacionada com diversas doenças. No presente trabalho, reação em cadeia da polimerase, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para o CCR5, abrangendo a região da deleção, detectou um produto de 225 pb para o alelo selvagem (CCR5) e um produto de 193pb para o alelo $\Delta 32$. O objetivo deste estudo foi investigar a variante $\Delta 32$ do gene do CCR5 na população brasileira com leishmaniose e comparar com indivíduos saudáveis e também verificar a progressão da forma cutânea para a mucocutânea da leishmaniose nos portadores do alelo $\Delta 32$. Dentre 100 pacientes com valores para teste de Montenegro e imunofluorescência indireta positivos para leishmaniose, 32% eram mulheres e 68% homens, com uma prevalência significativa de homens com idade entre 21 a 60 anos. Encontramos uma frequência de 0,06 para o alelo $\Delta 32$. Os pacientes com leishmaniose apresentaram 89% (89/100) de CCR5/CCR5, 10% (10/100) CCR5/ $\Delta 32$ e 1% $\Delta 32/\Delta 32$ enquanto que os indivíduos saudáveis apresentaram 91% (91/100) de CCR5/CCR5, 8% (08/100) CCR5/ $\Delta 32$ e 1% (01/100) $\Delta 32/\Delta 32$, portanto não houve diferença significativa entre os grupos analisados. Os pacientes selvagens (89% - 89/100) apresentaram um largo espectro de manifestações clínicas. Entre eles verificou-se 22,47% (20/89) de lesões mucosas com perfuração do septo nasal cartilaginoso e 77,53% (69/89) de lesões cutâneas. Destes pacientes com septo nasal perfurado, 55% (11/20) apresentaram as lesões mucosas após $2,85 \pm 0,5$ anos do diagnóstico inicial e valor médio para o teste de Montenegro de $11,87 (\pm 2,45)$ mm. Já 45% (09/20) dos pacientes desenvolveram estas lesões após $16,25 (\pm 4,06)$ anos e apresentaram valores médios para o teste de Montenegro de $25 (\pm 2,74)$ mm. Neste trabalho os portadores do alelo $\Delta 32$ (10% - 10/100) apresentaram apenas lesões cutâneas. Finalmente em relação aos portadores $\Delta 32$, observou-se um espectro de manifestações clínicas menos severo, em comparação com indivíduos selvagens. Apesar dos portadores do alelo $\Delta 32$ terem demonstrado ausência de lesões mucocutâneas, mais estudos são necessários para esclarecer o papel do CCR5 nos aspectos clínicos da leishmaniose devido ao baixo número de portadores do alelo $\Delta 32$.

Palavras-chave: Leishmaniose. CCR5. Teste de Montenegro.

OLIVEIRA, Karen Brajão de. **Analysis of the CC chemokine receptor 5 (CCR5) delta32 polymorphism in a Brazilian population with cutaneous leishmaniasis.** 2006. 114f. Dissertation (Master in Experimental Pathology), – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

ABSTRACT

Chemokines are important determinants of the inflammatory response. The CC chemokine receptor 5 (CCR5) Δ 32 variant results in a non-functional form of the chemokine receptor, and has been implicated in a variety of immune-mediated diseases. In the present study, polymerase chain reaction (PCR) of genomic DNA samples, using specific CCR5 oligonucleotide primers surrounding the breakpoint deletion, detected a 225bp product from the normal CCR5 allele and a 193bp product from the 32bp deletion allele. The aim of this study was to investigate the CCR5 gene truncated allele in a Brazilian population with leishmaniasis compared with healthy control subjects and to determine the progression from cutaneous to mucocutaneous leishmaniasis in the delta32 allele carriers. Among 100 patients with Montenegro skin test and indirect immunofluorescence assay values positive for leishmaniasis, there were 32% women and 68% men, with a significant prevalence of men aged 21 to 60 years old. We found a Δ 32 allele frequency of 0.06. The leishmaniasis patients were 89% (89/100) CCR5/CCR5, 10% (10/100) CCR5/ Δ 32 and 1% (1/100) Δ 32/ Δ 32, while healthy subjects showed a 91% (91/100) incidence of CCR5/CCR5, 8% (8/100) of CCR5/ Δ 32 and 1% of Δ 32/ Δ 32. Therefore, there was no significant difference between the two groups examined. The wild-type (CCR5/CCR5) patients (89% - 89/100) showed a large spectrum of clinical manifestations, where 22,47% (20/89) had active mucous lesions with perforation of the nasal cartilaginous septum and 77,53% (69/89) had cutaneous lesions. Of those patients with a perforated nasal septum, 55% (11/20) had mucous lesions 2,85 \pm 0,5 years after initial diagnosis, and the mean value for the Montenegro skin test was 11,87 mm (\pm 2,45). However, 45% (9/20) of the patients developed these lesions after 16,25 years (\pm 4.06) and displayed a Montenegro skin test with a mean value of 25 mm (\pm 2,74). In this work, the Δ 32 allele carriers, 10% (10/100) showed only cutaneous manifestations when compared to wild-type individuals. Finally, with regard to the Δ 32 allele carriers, a less severe spectrum of clinical manifestations was observed, in comparison to CCR5 wild-type individuals. Although a lack of mucocutaneous lesions was evident among Δ 32 allele carriers, the number of individuals studied was small. Therefore, further investigations are needed to elucidate the role of CCR5 in the clinical aspects of leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis. CCR5. Montenegro skin Test.

ÍNDICE DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 – MOSQUITO VETOR DA FAMÍLIA <i>PHLEBOTOMINAE</i>	15
FIGURA 2 – PAÍSES ALTAMENTE ENDÊMICOS (90% DE CASOS) PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.	16
FIGURA 3 – CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR - BRASIL 1970 - 2001.....	17
FIGURA 4 – CICLO BIOLÓGICO DA <i>LEISHMANIA SP.</i>	18
FIGURA 5 – FORMA PROMASTIGOTA DE <i>LEISHMANIA SP.</i>	19
FIGURA 6 – FORMA AMASTIGOTA DE <i>LEISHMANIA SP.</i> NO INTERIOR DE MACRÓFAGO.....	20
FIGURA 7 – RECEPTOR DE QUIMIOCINA 5 (CCR5).	33
FIGURA 8 – REAÇÃO DE IMUNOFLOUORESCÊNCIA INDIRETA.	38
FIGURA 9 – TESTE DE INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO.....	39

RESULTADOS

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO A DATA DO DIAGNÓSTICO.....	42
FIGURA 2 – DIFERENTES GENÓTIPOS DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA 5.	45
FIGURA 3 – TÍTULO DE ANTICORPOS PARA <i>LEISHMANIA SP.</i> EM RELAÇÃO AO GENÓTIPO DO CCR5.	47
FIGURA 4 – INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO EM RELAÇÃO AO GENÓTIPO.	48
FIGURA 5 – INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO EM RELAÇÃO AO TEMPO DE DESENVOLVIMENTO DE LESÕES MUCOCUTÂNEAS.	50

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM LEISHMANIOSE	43
TABELA 2 – FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DOS ALELOS CCR5 E Δ 32 DO GENE CCR5 EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE.....	46
TABELA 3 – ASPECTOS CLÍNICOS EM RELAÇÃO AO GENÓTIPO.	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- CCR5** – Receptor de Quimiocina 5
- Célula NK** – Célula Natural Killer
- DAG** – Diacilglicerol
- DARC** – Receptor de Quimiocina Antígeno Duffy
- DNA** – Ácido Desoxirribonucléico
- EDTA** – Ácido Dietilenoaminotetraacetato Dissódico
- EHW** – Equilíbrio de Hardy Weinberg
- ELISA** – Ensaio Imunoenzimático
- GDP** – Difosfato de guanosina
- GM – CSF** – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos - Macrófagos
- Gp** – Glicoproteína
- GRO** – Oncogene alfa relacionado com o crescimento
- GTP** – Trifosfato de Guanosina
- HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana
- HU** – Hospital Universitário
- IDRM** – Intradermorreação de Montenegro
- IFN** – Interferon gama
- Ig** – Imunoglobulina
- IL** – Interleucina
- IP-10** – Proteína 10 Indutível pelo Interferon
- IP3** – Trifosfato inositol
- LPS** – Lipopolissacarídeo
- LTA** – Leishmaniose Tegumentar Americana
- MCP-I** – Proteína I Quimioatraente para Monócitos
- MHC** – Complexo de Histocompatibilidade Principal
- MIP – α e β** – Proteína Inflamatória de Macrófago alfa e beta
- OMS** – Organização Mundial da Saúde
- Pb** – Pares de bases
- PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase
- PI3K** – Fosfstidilinositol-3-OH-quinase
- PKC** – Proteína quinase C
- PLC** – Fosfolipase C

RIFI ou IFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

RNAm – Ácido Ribonucléico mensageiro

SDF – Fator Derivado do Estroma da Medula Óssea 1

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

TGF- β – Fator beta de Transformação e Crescimento

Th1 – Linfócito T auxiliar CD4⁺ 1

Th2 – Linfócito T auxiliar CD4⁺ 2

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 LEISHMANIOSE	15
1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	21
1.2.1 Leishmaniose Visceral	21
1.2.2 Leishmaniose Cutânea	22
1.2.3 Leishmaniose Mucocutânea	22
1.2.4 Leishmaniose Cutânea Difusa	23
1.3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS	23
2 QUIMIOCINAS	25
2.1 NOMENCLATURA	26
2.2 RECEPTORES DE QUIMIOCINAS	26
2.3 SINALIZAÇÃO INTRACELULAR	28
2.4 EXPRESSÃO DAS QUIMIOCINAS EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS	29
2.5 QUIMIOCINAS EM DOENÇAS INFECCIOSAS	31
2.6 RECEPTOR DE QUIMIOCINA 5 (CCR5)	33
3 OBJETIVOS	36
3.1 GERAL	36
3.2 ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA	37
4.2 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS	37
4.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta	38
4.2.2 Intradermorreação de Montenegro	38
4.3 OBTENÇÃO DE DNA	39
4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA CCR5	39
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXOS	69
ANEXO 1	70
ANEXO 2	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma zoonose causada pelo protozoário flagelado *Leishmania sp.* e transmitida pelo mosquito vetor do gênero *Phlebotomus* (Figura 1) no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Chu *et al.*, 1983; Oliveira Neto *et al.*, 2000).



Fonte: OMS 96/40

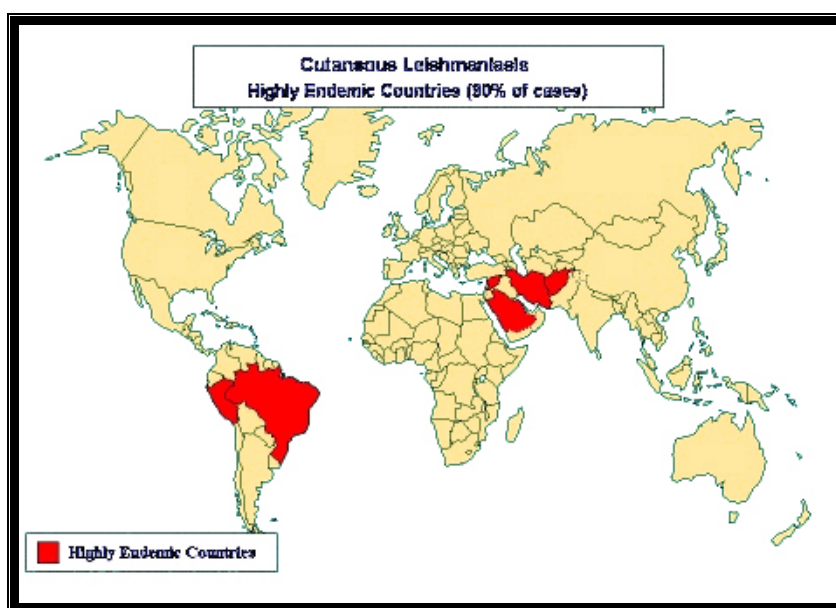
Figura 1 – Mosquito vetor da família *Phlebotominae*

A leishmaniose apresenta distribuição mundial ocorrendo principalmente em áreas tropicais e subtropicais (WHO, 2002). Estima-se que o número de pessoas infectadas no mundo seja de 15 milhões, e que surjam dois milhões de casos novos por ano e que existem 350 milhões de pessoas com risco de infecção (Desjeux, 1999).

A incidência da leishmaniose tem aumentado nos últimos anos. Este aumento é devido a variações cíclicas de causas indeterminadas. A incidência da

doença não aumentou somente nas áreas de floresta e desmatamento recente, mas também em áreas de colonização tradicional bem como em áreas urbanas do nordeste. Um fator envolvido na disseminação da doença é o crescimento urbano descontrolado devido principalmente ao êxodo rural (Momen, 1999).

Considerada uma doença endêmica em áreas tropicais ou de clima quente como na América Central, América do Sul, África, Índia e países do Mediterrâneo (O'Neill *et al.*, 1991). Atualmente as leishmanioses, prevalentes em quatro continentes, são consideradas como sendo endêmicas em 88 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento. Dos casos de leishmaniose visceral, 90% ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão, 90% da leishmaniose mucocutânea ocorre na Bolívia, Brasil e Peru, e 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (Figura 2) (WHO, 2002).

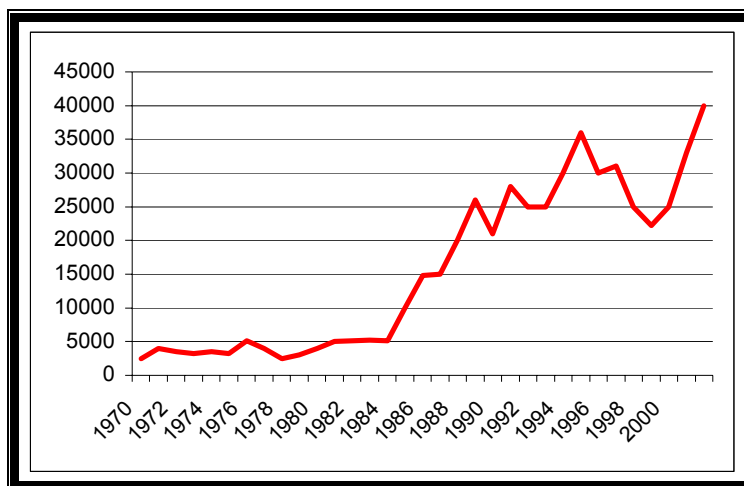


Fonte: WHO, 2002.

Figura 2 – Países altamente endêmicos (90% de casos) para Leishmaniose Cutânea.

No Brasil, os primeiros casos foram detectados por volta de 1908, durante a construção da estrada-de-ferro Noroeste do Brasil, na região de Bauru (São Paulo), ficando conhecida como úlcera de Bauru (Roizenblatt, 1979). No

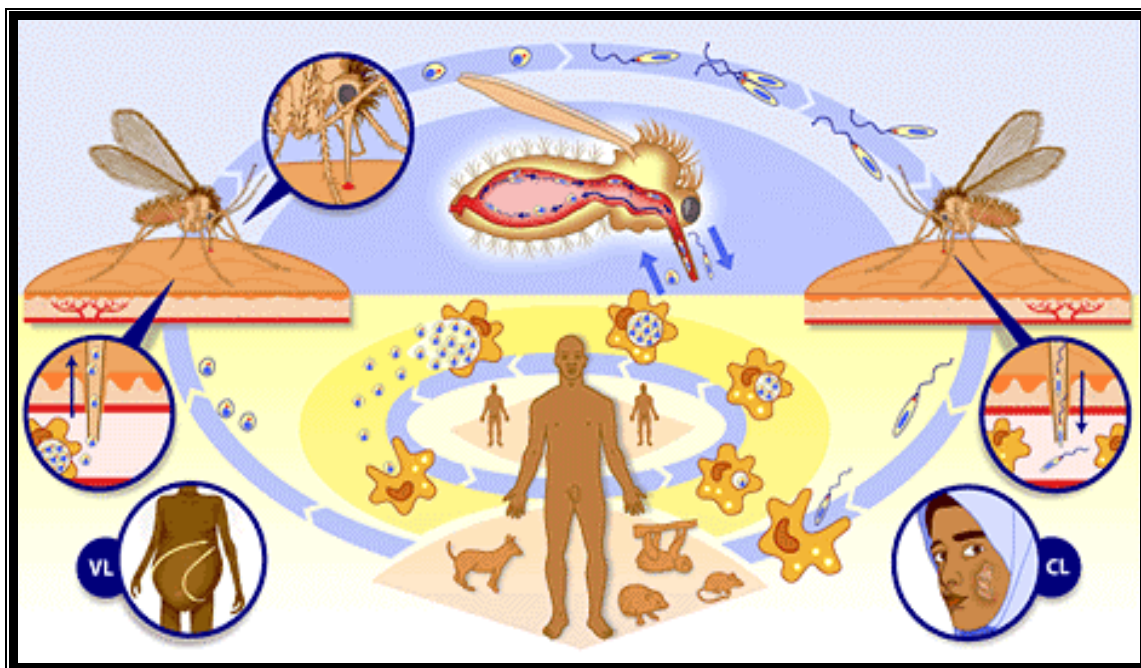
período de 1970 a 2001, o número de casos de LTA variou de 3.000 para 37.000. A partir da década de 90, os casos apresentaram pequeno aumento, com grande variação anual (Figura 3).



Fonte: Adaptado de CENEPI/ FUNASA/ MS

Figura 3 – Casos de Leishmaniose Tegumentar - Brasil 1970 - 2001.

O ciclo da *Leishmania* envolve dois estágios: o aflagelado que ocorre no homem ou em outros vertebrados e o flagelado, encontrado nos insetos vetores ou nos meios de cultura (Roizenblatt, 1979). O vetor adquire os parasitas ao ingerir o sangue de hospedeiros infectados e, através de um ciclo, perpetua a infecção pela contaminação de espécies sãs que se tornam fonte de infecção. Além do homem, outros animais como ratos, cães, raposas e gambás podem ser reservatórios (Roizenblatt, 1979) (Figura 4).



Fonte: WHO. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm>. Acesso em: 04/10/2004.

Figura 4 – Ciclo biológico da *Leishmania* sp.

O estágio infectante da *Leishmania*, forma promastigota metacíclica (Figura 5), é um parasita flagelado delgado, liberado pelo flebotomo, na derme do hospedeiro, juntamente com sua saliva, a qual potencializa a infecciosidade do parasita. O grau de disseminação dos amastigotas pelo hospedeiro é determinado pela espécie de *Leishmania* (Titus & Ribeiro, 1988).

No início da infecção, as formas promastigotas são inoculadas na derme durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo. As células destruídas pela probóscida do inseto e a saliva inoculada atraem células fagocitárias mononucleares, os macrófagos e outros leucócitos para a área infectada (Genaro, 2000).



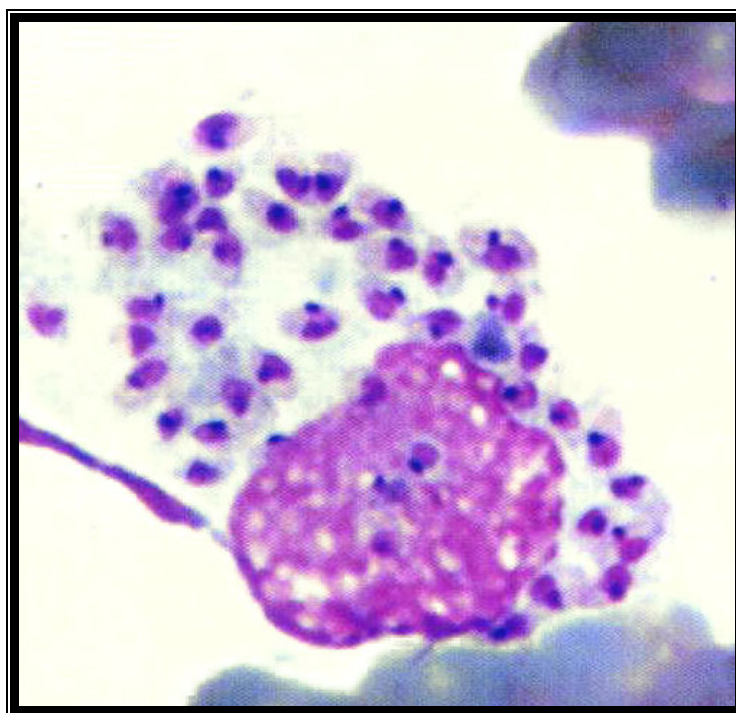
Fonte: <http://gerenciadeleishmaniose.hpg.ig.com.br/index.html>

Figura 5 – Forma promastigota de *Leishmania* sp.

As *Leishmanias* são fagocitadas por macrófagos, e a acidez do fagolisossoma induz a transformação em amastigotas redondos (Figura 6) que não possuem flagelos, mas contêm uma estrutura grande e única semelhante a uma mitocôndria chamada de cinetoplasto (Zilberstein & Shapira, 1994). Os amastigotas da *Leishmania* são os únicos parasitas protozoários que sobrevivem e se reproduzem dentro de fagolisossomas de macrófagos, os quais apresentam um pH de 4,5. Os mesmos são protegidos do ácido intravacuolar por uma ATPase transportadora de prótons, que mantém o pH do parasita intracelular em 6,5. As *Leishmanias* também possuem, na superfície dois glicoconjugados abundantes presos por âncoras de lipídios, que parecem ser importantes para sua virulência (Beverley & Turco, 1995). As *lipofosfoglicanas* são glicolipídios que formam um glicocálice denso e ligam-se a C3b e iC3b. Contudo, os microorganismos resistem à lise pelo complemento C5-C9 e são fagocitados por macrófagos através dos receptores do complemento CR1 (LFA-1) e CR3 (integrina Mac-1). As lipofosfoglicanas também podem proteger o parasita dentro dos fagolisossomas por remoção de radicais de oxigênio e inibição das enzimas lisossômicas. A *gp63*, é uma

proteínase dependente de zinco que cliva o complemento e algumas enzimas antimicrobianas lisossômicas (Samuelson, 2001).

Certos macrófagos são capazes de destruir os parasitos diretamente, enquanto outros necessitam ser estimulados. Somente os histiócitos (macrófagos fixos) não estimulados permitem o estabelecimento da infecção (Genaro, 2000).



Fonte: <http://gerenciadeleishmaniose.hpg.ig.com.br/index.html>

Figura 6 – Forma amastigota de *Leishmania sp.* no interior de macrófago.

As lesões iniciais são semelhantes, independentemente da espécie do parasita. Caracterizadas por um infiltrado inflamatório composto principalmente de linfócitos e de macrófagos na derme, estando estes últimos repletos de parasitas. Esta forma inicial pode regredir espontaneamente após um breve curso, pode permanecer estacionária ou ainda evoluir para um nódulo dérmico, o "histiocitoma", localizado sempre no sítio da picada do vetor infectado (Genaro, 2000).

Nos estágios iniciais da infecção, a lesão é caracterizada histologicamente pela hipertrofia do extrato córneo e da papila, com acúmulo de histiócitos onde o parasita se multiplica. Gradualmente forma-se um infiltrado celular circundando a lesão, resultando em uma reação inflamatória do tipo tuberculóide. Ocorre necrose com desintegração da epiderme e da membrana basal culminando

com a formação de uma lesão úlcero-crostosa. Após a perda da crosta, observa-se uma pequena úlcera com bordas ligeiramente salientes e fundo recoberto por exsudato seroso e seropurulento. Esta lesão progride transformando-se em uma típica úlcera leishmaniótica, de forma circular, bordos altos, com fundo granuloso, de coloração vermelha intensa, recoberto por exsudato seroso ou seropurulento o que depende da presença de infecções secundárias (Genaro, 2000).

1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A doença é caracterizada por quatro manifestações clínicas distintas (Marsden & Jones, 1985) a forma cutânea ou oriental causada pela *L. tropica*, *L. major*, *L. infantum* e *L. aethiopica* no Velho Mundo (O'Neill *et al.*, 1991) e *L. mexicana* no Novo Mundo (Chu *et al.*, 1983); a forma visceral ou kalazar causada pela *L. donovani* com afinidade específica pelo sistema reticuloendotelial (Abboud *et al.*, 1970); e a forma muco-cutânea ou leishmaniose americana, causada pela *L. brasiliensis* (Roizenblatt *et al.*, 1979) e ainda pela forma cutânea difusa.

Sintomas clássicos como febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia podem não estar presentes e já se documentou infecção assintomática (Bernard, 1988; Desjeux, 1999; Wolday, 2000).

1.2.1 Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral se manifesta sob três formas distintas: assintomática, oligossintomática e forma clássica, onde os parasitas *L. donovani* ou *L. chagasi* invadem macrófagos em todo o sistema reticuloendotelial causando doença sistêmica intensa, caracterizada por hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, pancitopenia, febre e perda ponderal. A sobrecarga do sistema reticuloendotelial com parasitas predispõe os pacientes a infecções bacterianas, a causa habitual de

morte. Hemorragias associadas a trombocitopenia também podem ser fatais (Badaró *et al.*, 1986; Goto e Lindoso, 2004).

1.2.2 Leishmaniose Cutânea

A lesão (também chamada de úlcera tropical) consiste em uma única úlcera na pele exposta, inicia-se como uma pápula pruriginosa circundada por induração, a qual evolui para uma úlcera rasa e lentamente expansiva, com bordas regulares, a qual geralmente involui dentro de seis meses sem tratamento. Ao exame microscópico, a lesão é granulomatosa, em geral com muitas células gigantes e poucos parasitas. Sendo causada pela *L. major*, *L. mexicana* e *L. braziliensis* (Funasa, 2000; Fernandes *et al.*, 2004).

1.2.3 Leishmaniose Mucocutânea

Causada pela *L. braziliensis* é encontrada apenas no Novo Mundo. Caracteriza-se por lesões úmidas, ulcerativas ou não, as quais podem ser desfigurantes, que se desenvolvem na laringe e nas junções cutaneomucosas do septo nasal, ânus ou vulva. Ao exame microscópico, observa-se um infiltrado inflamatório misto com histiócitos contendo parasitas em associação a linfócitos e plasmócitos. Posteriormente, a reação tecidual torna-se granulomatosa, e o número de parasitas declina. No decorrer do tempo, as lesões remitem e deixam cicatrizes, porém a reativação pode ocorrer, após longos intervalos, por mecanismos ainda não compreendidos (Silveira *et al.*, 2004). A alta taxa de recaída pode ser devida à imunossupressão que, ao expressar clinicamente a leishmaniose, permite a reativação ou a doença primária (Pintado *et al.*, 2001).

1.2.4 Leishmaniose Cutânea Difusa

Encontrada apenas na Etiópia e África Oriental adjacente, na Venezuela, Brasil e México; sendo, portanto, uma forma rara de infecção da derme. Tem início como um único nódulo cutâneo, que se expande até que todo o corpo seja coberto por lesões nodulares, as quais se assemelham a quelóides, e são freqüentemente confundidas com os nódulos da lepra lepromatosa. As lesões não se ulceram, mas contêm vastos agregados de macrófagos espumosos repletos de *leishmanias*. Os pacientes costumam ser anérgicos não apenas a leishmanina, mas também a outros antígenos cutâneos, e freqüentemente as lesões respondem mal ao tratamento (Samuelson, 2001; Silveira *et al.*, 2004).

1.3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

A intensidade da lesão causada por *Leishmania* é determinada pela resposta imune do hospedeiro; embora os mecanismos envolvidos na resposta imune de portadores de leishmaniose não estejam claramente elucidados. Sabe-se que em todas as formas clínicas, a recuperação e a resistência à doenças são dependentes de respostas imunes mediadas por células T (Carvalho *et al.*, 1992; Bacellar *et al.*, 2002), desta forma o organismo humano desenvolve uma resposta imune celular e humoral contra o parasito, caracterizando os padrões de resposta Th1 e Th2 (Reed e Scott, 1993).

A resistência do hospedeiro está associada a ativação seletiva e diferenciação de células efectoras "T helper" CD4⁺ (Th1) as quais secretam um padrão de citocinas específicas: IL-2, IFN- γ , IL-12, e TNF- α as quais são conhecidas como citocinas pré-inflamatórias. Já a susceptibilidade à infecção está relacionada à resposta de células CD4⁺ (Th2), que secretam citocinas do tipo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β (Reiner & Locksley, 1995; Bourreau *et al.*, 2003).

Os mecanismos que levam à expressão das diferentes classes de células CD4⁺ ainda não foram esclarecidos, embora existam evidências que vários

fatores podem afetar o processo durante a infecção; como a presença de determinadas citocinas no meio durante os eventos iniciais da diferenciação celular e a interação com células apresentadoras de antígenos que podem preferencialmente apresentar diferentes classes de antígenos. As *Leishmanias* são removidas do corpo por mecanismos imunes celulares, linfócitos T auxiliares CD4⁺ da classe Th1 específicos para o parasita podem secretar interferon- γ , que, juntamente com o TNF- α secretado por macrófagos, ativa fagócitos a destruírem os parasitas através de metabólitos tóxicos do oxigênio ou ácido nítrico (ou ambos) (Reiner e Locksley, 1995). Em contraste, a sub-regulação da resposta imune que acarreta anergia e doença progressiva pode ser causada por células Th2, específicas para o parasita, que secretam IL-4, a qual inibe a ativação dos macrófagos por interferon- γ , e inibe a secreção de TNF- α (Ritter & Korner, 2002).

Na forma cutânea localizada observa-se uma correlação com a resposta do tipo Th1, caracterizada histologicamente como um processo granulomatoso tipo tuberculóide, com proliferação linfocitária e plasmocitária marcada por ausência ou escassez de parasitos (Cáceres-Dittmar *et al.*, 1993; Carvalho, *et al.*, 1992). Já na forma cutaneomucosa observa-se um padrão Th0, o qual apresenta expressão simultânea de citocinas Th1 e Th2. A leishmaniose cutâneo-difusa está correlacionada com a resposta Th2, onde há uma infiltração dérmica de macrófagos vacuolizados repletos de amastigotas e com escassez de linfócitos (Genaro, 2000).

A resposta imune celular é variável conforme o quadro clínico, estando presente nos pacientes acometidos pela forma cutânea, exacerbada nos casos de lesões mucosas e usualmente suprimida nos casos de leishmaniose difusa. Já a resposta imune humoral normalmente está presente em todos os tipos de manifestações clínicas. Sendo que os níveis de anticorpos observados na forma difusa são elevados, já nas formas cutânea e cutaneomucosa os níveis são baixos ou discretamente aumentados quando há acometimento de mucosas (Genaro, 2000).

2 QUIMIOCINAS

As quimiocinas foram estabelecidas como citocinas quimioatraentes em 1992 após o Encontro Internacional de Imunologia em Budapest (Lindley *et al.*, 1993). As quimiocinas constituem uma grande família de mediadores inflamatórios e imunológicos, e apresentam similaridade com as citocinas, bem como diferenças claras. Assim como as citocinas, as quimiocinas são proteínas secretórias produzidas por leucócitos e células teciduais constitutivamente ou após indução, e exercem seus efeitos localmente de forma autócrina ou parácrina. Entretanto as quimiocinas são muito menores que as citocinas e desempenham sua atividade via receptores com sete α -hélices transmembrana acoplados à proteína G, os quais são típicos para atração de leucócitos (Baggiolini, 2001).

Quimiocinas são constituídas de 70 a 130 aminoácidos com quatro resíduos de cisteína conservados (Baggiolini, 1994, 1997). Como proteínas secretórias, são sintetizadas com uma seqüência guia de 20-25 aminoácidos, a qual é retirada antes de sua liberação. Duas famílias principais, CXC e CC, também conhecidas como α e β quimiocinas, são distinguidas de acordo com a posição dos dois primeiros resíduos de cisteína, os quais são separados por um aminoácido variável (CXC) ou são adjacentes (CC). As cisteínas formam duas pontes dissulfeto (Cys1 \rightarrow Cys3 e Cys2 \rightarrow Cys4), o que confere às quimiocinas sua estrutura tridimensional. As pontes dissulfeto mantêm as regiões amino terminais juntas, o que é essencial para sua atividade biológica (Baggiolini, 2001).

No entanto há quimiocinas de outras famílias, como as linfotaxinas com duas em vez de quatro cisteínas conservadas (Kennedy *et al.*, 1995), e uma glicoproteína de membrana, fractalcina ou neurotactina, na qual os dois primeiros resíduos de cisteína são separados por três resíduos aminoácidos variáveis (CX₃C) (Bazan *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1997). O domínio amino terminal é curto (3-10 aminoácidos) enquanto que a hélice carboxi terminal consiste em 20-60 aminoácidos (Clark-Lewis *et al.*, 1995).

Em soluções concentradas diversas quimiocinas se associam para formarem dímeros (Clowre *et al.*, 1990; Baldwin *et al.*, 1991). A estrutura geral dos dímeros é diferente para quimiocinas CXC e CC. Originalmente acreditava-se que interagem com seus receptores através de mecanismos distintos, entretanto

descobriu-se que a tendência de formar dímeros varia, e que algumas quimiocinas são sempre monoméricas, como a MCP-3 (Kim *et al.*, 1996).

2.1 NOMENCLATURA

Uma nomenclatura sistemática para as quimiocinas e para seus receptores se tornou necessária com a descoberta de muitas moléculas novas. Esta classificação (Zlotnik & Yoshie, 2000) baseia-se no princípio estabelecido para os receptores na Conferência Gordon em Citocinas Quimiotáticas de 1966. Os receptores são definidos como CXC, CC, XC e CX3C, seguidos pela letra R (receptor) e um número. As quimiocinas são definidas seguindo o mesmo padrão, baseado em sua estrutura, seguidas pela letra L (ligante) e pelo número de seu gene. Enquanto que a nomenclatura sistemática tem sido adotada para os receptores, a maioria das quimiocinas ainda é distinguida por seus nomes tradicionais (Baggiolini, 2001).

2.2 RECEPTORES DE QUIMIOCINAS

Seis receptores de quimiocinas CXC e dez CC já foram identificados, além dos receptores para a linfotactina e fractalcina. A maioria dos receptores reconhece mais de uma quimiocina e muitas quimiocinas se ligam a mais de um receptor (Baggiolini, 2001). Contudo os receptores CC ligam-se somente as quimiocinas CC, e do mesmo modo os receptores CXC ligam-se somente as quimiocinas CXC. Esta restrição ligante-receptor provavelmente está relacionada às diferenças estruturais entre as quimiocinas CC e CXC, as quais têm estruturas primárias, secundárias e terciárias similares, mas quaternárias diferentes (Lodi *et al.*, 1994).

Estudos visando a identificação dos domínios das quimiocinas que estão envolvidos na sua ligação com o receptor e sua ativação foram descritos

primeiramente com a IL-8. Revelou-se a importância da região amino terminal, e identificou-se uma seqüência de três resíduos, Glu-Leu-Arg precedendo a primeira cisteína, o qual é essencial para a atividade da IL-8 (Hebert *et al.*, 1991; Clark-Lewis *et al.*, 1991, 1993). Após a clonagem dos receptores de IL-8, verificou-se que tal seqüência é essencial para sua ativação através das quimiocinas, e que a mesma é conservada em todos os ligantes naturais do CXCR1 e CXCR2 (Baggiolini *et al.*, 1994, 1997). Entretanto os efeitos da IL-8 não podem ser mimetizados com oligopeptídeos contendo a seqüência Glu-Leu-Arg-Cys (Clark-Lewis *et al.*, 1993). Estes resultados indicam que outros sítios de reconhecimento são necessários. Tais sítios são identificados logo após a segunda cisteína e antes da terceira, por mutagênese ou pela síntese de análogos híbridos da forma de IL-8 de 72 resíduos (Clark-Lewis *et al.*, 1995). O sucesso destes experimentos motivou estudos similares com muitas outras quimiocinas, os quais confirmaram a importância da região amino terminal para a ativação do receptor. Estudos mais recentes com o SDF-1 (CXCL12), o ligante específico para o CXCR4 – o qual é amplamente expresso em leucócitos e células de tecidos, e também é um co-receptor para o HIV (Murphy *et al.*, 2000) – levou à identificação de seqüências para o reconhecimento e ativação do receptor (Crump *et al.*, 1997; Zlotnik & Yoshie, 2000). Os primeiros resíduos amino terminais, Lys-Pro, são essenciais para a ativação: a deleção da lisina diminui drasticamente sua atividade, enquanto que a deleção de ambos aminoácidos inativa totalmente a quimiocina (Crump *et al.*, 1997).

Coletivamente os estudos das relações estruturais com a atividade mostraram que as quimiocinas CXC e CC têm dois sítios principais de interação com seus receptores, um situado no domínio amino terminal e o outro no “loop” rígido após a segunda cisteína. Ambos são mantidos próximos por pontes dissulfeto (Baggiolini, 2001).

A identificação de um grande número de receptores de quimiocinas e a caracterização de sua seletividade e expressão em diferentes tipos de leucócitos tem fornecido informações sobre a regulação do tráfego de leucócitos na saúde e doença. Fagócitos sangüíneos expressam diferentes tipos e combinações de receptores de quimiocinas, CXCR1 e CXCR2, os receptores de IL-8, são encontrados exclusivamente em neutrófilos, os quais estão envolvidos principalmente da defesa contra bactérias. Monócitos, eosinófilos e basófilos compartilham alguns receptores e expressam outros com exclusividade (CCR3 em

eosinófilos e basófilos e CCR5 em monócitos) e, portanto podem ser recrutados seletivamente por quimiocinas apropriadas (Baggiolini, 2001).

Em contraste aos fagócitos, que apresentam receptores de quimiocinas de forma restrita, os linfócitos T podem expressar a maioria deles, como demonstrado em estudos recentes (Sallusto *et al.*, 2000; Loetscher *et al.*, 2000). A expressão de receptores nas células T é regulada por citocinas (como IL-2, IL-4 e IFN- γ) e outras moléculas efetoras e refletem o grau de diferenciação funcional.

Foi demonstrado que a cultura de células T em presença de IL-2 aumenta progressivamente a expressão de muitos receptores de quimiocinas, denominados CCR1, CCR2, CCR5 e CXCR3, e a resposta quimiotática frente a RANTES, MCP-1, MIP-1 β , IP10 e outras (Loetscher *et al.*, 1996). O efeito da IL-2 é reversível, o número de receptores e a responsividade decaem rapidamente com a retirada da citocina, e restabelece-se quando a mesma é adicionada novamente. Estas observações geraram muito interesse e muitos grupos começaram a estudar a expressão de receptores de quimiocinas no contexto da diferenciação de células T e aquisição de propriedades funcionais. Demonstrou-se que células Th1 e Th2 quando obtidas pela cultura em presença de citocinas apropriadas apresentam um repertório diferente de receptores de quimiocinas: CCR5 e CXCR3 para Th1 e CCR3 e CCR4 para células Th2 (Sallusto *et al.*, 1998a, 1998b; Bonecchi *et al.*, 1998).

2.3 SINALIZAÇÃO INTRACELULAR

Com a ligação de quimiocinas, a proteína G trimérica é ativada pela troca do GDP por GTP, e se dissocia em subunidade α ligada ao GTP e subunidade $\beta\gamma$. A subunidade $\beta\gamma$ ativa dois sinais principais para a transdução de enzimas, a fosfolipase C (PLC β_2 e β_3) que é específica para o fosfatidilinositol-3-OH quinase (PI3K γ). A PLC β cliva o fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato produzindo dois segundos mensageiros, o (1,4,5) trifosfato inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). IP3 induz a liberação de Ca²⁺ dos reservatórios intracelulares, levando a um aumento transitório na concentração de cálcio livre, o DAG ativa várias isoformas da proteína quinase C (PKC). A PI3K γ rapidamente gera fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato e inicia a ativação

de outra quinase, PKB. Após a hidrólise do GTP a subunidade α ligada ao GDP se re-associa com a subunidade $\beta\gamma$ e termina a sinalização. Novas descobertas sugerem que a subunidade α é mais que uma molécula que regula a atividade da subunidade $\beta\gamma$, e pode sinalizar através da ativação de tirosinas quinases (Thelen, 2001).

O estudo da sinalização é importante como base para uma melhor caracterização da ação das quimiocinas com diferentes funções biológicas e para a identificação de processos bioquímicos que podem ser alvos terapêuticos regulando as atividades das quimiocinas (Baggiolini, 2001).

Estudos com neutrófilos estimulados com IL-8 demonstraram que as quimiocinas induzem rapidamente uma mudança na morfologia celular, resultante da polimerização e despolimerização da actina (Thelen *et al.*, 1988) e do aumento da expressão e ativação de integrinas através dos quais os leucócitos aderem às células epiteliais antes da migração (Springer, 1994). Outro efeito característico é a liberação do conteúdo dos grânulos, como exemplo proteases dos neutrófilos, monócitos, linfócitos T CD8⁺ e células NK, histamina de basófilos e proteínas citotóxicas de eosinófilos, a produção de lipídeos bioativos, e a formação de radicais de oxigênio durante o "burst" respiratório (Baggiolini *et al.*, 1994, 1997). A liberação é observada em altas concentrações de quimiocinas e aumentam após o acondicionamento das células com citocinas inflamatórias. A liberação *in vivo* pode ocorrer uma vez que os leucócitos tenham alcançado seu alvo, como exemplo um foco de infecção e inflamação, onde altos níveis de quimiocinas aumentam as ações antimicrobianas de defesa celular (Baggiolini *et al.*, 1994, 1997).

2.4 EXPRESSÃO DAS QUIMIOCINAS EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS

Doenças inflamatórias são caracterizadas por um aumento seletivo de diversos subgrupos de leucócitos, um processo controlado pela expressão de algumas quimiocinas (Luster *et al.*, 1997).

Cada doença demonstra um infiltrado inflamatório característico com regulação de RNA mensageiro e concentração protéica das quimiocinas distintos. O

tipo de infiltrado inflamatório que caracteriza uma determinada doença é controlado, em parte, pelo subgrupo de quimiocinas expresso no tecido afetado. Por exemplo, em síndromes respiratórias e em muitos processos agudos, como a pneumonia bacteriana observa-se um influxo maciço de neutrófilos ao tecido. A concentração de potentes quimioatraentes para neutrófilos, tal como a interleucina-8, encontra-se aumentada no fluido broncoalveolar destes pacientes com doenças pulmonares (Chollet-Martin *et al.*, 1993).

Nas meningites virais, os monócitos e linfócitos são recrutados ao tecido nervoso, sendo possível observar um aumento na concentração de quimiocinas que atuam sobre essas células no fluido cerebrospinal, tais como IP-10 e proteína-I quimioatraente de monócitos. O aumento na concentração de quimiocinas correlaciona-se com a quantidade de células infiltradas nas meninges (Lahrtz *et al.*, 1997).

Em muitas doenças crônicas ocorre a infiltração tecidual de linfócitos e macrófagos. Lesões granulomatosas características da hanseníase e sarcoidose apresentam infiltrados de linfócitos ativados e altas concentrações de IP-10 (Gottlieb *et al.*, 1988). No processo de aterosclerose, macrófagos e linfócitos são as células potencialmente encontradas nos vasos sanguíneos afetados; sugerindo que as mesmas devem ter papel central na patogênese da aterosclerose, atuando como progenitores das células que armazenam lipídeos e também como uma fonte de fatores de crescimento que promovem a hiperplasia da camada íntima. O mecanismo de recrutamento de monócitos nas lesões ateroscleróticas é desconhecido, mas a MCP-I (proteína I quimioatraente de monócitos) tem sido detectada em artérias carótidas doentes e não em artérias normais (Nelken *et al.*, 1991).

Na asma, na rinite e na dermatite atópica observam-se um acúmulo e uma ativação seletiva de eosinófilos e mastócitos. Os mediadores derivados destas células participam na patogenia dessas doenças alérgicas (Bousquet *et al.*, 1990). Fatores liberadores de histamina, como a eotaxina e as proteínas quimioatraentes de monócitos, são bastante conhecidos e muito importantes nos processos alérgicos e inflamatórios (Luster *et al.*, 1997). Estas quimiocinas atuam como principais fatores na liberação de histamina na ausência de antígeno e anticorpos IgE (Souza *et al.*, 1994). Além disso, várias quimiocinas que atuam sobre os eosinófilos têm sua concentração aumentada no tecido epitelial de pacientes com

dermatite atópica, rinite alérgica ou asma após a apresentação de um determinado antígeno. É provável, portanto que as quimiocinas estabeleçam uma relação molecular entre a resposta imunológica ativada por um antígeno específico e a migração dos eosinófilos aos tecidos (Garcia-Zepeda *et al.*, 1996a, 1996b; Ying *et al.*, 1995).

A colite ulcerativa e a doença de Crohn são caracterizadas por inflamação crônica com superposição de exacerbações agudas. Na fase crônica os macrófagos e os linfócitos infiltram o intestino, e na fase aguda, neutrófilos e talvez eosinófilos deixem a circulação para entrar na mucosa intestinal. Muitas quimiocinas estão presentes no tecido intestinal dos pacientes com estas patologias (Garcia-Zepeda *et al.*, 1996a; Reinecker *et al.*, 1995; Grimm & Doe, 1996).

Na psoríase observam-se neutrófilos, os quais foram atraídos pela IL-8 e GRO- α (oncogene alfa relacionado com o crescimento, embora não seja realmente um oncogene) e linfócitos T ativados, cujos quimioatraentes são o IP-10 e a proteína I quimioatraente para monócitos. Nas placas de psoríase foram identificados quimioatraentes para ambos os tipos celulares, mas não foram encontrados em pele normal (Gottlieb *et al.*, 1988; Gillitzer *et al.*, 1991). E o tratamento com sucesso da psoríase resulta em um decréscimo de IP-10 (Gottlieb *et al.*, 1988).

2.5 QUIMIOCINAS EM DOENÇAS INFECCIOSAS

Os vírus, para garantirem seu acesso ao citoplasma e por fim ao núcleo celular, microorganismos patogênicos ligam-se a receptores nos leucócitos; como exemplo o vírus Epstein Barr que se liga ao receptor para complemento 3 e os rinovírus que se ligam a molécula 1 de adesão intercelular.

Os receptores para quimiocinas servem como co-receptores para dois importantes patógenos, o Plasmodium e o HIV. O *Plasmodium vivax* liga-se ao DARC (receptor nos eritrócitos) (Horuk *et al.*, 1993) e o HIV liga-se a vários receptores para quimiocinas. Esses receptores acabam por determinar o tropismo viral por facilitarem a entrada às células (Feng *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996; Deng

et al., 1996; Choe *et al.*, 1996; Alkhatib *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996; D'Souza & Harden, 1996).

O HIV utiliza receptores de quimiocinas como seus co-receptores obrigatórios para sua entrada nas células; uma vez que sua gp120 liga-se ao CD4, provocando uma mudança conformacional, o que permite que haja uma interação subsequente com o receptor de quimiocina e conseqüente fusão de suas membranas. O CXCR4 é um co-receptor para cepas do HIV tipo 1 (HIV-1) que infecta linhagem de células T (cepas T-trópicas), e o CCR5 é um co-receptor para HIV-1 que infectam macrófagos e células T ativadas (cepas M-trópicas). RANTES (quimiocina que regula expressão e secreção por linfócitos T) e MIP-1 α e MIP-1 β (proteínas inflamatórias de macrófagos -1 α e 1 β), os quais são ligantes para CCR5, e o SDF-1 um ligante para CXCR4, bloqueiam a entrada do HIV M-trópico e T-trópico respectivamente, nas células (Cocchi *et al.*, 1995; Bleul *et al.*, 1996; Oberlin *et al.*, 1996).

A importância dos receptores de quimiocinas na patofisiologia do HIV tornou-se aparente quando se descobriu um polimorfismo para CCR5, o qual poderia explicar porque certos pacientes com alto risco para infecção por HIV-1 permanecem não infectados (Dean *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996). Pessoas que são homozigotas para a deleção de 32 pares de bases no gene para o CCR5 não têm a síntese de proteínas CCR5 funcionais, e as mesmas não são encontradas dentre os pacientes HIV positivos. Além disso, células de pessoas com esta mutação podem conferir resistência à infecção por HIV-1 "*in vitro*" (Paxton *et al.*, 1996).

Observou-se também que pessoas heterozigotas para tal deleção apresentam uma progressão mais lenta na infecção pelo HIV-1 do que os indivíduos onde não há constatação desta mutação. Este fato pode ocorrer devido à existência de uma associação entre a gp120 e o CD4 e o receptor para quimiocina antes do HIV infectar as células, apesar do mecanismo molecular implicado na fusão celular com o vírus não estar totalmente elucidado (Wu *et al.*, 1996; Trkola *et al.*, 1996; Lapham, 1996; Dettin *et al.*, 2002).

Os patógenos expressam citocinas e receptores para citocinas que são importantes no processo infeccioso (ex. Poxvírus codificam receptores funcionais para interleucina-1 beta e interferon-gama). Muitos dos herpesvírus expressam homólogos de receptores para quimiocinas e muitos deles conseguem se

O receptor CCR5 está envolvido na quimiotaxia de leucócitos para os sítios de inflamação (Murphy *et al.*, 1994; Baggiolini, 1998; Proost *et al.*, 1996). Desempenha um importante papel no recrutamento de macrófagos, monócitos e células T na inflamação (Panzer *et al.*, 2005; Spagnolo *et al.*, 2005), e é normalmente expresso em linfócitos T e células dendríticas, dirigindo a resposta imune preferencialmente para Th1 (Loetscher *et al.*, 1998).

Foi identificado um polimorfismo no gene do receptor CCR5, o qual consiste na deleção de 32 pares de bases, sendo denominado de CCR5 Δ 32 (Liu *et al.*, 1996). Esta variante resulta em uma forma não funcional de receptor, impedindo a sua interação com suas quimiocinas ligantes (Smith *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2004; Sidoti *et al.*, 2005).

O alelo CCR5 Δ 32 é comum entre Europeus caucasóides (freqüência alélica 0,05 - 0,15), porém raro ou ausente na maioria dos outros grupos étnicos, como nativos africanos e ameríndios (McNicholl *et al.*, 1997; Martinson *et al.*, 1997; Anzala, *et al.*, 1998; Stephens *et al.*, 1998; Lebouté *et al.*, 1999; Martinson *et al.*, 2000). A ausência desta variante também foi relatada na população nativa da América do Sul, em populações nativas da Amazônia Brasileira (Lebouté *et al.*, 1999; Chies e Hutz, 2003) e também em Asiáticos (O'Brien & Moore, 2000; Wang *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2005).

As diferenças na distribuição mundial do alelo CCR5 Δ 32 podem ser explicadas pela hipótese de que esta mutação surgiu na população Caucasóide (Libert *et al.*, 1998) e teve sua freqüência rapidamente aumentada devido a forte pressão seletiva, possivelmente originada por patógenos que infectam macrófagos: *Yersinia pestis*, *Shigella*, *Salmonella* ou *Mycobacterium tuberculosis* (Lenski *et al.*, 1988; Stephens *et al.*, 1998). Muito provavelmente teve sua origem na Islândia ($fr=0.14$; Martinson *et al.*, 1997), aparentemente esta deleção disseminou-se nos séculos VIII, IX e X com os ataques Vikings (Poser *et al.*, 1994).

Diversos estudos sustentam que a deleção CCR5 Δ 32 poderia estar associada à resistência à infecção pelo HIV (Dean *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Zuniga *et al.*, 2003), e que confere proteção contra asma, artrite reumatóide, esclerose múltipla, e rejeição de enxerto renal em Caucasóides (Zuniga *et al.*, 2003).

Análises *in vitro* de monócitos de portadores CCR5 Δ 32 demonstraram uma reduzida resposta quimiotática aos ligantes do CCR5 (Panzer *et al.*, 2005). Como a resposta Th1 está associada com a inflamação, o alelo CCR5 Δ 32 não funcional resulta em uma resposta Th1 menos efetiva, conseqüentemente levando a um estado inflamatório mais brando (Chies & Hutz, 2003), uma vez que a molécula de CCR5 é normalmente expressa em macrófagos, linfócitos T e células dendríticas e dirige a resposta imune, preferencialmente, para o padrão Th1 (Loetscher *et al.*, 1998).

Propõe-se que os macrófagos sejam as principais células hospedeiras para *Leishmania*, contudo o papel destas células ainda não está bem caracterizado nem na prevenção da doença nem na sua progressão independente das células T (Awasthi *et al.*, 2004). Neste trabalho investigamos a freqüência de alelo CCR5 Δ 32 na população da Região Norte do Paraná, uma vez que a variação no gene CCR5 pode ser um importante fator dentro dos aspectos clínicos da leishmaniose.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Analisar o polimorfismo genético do receptor de quimiocina CCR5 em indivíduos com leishmaniose e em indivíduos saudáveis.

3.2 ESPECÍFICOS

- Analisar as características demográficas dos pacientes com leishmaniose;
- Avaliar a resposta imune humoral e celular em todos os pacientes com leishmaniose, através dos testes de imunofluorescência indireta (IFI) e intradermorreação de Montenegro (IDRM), respectivamente;
- Analisar a resposta imune humoral e celular (IFI e IDRM respectivamente) para *Leishmania sp.* em relação ao genótipo do CCR5;
- Avaliar a prevalência de mutações CCR5/ Δ 32 em ambas populações;
- Analisar a frequência alélica do CCR5 em ambas as populações;
- Analisar os aspectos clínicos das lesões dos pacientes em relação ao genótipo CCR5;
- Verificar a progressão da leishmaniose cutânea para mucocutânea nos portadores do alelo Δ 32.
- Relacionar os aspectos clínicos das lesões com a resposta imune celular dos pacientes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

As populações de estudo consistiram de dois grupos: um grupo de 100 pacientes com diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana, atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, e um grupo de 100 indivíduos saudáveis com sorologia negativa para sífilis, doença de Chagas, Hepatite C (HCV), hepatite B (HBV) e leishmaniose. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – UEL, que está de acordo com a resolução 196/96 – CNS.

4.2 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue de pacientes diagnóstico positivo para leishmaniose (sorologia e intradermorreação de Montenegro) consistiram em 5ml de sangue periférico coletados a vácuo, por aspiração mecânica automática (*vacuotainer*), com agulhas e tubos descartáveis estéreis contendo anticoagulante EDTA.

A sorologia foi realizada pelo teste de imunofluorescência indireta para leishmaniose tegumentar americana (Badaró & Reed, 1996) no laboratório de Imunologia Clínica, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas – CCS, da Universidade Estadual de Londrina.

4.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta

A reação de Imunofluorescência indireta foi realizada de acordo com protocolo do Laboratório de Imunologia Clínica, Hospital Universitário (HU) da Universidade Estadual de Londrina. O título de anticorpos contra *Leishmania* foram medidos utilizando-se formas promastigotas inativadas de *Leishmania braziliensis* (10^6 *Leishmania*/mL da cepa de referência OMS-MHOM/BR/75/M2903), em tampão salina pH 7.2, fixadas em lâminas comerciais (CPPI-Centro Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, Secretaria de Estado da Saúde, Curitiba, Brasil) e anti IgG humana conjugada com fluoresceína (Biolab Merieux, Rio de Janeiro, Brasil) como anticorpo secundário em uma diluição inicial de 1:20. A leitura foi realizada em microscópio de imunofluorescência (Nikon) em objetiva de 40x. As amostras de soro foram consideradas reagentes quando o título foi igual ou superior a 1:20. Controles positivo e negativo foram incluídos em cada lâmina.

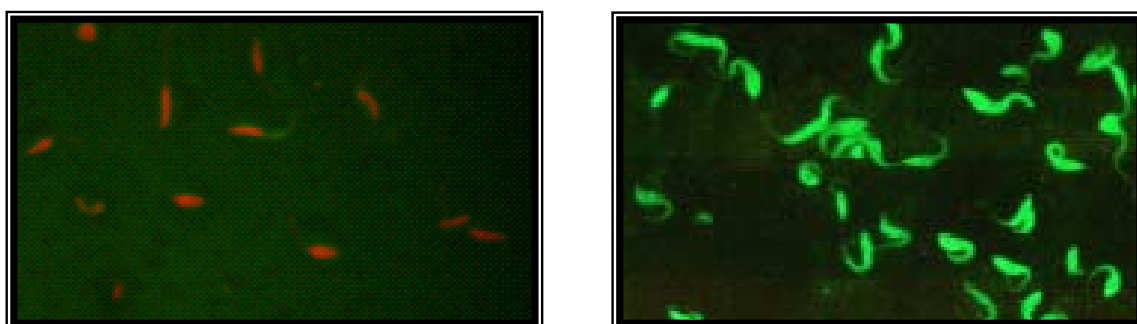
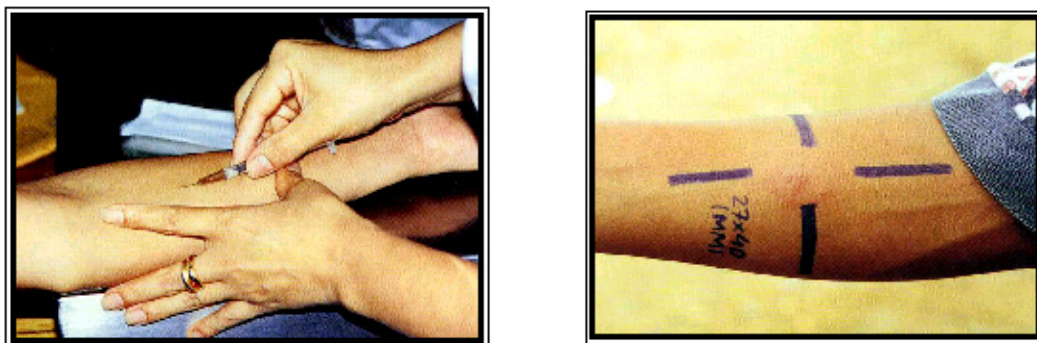


Figura 8 – Reação de Imunofluorescência Indireta. A figura da esquerda representa uma reação negativa, e a da direita uma reação positiva.

4.2.2 Intradermorreação de Montenegro

O teste de intradermorreação de Montenegro foi realizado através da inoculação intradérmica de 0,1 mL do antígeno disponível comercialmente na forma promastigota de *Leishmania braziliensis* (CPPI-Centro Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, Secretaria de Estado da Saúde, Curitiba, Brasil), na face anterior

do antebraço. A leitura foi realizada entre 48 e 72 horas após a inoculação. A reação foi considerada positiva, quando o diâmetro da endureção resultante foi igual ou superior a 5mm (Figura 8).



Fonte: <http://www.gerenciadeleishmaniose.hpg.ig.com.br/index.html>

Figura 9 – Teste de Intradermorreação de Montenegro.

4.3 OBTENÇÃO DE DNA

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de sangue periférico dos pacientes em estudo. A técnica utilizada no presente trabalho consiste basicamente no rompimento enzimático de membranas celulares, eliminação de proteínas e ácidos graxos por ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA com etanol (Kirby, 1990; Miller *et al.*, 1988) com algumas modificações. A integridade do DNA foi analisada rotineiramente por uma eletroforese a 100V, em gel de agarose 1%.

4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA CCR5

Os iniciadores para CCR5 utilizados para a amplificação do DNA foram sintetizados de acordo com a seqüência *GenBank* AF009962.

4381 gtgatcactt ggggtgtggc tgtgttgcg tctctcccag gaatcatctt **taccagatct**

4441 **caaaaagaag** gtcttcatta cacctgcagc tctcatttc catacattaa agatagtcac

4501 cttggggctg gtctgccgc tgctgtcat ggtcatctgc tactcgggaa tcctaaaaac
 4561 tctgctcgg tgctgaaatg agaagaagag gcacagggtc **gtgaggctta tcttcaccat**
 4621 **catgattgtt** tattttctct tctgggctcc ctacaacatt gtccttctcc tgaacacctt

- *Primer sense*: 5' ACC AGA TCT CAA AAA GAA 3'
- *Primer anti-sense*: 5' CAT GAT GGT GAA GAT AAG CCT CA 3'

A condição da reação de amplificação foi realizada utilizando-se as soluções abaixo:

SOLUÇÕES	VOLUME
10X PCR <i>Buffer</i> *	2,5 µl
MgCL ₂ (50 mM) *	0,75 µl
DNTP (1,25 mM) **	2,0 µl
<i>Primer 1 – sense</i> (2,5 µM)*	1,5 µl
<i>Primer 2 – anti-sense</i> (2,5 µM)*	1,5 µl
H ₂ O milli-Q	11,75 µl
<i>Taq Polymerase</i> (1,25 U/reação)*	2,5 µl
DNA <i>sample</i> (0,1 µg/µl)	2,5 µl
TOTAL	25,0 µl

* INVITROGEN *life technologies* – Brasil.

** Amershan Pharmacia Biotech Incorporation, USA.

Os ciclos no termociclador "PCR *Sprint* – ThermoHybaid" consistiram de temperatura inicial de desnaturação, 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de um minuto a 94°C, para desnaturação, um minuto a 58°C, temperatura de anelamento, e um minuto a 72°C para extensão das fitas, com extensão final de 10 minutos a 72°C.

Todas as reações foram efetuadas com um controle negativo (ausência de DNA) a fim de assegurar a ausência de contaminação, e um controle positivo, onde se utilizou DNA de amostra conhecida quantificada anteriormente e testada em outras amplificações.

Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
94°C	5 min	1
94°C	1 min	35
60°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1
10°C	<i>forever</i>	

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A frequência do alelo $\Delta 32$ foi calculada como: $[1 \times (h + 2H)] / 2N$, onde h representa o genótipo heterozigoto, H o genótipo homozigoto e N o tamanho da amostra para cada população. O desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi determinado através do teste de χ^2 . Para todos os dados o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Para as características demográficas utilizou-se o programa Micronal Origin™ 4.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana apresenta-se em fase de expansão geográfica. Nas últimas décadas, as análises de estudos epidemiológicos têm sugerido mudanças no comportamento epidemiológico da doença. Inicialmente considerada uma zoonose de animais silvestres que acometia ocasionalmente pessoas em contato com florestas, a leishmaniose começa a ocorrer em zonas rurais já praticamente desmatadas e regiões periurbanas, ou em contato com o vetor, comum em atividades como pesca, caça ou acampamentos. Em Londrina, no ano de 2002, foram confirmados 89 casos. Nossas amostras foram provenientes de 100 pacientes predominantemente da região periurbana, sítios e chácaras da região Norte do Paraná.

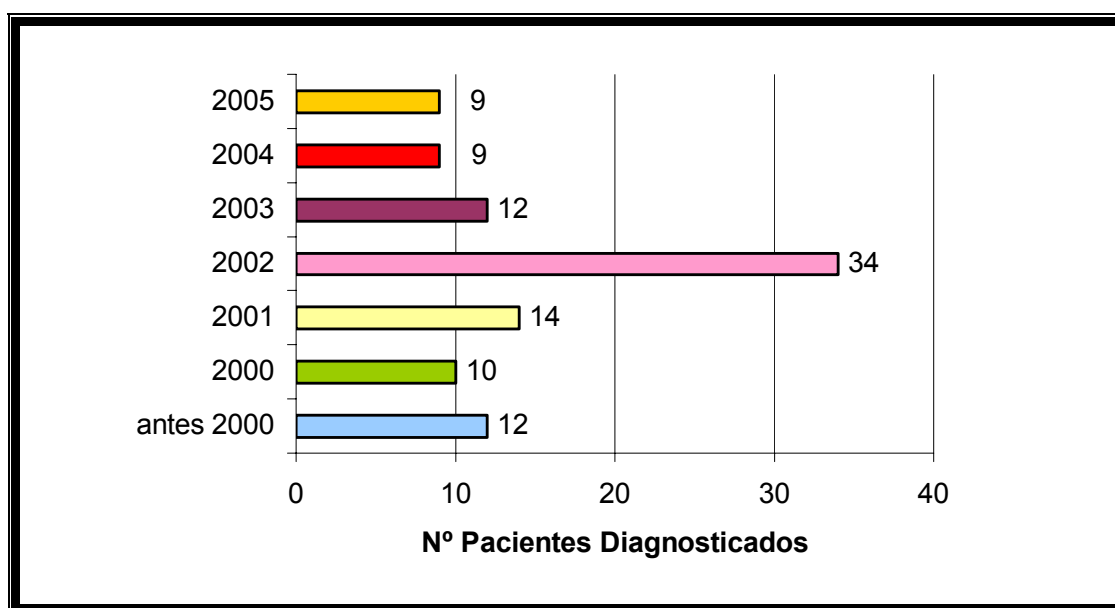


Figura 1 – Distribuição dos pacientes segundo a data do diagnóstico. Foram selecionadas amostras de pacientes com diagnóstico sorológico e IDRМ para leishmaniose. A maior parte dos pacientes selecionados para nosso trabalho foi diagnosticada em 2002

Os pacientes provenientes de várias localidades da região Norte do Paraná foram diagnosticados em sua maioria entre os anos 2000-2005 (Figura 1), muitos deles com história de doença antiga.

No presente trabalho foram avaliados 100 pacientes com diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana, sendo 32 mulheres e 68 homens, com idades entre 03 e 80 anos. O diagnóstico baseou-se em critérios clínicos, reação de imunofluorescência indireta e teste de intradermorreação de Montenegro.

A heterogeneidade da distribuição etária entre os sexos está demonstrada na Tabela 1, onde é possível observar que indivíduos do sexo masculino com idade entre 21 – 60 anos foram mais acometidos quando comparados a indivíduos do sexo feminino para a mesma faixa etária, $p < 0,05$. Este fato pode ser explicado devido a exposição destes ao tipo de trabalho (rural). Embora haja dados que demonstrem uma mudança neste perfil, com acometimento de pessoas de ambos os sexos e diferentes idades (WHO, 2004).

Tabela 1 – Características demográficas dos pacientes diagnosticados com Leishmaniose.

Idade (anos)	Sexo (n)		Total
	Feminino	Masculino	
03 – 10	04	06	10
11 – 20	05	08	13
21 – 60	16*	42*	58*
> 60	07	12	19
Total	32	68	100

- $p < 0,05$ (Teste Student's T – Micronal™ Origin 4.1).

Os títulos de anticorpos na reação de imunofluorescência indireta foram maiores que 1:20 (mediana 1:160) em todos os pacientes selecionados, 70 amostras foram excluídas deste estudo, pois apresentaram reatividade cruzada para paracoccidiodomicose, hanseníase, doença de Chagas, carcinoma basocelular e coinfeção com vírus HIV.

As 100 amostras selecionadas com IFI positivo somente para leishmaniose foram analisadas quanto a resposta imune celular, apresentando reação de intradermoreação de Montenegro positiva ($\geq 5\text{mm}$), cuja mediana foi de 15mm e a média foi de 16,60mm ($\pm 0,83$).

Com a finalidade de realizar a análise genotípica para CCR5, amostras de sangue foram coletadas de pacientes com leishmaniose. O DNA das amostras foi extraído e a integridade das preparações de DNA obtidas foram rotineiramente analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), corados com brometo de etídio e visualizados em ultra-violeta, apresentando um perfil eletroforético típico de uma amostra íntegra. Todas as amostras apresentaram bandas únicas com concentração compatível em relação ao padrão de DNA (100ng/ μl); demonstrando que não houve degradação das amostras de DNA durante sua extração e que as mesmas estavam íntegras. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro a 260 nm.

A partir das amostras íntegras de DNA, de pacientes com leishmaniose, realizou-se PCR para o fragmento CCR5, utilizando-se iniciadores específicos, como descrito em Materiais e Métodos. Na Figura 2, o resultado da amplificação pode ser visualizado em gel de poliacrilamida 10% (v/v), corado com prata onde é possível de se observar os diferentes genótipos observados para o CCR5 nas populações em estudo.

- **CCR5/CCR5** representa o genótipo na ausência de deleção, apresenta uma única banda eletroforética com 225pb.
- **CCR5/ Δ 32** representa o genótipo em heterozigose, o qual apresenta duas bandas eletroforéticas: 225pb e 193 pb.
- **Δ 32/ Δ 32** representa o genótipo em homozigose para a deleção, com uma única banda de 193 pb.

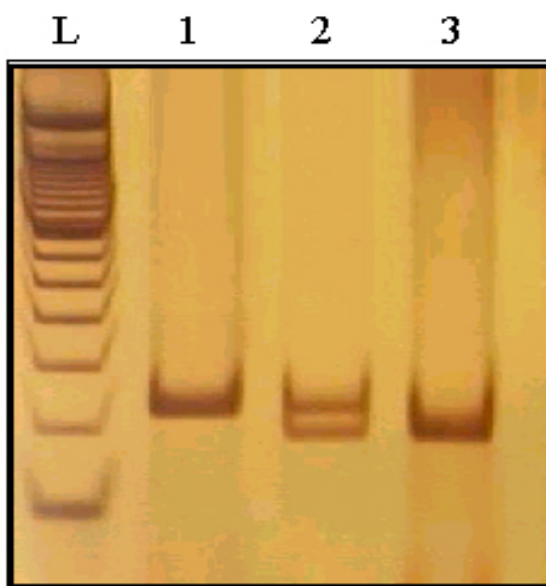


Figura 2 – Diferentes genótipos do receptor de quimiocina 5. Gel de poliacrilamida 10% (v/v) corado com prata. Onde L representa o Ladder 100pb, 1 o genótipo selvagem para o CCR5 (CCR5/CCR5); 2 o genótipo heterozigoto (CCR5/ Δ 32); e 3 o genótipo homozigoto para o alelo variante (Δ 32/ Δ 32).

Dentre os 100 pacientes com leishmaniose, 89% (89/100) são homozigotos para o alelo selvagem (CCR5), 10% (10/100) apresentaram o alelo em heterozigose e 1% (01/100) são homozigotos para o alelo variante (Δ 32). Já nos indivíduos saudáveis a frequência do genótipo selvagem foi de 91% (91/100), o genótipo heterozigoto foi observado em 8% (08/100) dos indivíduos e 1% apresentou o alelo variante em homozigose.

Tabela 2 – Frequência genotípica e alélica dos alelos CCR5 e $\Delta 32$ do gene CCR5 em pacientes com Leishmaniose.

População de Estudo	Nº de amostras	Genótipo (n=100) ^a			Frequência Alélica ^b	
		CCR5/CCR5	CCR5/ $\Delta 32$	$\Delta 32/\Delta 32$	CCR5	$\Delta 32$
Pacientes com Leishmaniose	100*	89	10	01	0,94	0,06
Indivíduos Saudáveis	100 **	91	08	01	0,95	0,05

* χ^2 EHW = 1,2876 grau de liberdade 1 $p > 0,05$

** χ^2 EHW = 2,493 grau de liberdade 1 $p > 0,05$

^a Pacientes com leishmaniose x Indivíduos saudáveis $\chi^2 = 0,244$ (grau de liberdade 2; $p > 0,05$)

^b Pacientes com leishmaniose x Indivíduos saudáveis $\chi^2 = 0,288$ (grau de liberdade 1; $p > 0,05$)

Nossos resultados demonstram que tanto os indivíduos com leishmaniose como doadores normais apresentaram os valores percentuais dos genótipos semelhantes, e se encontram dentro do Equilíbrio de ligação de Hardy Weinberg (Tabela 2).

A frequência alélica foi calculada para ambas as populações estudadas, sendo que a frequência para o alelo CCR5 foi igual a 0,94 em indivíduos com leishmaniose e 0,95 em indivíduos saudáveis, enquanto que a frequência do alelo $\Delta 32$ foi de 0,06 nos pacientes com leishmaniose e 0,05 no grupo controle.

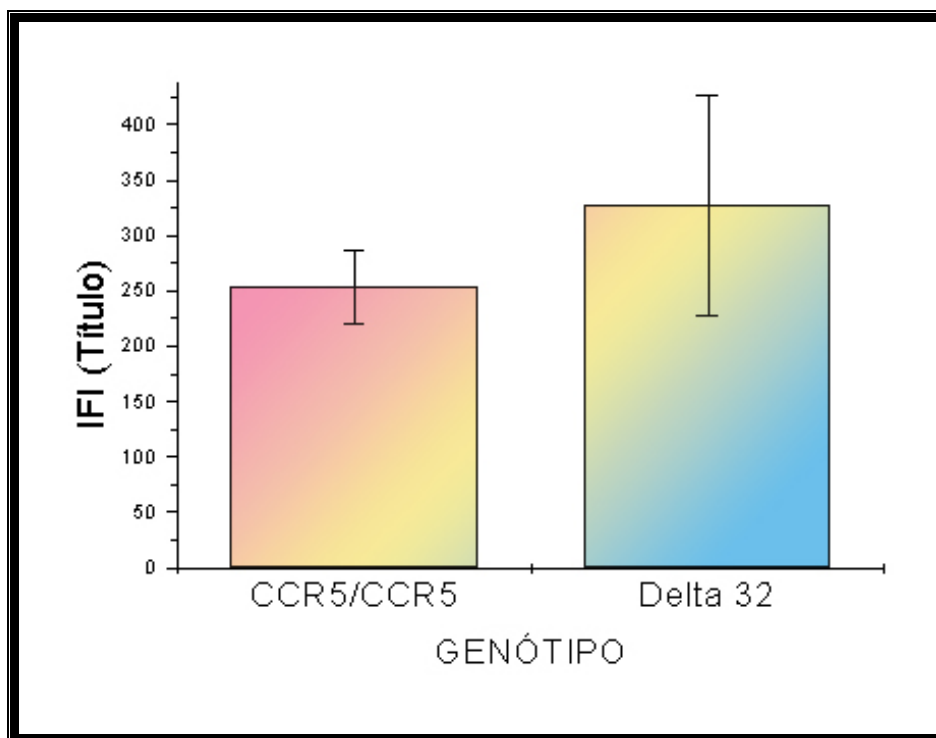


Figura 3 – Título de anticorpos para *Leishmania sp.* em relação ao genótipo do CCR5. A ordenada representa a recíproca do título de anticorpos nos indivíduos portadores do alelo delta32 foi significativamente maior que nos selvagens ($p < 0,05$). Os indivíduos Delta32 são aqueles que apresentam os alelo variante tanto em homozigose quanto em heterozigose.

Os pacientes portadores do alelo $\Delta 32$ apresentaram valor médio do título de anticorpos ($327,27 \pm 99,13$) significativamente maior que os selvagens, os quais apresentaram valor médio igual a $253,26 \pm 33,61$, de acordo com o teste t ($p < 0,05$) (Figura 3). Este perfil pode ser explicado pelo fato de que a deleção $\Delta 32$ acarrete deficiência do receptor de quimiocina CCR5 em favorecer uma resposta imunológica do tipo Th1, provavelmente acarretando um desequilíbrio com tendência para resposta Th2.

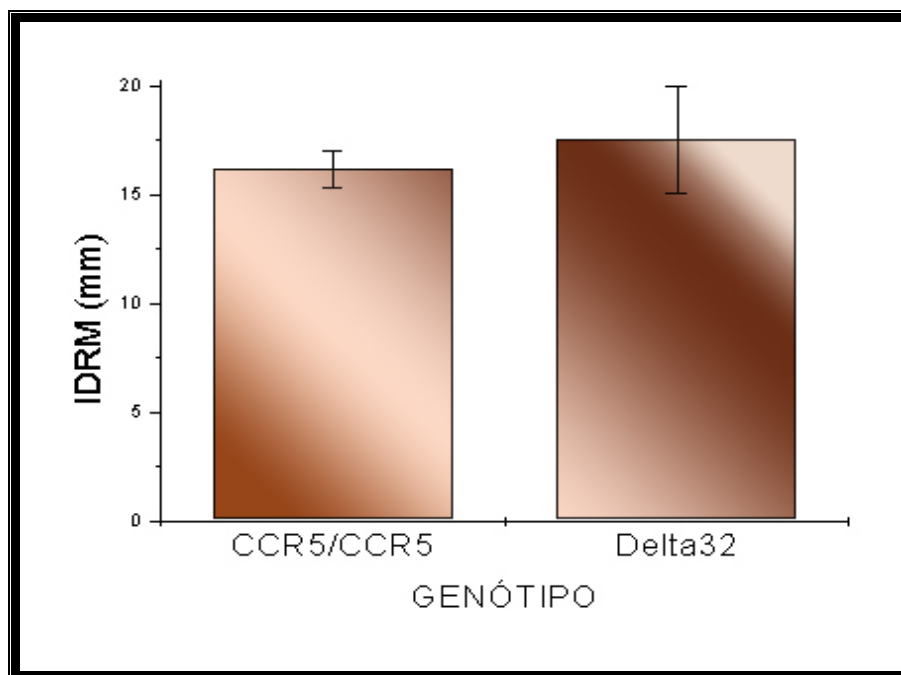


Figura 4 – Intradermorreação de Montenegro em relação ao genótipo. Os indivíduos foram divididos de acordo com o genótipo, sendo os CCR5/CCR5 aqueles que apresentam o alelo selvagem em homozigose. Já os Delta32 são os indivíduos que apresentam os alelo variante tanto em homozigose quanto em heterozigose. Não houve diferença significativa entre genótipos quanto aos valores da IDRM ($p > 0,05$).

Não foi observada diferença significativa entre os diferentes genótipos ($p > 0,05$) com relação aos valores do teste de intradermorreação de Montenegro. Nos indivíduos selvagens (CCR5/CCR5) o valor médio do teste de Montenegro foi de $16,46 \pm 0,89$ mm, enquanto que nos pacientes portadores do alelo $\Delta 32$ o valor médio foi de $17,54 \pm 2,49$ mm (Figura 4).

Os 89 (89%) indivíduos selvagens para o genótipo CCR5/CCR5 apresentaram lesões localizadas, com uma única lesão inicial, pequena, eritematosa, sólida, com bordas elevadas, e cobertas com crosta central, alguns deles desenvolveram uma lesão ulcerada característica, com bordas elevadas e hiperemiadas e base granulomatosa. Dentre os pacientes selvagens, 22,47% (20/89) apresentaram lesões na membrana mucosa nasal e perfuração no septo nasal cartilaginoso, coriza e epistaxe também estavam presentes. Dentre os

portadores do alelo $\Delta 32$ (10% - 10/100) somente a forma cutânea foi observada, caracterizada por uma lesão eritematosa, com crosta central e base granulosa (Tabela 3).

Tabela 3 – Aspectos clínicos em relação ao genótipo.

Aspectos clínicos	Genótipo		
	CCR5/CCR5	CCR5/ $\Delta 32$	$\Delta 32/\Delta 32$
Lesão cutânea	69	10	01
Lesão mucocutânea	20	00	00
Total	89	10	01

Todos os pacientes CCR5/CCR5 que apresentaram lesão na membrana mucosa nasal (22,47% - 20/89), apresentaram uma lesão cutânea ulcerada inicialmente. Dentre estes pacientes 55% (11/20) apresentaram a lesão na mucosa nasal após $2,85 \pm 0,5$ anos, valores médios para reação de Montenegro de $11,87 \pm 2,45$ mm, enquanto que 45% (09/20) desenvolveram a lesão mucosa após $16,25 \pm 4,06$ anos apresentaram valores médios para reação de Montenegro de $25,0 \pm 2,74$ mm (Figura 5). Valli *et al.* (1999) verificaram a presença de uma fraca resposta imune de perfil Th2 no sangue periférico de pacientes com leishmaniose mucocutânea, juntamente com uma resposta Th1 altamente ativada.

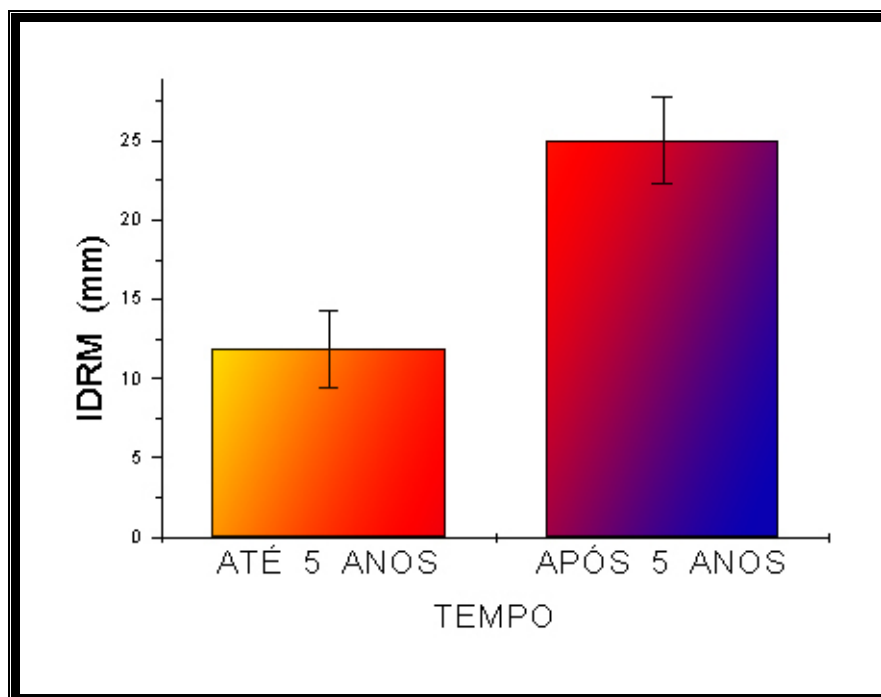


Figura 5 – Intradermorreação de Montenegro em relação ao tempo de desenvolvimento de lesões mucocutâneas. Os valores são significativamente diferentes $p < 0,05$.

Desta forma os valores do teste de Montenegro foram significativamente maiores nos pacientes que apresentaram a lesão mucosa após 5 anos do aparecimento da lesão cutânea inicial, em comparação com aqueles que apresentaram as lesões mucosas dentro de um período de 5 anos após a lesão cutânea inicial. Estes dados sugerem que os pacientes que desenvolveram as lesões mucosas após 5 anos apresentam uma resposta imune celular mais efetiva que os que desenvolveram as lesões até 5 anos após as lesões cutâneas.

A leishmaniose mucocutânea é uma doença associada a resposta imune Th1 (Bacellar *et al.*, 2002), onde há produção elevada de IFN- γ e TNF- α específicos contra antígenos de leishmania, bem como baixa concentração de IL-10 e TGF- β (Faria *et al.*, 2005). Barral-Neto *et al.* (1998) também observaram altos níveis de IFN- γ , os quais eram dez vezes maiores que os níveis de IL-10 no sobrenadante de cultura de células de pacientes com leishmaniose mucocutânea estimuladas com antígeno de leishmania.

A incidência da Leishmaniose Tegumentar Americana, no Brasil, aumentou de 21.800 casos em 1998 para 60.000 em 2003 (Desjeux, 2004). Este aumento tem sido atribuído a mudanças comportamentais e ambientais, como exploração de florestas nativas, migração massiva da zona rural para áreas urbanas, urbanização rápida e não planejada, e a construção de represas e novos esquemas de irrigação (Desjeux & Alvar, 2003).

Com relação à imunologia da Leishmaniose Cutânea, as pesquisas têm sido realizadas principalmente em relação aos subtipos de células T CD4⁺ e CD8⁺, e das citocinas produzidas por estas células nas lesões. Embora as respostas de células T na leishmaniose humana envolvam uma mistura de células Th1 e Th2 (Reed & Scott, 1993), as respostas Th nos sítios de lesão ainda não estão bem estabelecidas. Na leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*, as citocinas do tipo Th1 predominam sobre as Th2 (Cáceres-Dittmar *et al.*, 1993; Louzir *et al.*, 1998). Silveira *et al.* (2004) demonstraram a alta expressão de RNAm de IFN- γ em biópsias de lesões cutâneas de pacientes infectados com *L. braziliensis*, enquanto que não foi observada a expressão de RNAm de IL-4 nas mesmas amostras.

Sabe-se que as quimiocinas são capazes de ativar as células T, embora o padrão de ativação possa diferir nas diferentes interações entre receptor de quimiocina e quimiocina ligante (Nanki & Lipsky, 2001). O receptor de quimiocina 5 (CCR5) desempenha um importante papel no recrutamento de macrófagos, monócitos e células T na inflamação (Panzer *et al.*, 2005; Spagnolo *et al.*, 2005), dirigindo a resposta imune para o padrão Th1 (Loetscher *et al.*, 1998). A deleção de 32 pares de bases no receptor de quimiocina 5 (CCR5 Δ 32) pode alterar a expressão ou a função da proteína produzida (Sidoti *et al.*, 2005).

Na população brasileira, caracterizada por uma intensa miscigenação, a frequência de indivíduos com o genótipo selvagem, CCR5/CCR5, foi de 93% e a de indivíduos heterozigotos, CCR5/ Δ 32, de 7% (Passos Jr. e Picanco, 1998).

No presente trabalho 100 pacientes com Leishmaniose foram analisados quanto à deleção CCR5 Δ 32, 89% (89/100) foram homozigotos para o alelo selvagem, 10% (10/100) apresentaram o alelo Δ 32 em heterozigose e 1% (01/100) foi homozigoto para o alelo variante, demonstrando similaridade com os dados da população brasileira relatados por Passos Jr. e Picanco (1998).

O alelo selvagem esteve presente em homozigose em 89% dos pacientes, os quais apresentaram lesões localizadas cobertas por uma crosta central. Frequentemente a lesão inicial era pequena e uma lesão ulcerada característica geralmente se desenvolvia. As lesões mucocutâneas, geralmente na membrana mucosa nasal, foram observadas em 22,47% (20/89) destes pacientes e o septo cartilaginoso estava frequentemente perfurado.

Análises *in vitro* têm demonstrado que células de portadores do alelo $\Delta 32$ apresentam uma resposta quimiotática reduzida aos ligantes do CCR5 (Panzer *et al.*, 2005). Uma vez que a resposta imune do tipo Th1 está associada com inflamação, o alelo CCR5/ $\Delta 32$ não funcional resultaria em uma resposta Th1 menos efetiva, levando conseqüentemente a um estado inflamatório menos severo (Chies e Hutz, 2003), pois a leishmaniose cutânea causada pela *L. braziliensis* resulta na ativação de uma resposta imune Th1 altamente específica (Blackwell, 1999; Silveira *et al.*, 2004).

O espectro da leishmaniose tegumentar americana proposto por Silveira *et al.* (2004) baseia-se nas respostas imunes celular e humoral elicítadas pelos parasitas. Dentre os pacientes com genótipo selvagem (22,47% - 20/89) que apresentaram lesões mucocutâneas, todos apresentaram primeiramente uma lesão inicial ulcerada. Tem sido sugerido que através de disseminação hematogênica ou linfática dos parasitas, os pacientes podem desenvolver a forma mucocutânea da leishmaniose ao mesmo tempo em que a lesão cutânea, ou mesmo depois de meses a anos após a cura da lesão cutânea (Martinez *et al.*, 1992; Ministério da Saúde, 2000; Silveira *et al.*, 2004).

Todos os pacientes com leishmaniose apresentaram valores positivos para o teste de Montenegro, pois pacientes infectados com *L. braziliensis* apresentam uma alta prevalência de reações positivas para IDR (Silveira *et al.*, 1998). Sabe-se que uma vez que se torna positivo permanece positivo por toda a vida (Fernandes *et al.*, 2004).

O teste de intradermoreação demonstra uma hipersensibilidade cutânea específica do tipo tardio aos antígenos de leishmania. Foi utilizado pela primeira vez em humanos por Montenegro (1926). Extensamente empregado em estudos epidemiológicos é considerado o método mais prático e seguro para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana nas áreas endêmicas (Barbosa Santos *et al.*, 1998, Jorquera *et al.*, 1998).

No presente trabalho 55% (11/20) dos indivíduos que desenvolveram lesões mucocutâneas só apresentaram a lesão na mucosa nasal após 2,85 (\pm 0,5) anos, e a média do valor do teste de Montenegro nestes pacientes foi de 11,875 (\pm 2,45) mm. Os 45% (09/20) dos pacientes que apresentaram a lesão na mucosa nasal após 16,25 (\pm 4,06) anos apresentaram valores médios para o teste de Montenegro de 25,0 (\pm 2,74) mm. Enquanto que todos os portadores do alelo Δ 32 (10% - 10/100) apresentaram somente a forma cutânea da doença. Estes dados estão de acordo com Silveira *et al.* (2004) e Faria *et al.* (2005) que verificou que pacientes com lesões mucocutâneas apresentam uma resposta imune mediada por células T vigorosa contra *L. braziliensis*. Células mononucleares de sangue periférico de indivíduos que desenvolveram lesões mucocutâneas apresentam valores mais altos de IFN- γ e TNF- α , associados com baixos níveis de IL-10 quando comparados à pacientes que apresentam apenas lesões cutâneas (Faria, *et al.*, 2005).

Os mecanismos da resposta imune na Leishmaniose Tegumentar Americana ainda não estão devidamente esclarecidos, apesar dos inúmeros estudos. No início, a doença pode ser limitada e auto-resolutiva, e posteriormente pode evoluir para leishmaniose mucocutânea.

É possível que os pacientes com lesões mucocutâneas apresentaram uma resposta imune mediada por células T potencializada, e que portadores do alelo Δ 32 tenham apresentado uma resposta mais fraca devido a forma não funcional do CCR5, já que a literatura tem demonstrado que a lesão é ocasionada por citocinas e quimiocinas envolvidas no perfil da resposta imune Th1. Porém, devido ao pequeno número de portadores do alelo Δ 32, mais estudos são necessários para elucidar o papel do CCR5 nas características clínicas da leishmaniose.

6 CONCLUSÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana é, fundamentalmente, uma zoonose de animais silvestres, que pode atingir o homem ao entrar em contato com os focos zoonóticos. Como observado neste trabalho o maior número de acometidos é de adultos com idade entre 20 e 60 anos, do sexo masculino.

Em relação ao título de anticorpos, os pacientes portadores do alelo $\Delta 32$ apresentaram maior título de anticorpos, provavelmente devido a deficiência do perfil Th1, ocasionada pela não funcionalidade do receptor CCR5 proveniente do alelo mutato.

Não houve diferenças significativas nos valores da IDRMM entre os diferentes genótipos nos pacientes com leishmaniose. Os pacientes que apresentaram lesão mucocutânea após 5 anos da lesão inicial apresentaram, em sua maioria, valores de IDRMM superiores a 13mm, possivelmente devido a resposta imune celular mais intensa ou protetora.

Embora os resultados não demonstrem diferença quanto a frequência alélica do CCR5 $\Delta 32$ entre os pacientes com leishmaniose e indivíduos normais, os portadores do alelo $\Delta 32$ apresentaram apenas manifestações cutâneas da leishmaniose, enquanto que indivíduos selvagens para o mesmo alelo apresentaram também lesões mucocutâneas.

REFERÊNCIAS

ABBOUD, I.A., RAGAB, H.A., HANNA, L.S. **Experimental ocular leishmaniasis**. Br J Ophthalmol 54:256-62, 1970.

ALKHATIB, G., COMBADIÈRE, C., BRODER, C.C., FENG, Y., KENNEDY, P.E., MURPHY, P.M., BERGER, E.A. **CCR5: a RANTES, MIP-1 (α), MIP-1 (β) receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic ZHIV-1**. Science 272: 1955-1958, 1996.

ANZALA, A.O.; BALL, T.B.; ROSTRON, T.; O'BRIEN, S.J.; PLUMMER, F.A.; ROWLAND-JONES, S.L. **CCR2-64I allele and genotype association with delayed AIDS progression in African women**. University of Nairobi Collaboration for HIV Research. Lancet, 351(9116):1632-3, 1998.

ARVANITAKIS, L., GERAS-RAAKA, E., VARMA, A., GERSHENGORN, M.C., CESARMAN, E. **Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation**. Nature 385:347-350, 1997.
AWASTHI, A., MATHUR, R.K., SAHA, B. **Immune Response to *Leishmania* infection**. Indian J Med Res, 119:238-258, 2004.

BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO DE JESUS, A.; DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J.; CARVALHO, E.M. **Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients**. Infect Immun. 70(12):6734-40, 2002.

BADARÓ, R.; JONES, T.C.; LOURENÇO, R.; JOHNSON JR, W.D. **A prospective study of visceral *Leishmaniasis* in an endemic area of Brazil**. J.Infect. Dis., 154:639-649, 1986.

BADARÓ, R.; REED, S.G. Leishmaniose. In: FERREIRA, A W.; ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Guanabara Koogan, p. 150-156, 1996.

BAGGIOLINI, M. **Chemokines and leukocyte traffic**. Nature. 392(6676):565-8, 1998.

BAGGIOLINI, M. **Chemokines in pathology and medicine**. Journal of Internal Medicine 250:91-104, 2001.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. **Human chemokines: an update.** Annual Review of Immunology 15:675-705, 1997.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. **Interleukin-8 and related chemotactic cytokines- CXC and CC chemokines.** Adv. Immunol. 55:97-179, 1994.

BALDWIN, E.T.; WEBER, I.T.; ST CHARLES, R.; XUAN, J.C.; APPELLA, E.; YAMADA, M.; MATSUSHIMA, K.; EDWARDS, B.F.; CLORE, G.M.; GRONENBORN, A.M. **Crystal structure of interleukin 8: symbiosis of NMR and crystallography.** Proc Natl Acad Sci USA 88:502-6, 1991.

BARBOSA-SANTOS, E.G.O.; MARZOGHI, M.C.A.; CONCEIÇÃO, N.F.; BRITO, C.M.M.; PACHECO, R.S. **Epidemiological survey on canine population with the use of immunoleish skin test in endemic areas of human american cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil.** Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 40: 41-47. 1998.

BARRAL-NETO, M.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E.M.; BARRAL, A. **Human-leishmaniasis@cytokines.bahia.br.** Braz J Méd Biol Res 31:149-155, 1998.

BAZAN, J.F., BACON, K.B., HARDIMAN, G., WANG, W., SOO, K., ROSSI, D., GREAVES, D.R., ZLOTNIK, A., SCHALL, T.J. **A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C.** Nature 385:640-644, 1997.

BERNARD, E. **Leishmaniose viscérale au cours du syndrome immunodéficientaire acquis.** La Presse Médicale. 17:872, 1988.

BEVERLEY, S.M., TURCO, S.J. **Identification of genes mediating lipophosphoglycan biosynthesis by functional complementation of *Leishmania donovani* mutants.** Ann Trop Med Parasitol 89S: 11, 1995.

BLACKWELL, J.M. **Tumor necrosis factor alpha and mucocutaneous leishmaniasis.** Parasitol Today 15:73-76, 1999.

BLEUL, C.C., FARZAN, M., CHOE, H., PAROLIN, C., CLARK-LEWIS, I., SODROKSI, J., SPRINGER, T.A. **The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry.** Nature 382:829-833, 1996.

BONECCHI, R.; BIANCHI, G.; BORDIGNON, P.P.; D'AMBROSIO, D.; LANG, R.; BORSATTI, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; GRAY, P.A.; MANTOVANI, A.;

SINIGAGLIA, F. **Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s.** J Exp Med 187:129-34, 1998.

BOURREAU, E., GARDON, J., PRADINAUD, R., PASCALIS, H., PRÉVOT, G., KARIMINIA, A., LAUNOIS, P.. **Th2 responses predominate during the early phases of infection in patients with localized cutaneous leishmaniasis and precede the development of Th1 responses.** Infect Immun 71(4):2244-2246. 2003.

BOUSQUET, J., CHANEZ, P., LACOSTE, J.Y., BARNEON, G., GHAVANIAN, N., ENANDER, I., VENGE, P., AHLSTEDT, S., SIMONY-LAFONTAINE, J., GODARD, P. **Eosinophilic inflammation in asthma.** N. Engl. J. Med. 323:1033-1039, 1990.

CACERES-DITTMAR, G.; TAPIA, F.J.; SANCHEZ, M.A.; YAMUARA, M.; UYEMERA, K.; MODLIN, R.L.; BLOOM, B.R.; CONVIT, J. **Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction.** Clin Exp Immunol. 91:500-505, 1993.

CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BARRAL-NETO, M.; BADARÓ, R.; ROCHA, H.; JOHNSON JR., A.J. **Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*.** J Infect Dis, 165:535-540, 1992.

CHANG, H.Y. AHN, S.H.; KIM DO, Y.; SHIN, J.S.; KIM, Y.S.; HONG, S.P.; CHUNG, H.J.; KIM, S.O.; YOO, W.D.; HAN, K.H. **Association between CCR5 Promoter Polymorphisms and Hepatitis B Virus Infection.** Korean J Hepatol. 11(2):116-24, 2005.

CHIES, J.A.; HUTZ, M.H. **High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia.** Braz J Med Biol Res. 36(1):71-5, 2003.

CHOE, H., FARZAN, M., SUN, Y., SULLIVAN, N., ROLLINS, B., PONATH, P.D., WU, L., MACKAY, C.R., LAROSA, G., NEWMAN, W., GERARD, N., GERARD, C., SODROSKI, J. **The (beta)-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates.** Cell, 85:1135-1148, 1996.

CHOLLET-MARTIN, S., MONTRAVERS, P., GIBERT, C., ELBIM, C., DESMONTS, J.M., FAGON, J.Y., GOUGEROT-POCIDALO, M.A. **High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome.** Infect Immun., 61: 4553-4559, 1993.

CHU, F.C., RODRIGUES, M.M., COGAN, D.G., NEVA, F.A. **Leishmaniasis affecting the eyelids.** Arch Ophthalmol 101:84-91. 1983.

CLARK-LEWIS, I., SCHUMACHER, C., BAGGIOLINI, M., MOSER, B.. **Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs: critical role of NH₂-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities.** J. Biol. Chem., 266:23128-23134, 1991.

CLARK-LEWIS, I.; DEWALD, B.; GEISER, T.; MOSER, B.; BAGGIOLINI, M. **Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg.** Proc Natl Acad Sci USA 90:3574-7, 1993.

CLARK-LEWIS, I.; KIM, K.S.; RAJARATHNAM, K.; GONG, J.H.; DEWALD, B.; MOSER, B.; BAGGIOLINI, M.; SYKES, B.D. **Structure-activity relationships of chemokines.** J Leukocyte Biol 57:703-11, 1995.

CLORE, G.M.; APPELLA, E.; YAMADA, M.; MATSUSHIMA, K.; GRONENBORN, A.M. **Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution.** Biochemistry 29:1689-96, 1990.

COCCHI, F., DEVICO, A.L., GARZINO-DEMO, A., ARYA, S.K., GALLO, R.C., LUSSO, P.. **Identification of RANTES, MIP-1(α), and MIP-1 (β) as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells.** Science 270:1811-1815, 1995.

CRUMP, M.P., GONG, J.H., LOETSCHER, P., RAJARATHNAM, K., AMARA, A., ARENZANA-SEISDEDOS, F., VIRILIZIER, J.L.; BAGGIOLINI, M., SYKES, B.D., CLARK-LEWIS, I. **Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor 1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1.** EMBO Journal. 16 (23):6996-7007. 1997.

D'SOUZA M.P.; HARDEN, V.A. **Chemokines and HIV-1 second receptors: confluence of two fields generates optimism in AIDS research.** Nat. Med, 2:1293-1300, 1996.

DEAN, M., CARRINGTON, M., WINKLER, C., HUTTEY, G.A., SMITH, M.S., ALLIKMETS, R., GOEDERT, J.J., BUCHBINDER, S.P., VITTINGHOFF, E., GOMPERTS, E., DONFIELD, S., VLAHOV, D., KASLOW, R., SAAH, A., RINALDO, C., DETELS, R., O'BRIEN, S.J.. **Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by deletion of the CCR5 structural gene: Hemophilia Growth and Development Study Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter**

Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. Science 273:1856-1862, 1996.

DENG, H., LIU, R., ELLMEIER, W., CHOE, S., UNUTMAZ, D., BURKHART, M., DIMARZIO, P., MARMON, S., SUTTON, R.E., HILL, C.M., DAVIS, C.B., PEIPER, S.C., SCHALL, T.J., LITTMAN, D.R., LANDAU, N.R. **Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1.** Nature 381:661-666, 1996.

DESJEUX, P. **Global control and Leishmania HIV co-infection.** Clin. Dermatol. 17:317, 1999.

DESJEUX, P. **Leishmaniasis.** Nature, 2:692, September 2004.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. **Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe.** Ann Trop Med Parasitol. Oct; 97 Suppl 1:3-15, 2003.

DETTIN, M.; SCARINCI, C.; PASQUATO, A., DI BELLO, C. **Synthetic peptides for study of human immunodeficiency virus infection.** Applied Biochemistry & Biotechnology. 102-103 (1-6):41-7, 2002.

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 (β)- chemokine receptors CCR5, CCR3, and CCR-2b as fusion cofactors.** Cell 85:1149-1158, 1996.

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- CCR-5.** Nature 381:667-673, 1996.

FARIA, D.R.; GOLLOB, K.J.; BARBOSA, J. JR; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.R.; LESSA, H.; CARVALHO, L.P.; ROMANO-SILVA, M.A.; DE JESUS, A.R.; CARVALHO, E.M.; DUTRA, W.O. **Decreased In Situ Expression of Interleukin-10 Receptor Is Correlated with the Exacerbated Inflammatory and Cytotoxic Responses Observed in Mucosal Leishmaniasis.** Infect Immun. 73(12):7853-7859, 2005.

FENG, Y., BRODER, C.C., KENNEDY, P.E., BERGER, E.A.. **HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein coupled receptor.** Science 272:872-877, 1996.

FERNANDES, N.C.; MORGAN, I.; MACEIRA, J.P.; CUZZIA, T.; NOE, R.A.M. **American tegumentary leishmaniasis: hospitalized cases in Rio de Janeiro.** An Bras Dermatol, 79(4):431:439, 2004.

FUNASA - **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Organização: Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. - Coordenação de Vigilância Epidemiológica - Centro Nacional de Epidemiologia – Fundação Nacional de Saúde - Ministério da Saúde. Brasília – 2000. p: 7-28.

GARCIA-ZEPEDA, E.A., COMBADIÈRE, C., ROTHENBERG, M.E., SARAFI, M.N., LAVIGNE, F., HAMID, Q., MURPHY, P.M., LUSTER, A.D. **Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokines receptors (CCR)-2 and 3.** J. Immunol. 157:5613-5626, 1996a.

GARCIA-ZEPEDA, E.A., ROTHENBERG, M.E., OWNBEY, R.T., CELESTIN, J., LEDER, P., LUSTER, A.D. **Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cell and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia.** Nat. Med. 4:4459-4456, 1996b.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana.** 10^a ed. Atheneu, Rio de Janeiro, 2000. p. 36-53.

GILLITZER, R., WOLFF, K., TONG, D., MULLER, C., YOSHIMURA, T., HARTMANN, A.A., STINGL, G., BERGER, R. **MCP-1 mRNA expression in basal keratinocytes of psoriatic lesions.** N. Engl. J. Med. 324:954-960, 1991.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. **Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis.** Braz J Med Biol Res, 37:615-623, 2004.

GOTTLIEB, A.B., LUSTER, A.D., POSNETT, D.N., CARTER, D.M. **Detection of a gamma interferon-induced protein IP-10 in psoriatic plaques.** J. Exp. Med. 168:941-948, 1988.

GRIMM, M.C.; DOE, W.F. **Chemokines in inflammatory bowel disease mucosa: expression of RANTES, macrophage inflammatory protein (MIP)-1(α), MIP-1(β), and (gamma) interferon-inducible protein by macrophages, lymphocytes, endothelial cells, and granulomas.** Inflamm. Bowel Dis. 2:88-96, 1996.

HÉBERT, C.A.; VITANGCOL, R.V.; BAKER, J.B. **Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding.** J Biol Chem 266:18989-94, 1991.

HORUK, R., CHITNIS, C.E., DARBONNE, W.C., COLBY, T.J., RYBICKI, A., HADLEY, T.J., MILLER, L. **A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor.** Science 261:1182-1184, 1993.

JORQUERA, A., LEDEZMA, E., SOUZA, L., GARCIA, A., SANCHEZ, J., ZERPA, J., GONZALEZ, R., O'DALY, J.A. **Epidemiologic characterization of american cutaneous leishmaniasis in an endemic region of eastern Venezuela.** Am J Trop Med Hyg 58:589-593, 1998.

KENNEDY, J.; KELNER, G.S.; KLEYENSTEUBER, S.; SCHALL, T.J.; WEISS, M.C.; YSSEL, H.; SCHNEIDER, P.V.; COCKS, B.G.; BACON, K.B.; ZLOTNIK, A. **A molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin.** J Immunol 155:203-9, 1995.

KIM, K.S.; RAJARATHNAM, K.; CLARK-LEWIS, I.; SYKES, B.D. **Structural characterization of a monomeric chemokine: monocyte chemoattractant protein-3.** FEBS Lett 395:277-82, 1996.

KIRBY, L.T. **DNA fingerprinting: An introduction.** Stocton Press. New York, NY. 1990.

LAHRTZ, F., PIALI, L., NADAL, D., PFISTER, H.W., SPANAUS, K.S., BAGGIOLINI, M., FONTANA, A. **Chemokines in viral meningitis: chemotactic cerebrospinal fluid factors include MCP-1 and IP-10 for monocytes and activate T lymphocytes.** Eur. J. Immunol. 27:2484-2489, 1997.

LAPHAM, C.K., OUYANG, J., CHANDRASEKHAR, B., NGUYEN, N.Y., DIMITROV, D.S., GOLDING, H. **Evidence of cell-surface association between fusion and the CD4-gp120 complex in human cell lines.** Science 274:602-605, 1996.

LEBOUTE, A.P.; DE CARVALHO, M.W.; SIMOES, A.L. **Absence of the deltacr5 mutation in indigenous populations of the Brazilian Amazon.** Hum Genet. 105(5):442-3, 1999.

LENSKI, R.E. **Evolution of plague virulence.** Nature, 334, 473, 1988.

LIBERT, F.; COCHAUX, P.; BECHMAN, G.; SAMSON, M.; AKSENOVA, M.; CAO, A.; CZEIZEL, A.; CLAUSTRES, M.; DE LA RUA, C.; FERRARI, M. **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, 1998.

LINDLEY, I.J.D.; WESTWICK, J.; KUNKEL, S.L. **Nomenclature announcement - the chemokines.** Immunol Today 14:24, 1993.

LIU, R., PAXTON, W.A., CHOE, S., CERADINI, D., MARTIN, S.R., HORUK, R., MACDONALD, M.E., STUHLMANN, H., KROUP, R.A., LANDAU, N.R. **Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection.** Cell 86:367-377, 1996.

LODI, P. J., GARRETT, D.S., KUSZEWSKI, J., TSANG, M.L., WEATHERBEE, J.A., LEONARD, W.J., GRONENBORN, A.M., CLORE, G.M. **High-resolution solution structure of the beta chemokine MIP-1 (beta) by multidimensional NMR.** Science 263:1762-1767, 1994.

LOETSCHER, P., SEITZ, M., BAGGIOLINI, M., MOSER, B. **Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes.** J. Exp. Med. 184:569-577, 1996.

LOETSCHER, P.; MOSER, B.; BAGGIOLINI, M. **Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection.** Adv Immunol 74:127-80, 2000.

LOETSCHER, P.; UGUCCIONI, M.; BORDOLI, L.; BAGGIOLINI, M.; MOSER, B.; CHIZZOLINI, C.; DAYER, J.M. **CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes.** Nature. 22;391(6665):344-5. 1998.

LOUZIR, H.L., MELBY, P.C., SALAH, A.B., MARRAKCHI, H., AOUN, K., BEM ISMAIL, R., DELLAGI, K. **Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major.** J. Infect. Dis. 177:1987-1995, 1998.

LUSTER, A.D.; ROTHENBERG, M.E. **Role of the chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation.** J. Leukoc. Biol. 62:620-633, 1997.

MARSDEN, P.D.; JONES, T.C. **Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis.** Elsevier Science Publishers. Amsterdam, The Netherlands. 1985.

MARTINEZ, J.E.; ARIAS, A.L.; ESCOBAR, M.A.; SARAVIA, N.G. **Haemoculture of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from two cases of mucosal leishmaniasis: re-examination of haematogenous dissemination.** Trans R Soc Trop Med Hyg, 86:392-394, 1992.

MARTINSON, J.J.; CHAPMAN, N.H.; REES, D.C.; LIU, Y.T.; CLEGG, J.B. **Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion.** Nat. Genet 16(1):100-03, 1997.

MARTINSON, J.J.; HONG, L.; KARANICOLAS, R.; MOORE, J.P.; KOSTRIKIS, L.G. **Global distribution of the CCR2-64I/CCR5-59653T HIV-1 disease-protective haplotype.** AIDS.14(5):483-9, 2000.

MCNICHOLL, J.M.; SMITH, D.K.; QARI, S.H.; HODGE, T. **Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele.** Emerg Infect Dis. 3(3):261-71, 1997.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. **A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells.** Nucl. Acid Res. 16:1215. 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Controle da Leishmaniose tegumentar americana.** Brasília: Fundação Nacional de Saúde Pública, 2000.

MOMEN, H. **Emerging Infectious Diseases—Brazil.** Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no1/momen.htm>. Acesso em: 10 out. 2004.

MONTENEGRO, J. **Cutaneous reactions in Leishmaniasis.** Arch Dermat & Syph. 13:187, 1926.

MURPHY, P.M. **The molecular biology of leucocyte chemoattractant receptors.** Annu. Rev. Immunol. 12:593-633, 1994.

MURPHY, P.M.; BAGGIOLINI, M.; CHARO, I.F.; HEBERT, C.A.; HORUK. R.; MATSUSHIMA, K.; MILLER, L.H.; OPPENHEIM, J.J.; POWER, C.A. **International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors.** Pharmacol Rev 52:145-76, 2000.

NANKI, T., LIPSKY, P.E. **Stimulation of T-cell activation by CXCL12/SDF-1 involves a G-protein mediated signaling pathway.** Cell Immunol. 214:145-154, 2001.

NELKEN, N.A., COUGHLIN, S.R., GORDON, D., WILCOX, J.N.. **Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques.** J. Clin. Invest., 88:1121-1127, 1991.

O'NEILL D.P., DEUTSCH, J., CARMICHAEL, A.J., TAYLOR, R.; **Eyelid leishmaniasis in a patient with neurogenic ptosis.** Br J Ophthalmol 75:506-507, 1991.

OBERLIN, E., AMARA, A., BACHELERIE, F., BESSIA, C., VIRELIZIER, J.L., ARENZANA-SEISDEDOS, F., SCHWARTZ, O., HEARD, J.M., CLARK-LEWIS, I. **The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1.** Nature 382:833-835, 1996.

O'BRIEN. S.J.; MOORE, J.P. **The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS.** Immunol Rev. 177:99-111, 2000.

OLIVEIRA NETO, M.P., MARTINS, V.J., MATTOS, M.S., PIRMEZ, C., BRAHIN, L.R., BENCHIMOL, E. **South American cutaneous leishmaniasis of the eyelids: report of five cases in Rio de Janeiro State, Brazil.** Ophthalmology 107:169-172, 2000.

PAN, Y.; LLOYD, C.; ZHOU, H.; DOLICH, S.; DEEDS, J.; GONZALO, J.A.; VATH, J.; GOSSELIN, M.; MA, J.; DUSSAULT, B.; WOOLF, E.; ALPERIN, G.; CULPEPPER, J.; GUTIERREZ-RAMOS, J.C.; GEARING, D. **Neurotactin, a membrane anchored chemokine preregulated in brain inflammation.** Nature 387:611-7, 1997.

PANZER, U.; SCHNEIDER, A.; STEINMETZ, O.M.; WENZEL, U.; BARTH, P.; REINKING R.; BECKER, J.U.; HARENDZA, S.; ZAHNER, G.; FISCHEREDER, M.; KRAMER, B.K.; SCHLONDORFF, D.; OSTENDORF, T.; FLOEGE, J.; HELMCHEN, U.; STAHL, R.A. **The chemokine receptor 5 Delta32 mutation is associated with increased renal survival in patients with IgA nephropathy.** Kidney Int. 67(1):75-81, 2005.

PASSOS, G.A. Jr; PICANCO, V.P. **Frequency of the delta ccr5 deletion allele in the urban Brazilian population.** Immunol Lett. 61(2-3):205-7. 1998.

PAXTON, W.A., MARTIN, S.R., TSE, D., O'BRIEN, T.R., SKURNICK, J., VANDEVANTER, N.L., PADIAN, N., BRAUN, J.F., KOTLER, D.P., WOLINSKYM, S.M., KOUP, R.A. **Relative resistance to HIV-1 of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high risk sexual exposure.** Natural Medicine. 2:412-417, 1996.

PINTADO, V.; MARTIN-RABADAN, P. **Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected and Non-HIV-infected Patients.** Medicine. 80:54-73, 2001.

POSER, C.M. **The dissemination of multiple sclerosis a Viking saga. A historical essay.** *Annals of Neurology*, 36, 231, 1994.

PROOST, P.; WUYTS, A.; VAN DAMME, J. **The role of chemokines in inflammation.** *Int J Clin Lab Res*. 26(4):211-23, 1996.

REED, S.G.; SCOTT, P.A. **T-cell and cytokine responses in leishmaniosis.** *Curr. Opin. Immunol.* 5:524-531, 1993.

REINECKER, H-C.; LOH, E.Y., RINGLER, D.J., MEHTA, A., ROMBEAU, J.L., MACDERMOTT, R.P. **Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa.** *Gastroenterology* 108:40-50, 1995.

REINER S.L., LOCKSLEY R.M. **The regulation of immunity to *Leishmania major*.** *Annu Rev Immunol* 13:151, 1995.

RITTER, U., KORNER, H. **Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniosis.** *Parasite Immunol.* 24 (6): 295-301, 2002.

ROIZENBLATT J. **Interstitial keratitis caused by american (mucocutaneous) Leishmaniasis.** *Am J Ophthalmol* 87:175-9, 1979.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A.; MACKAY, C.R. **Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses.** *Immunol Today* 19:568-74, 1998a.

SALLUSTO, F.; LENIG, D.; MACKAY, C.R.; LANZAVECCHIA, A. **Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes.** *J Exp Med* 187:875-83, 1998b.

SALLUSTO, F.; MACKAY, C.R.; LANZAVECCHIA, A. **The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses.** *Annu Rev Immunol* 18:593-620, 2000.

SAMSON, M., LIBERT, F., DORANZ, B.J., RUCKER, J., LIESNARD, C., FARBER, C.M., SARAGOSTI, S., LAPOMEROULIE, 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 332:722-725, 1996.

SAMUELSON, J., Doenças Infecciosas. In: COTRAN, R., KUMAR, V., ROBBINS, S. **Patologia Estrutural e Funcional.** 6^a ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 2001.

SIDOTI, A.; D'ANGELO, R.; RINALDI, C.; DE LUCA, G.; PINO, F.; SALPIETRO, C.; GIUNTA, D.E.; SALTALAMACCHIA, F.; AMATO, A. **Distribution of the mutated delta32 allele of the CCR5 gene in a Sicilian population.** Int J Immunogenet. 32(3):193-8, 2005.

SILVEIRA, F.T.; BLACKWELL, J.M.; ISHIKAWA, E.A.; BRAGA, R.R.; SHAW, J.J.; QUINNELL, R.J.; SOONG, L.; KIMA, P.; MCMAHON-PRAT, D.; BLACK, G.F.; SHAW, M.A. **T cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from the lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia*.** Parasite Immunol, 20:19-26, 1998.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. **Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 99(3):239-251, 2004.

SMITH, M.W.; DEAN, M.; CARRINGTON, M.; WINKLER, C.; HUTTLEY, G.A.; LOMB, D.A.; GOEDERT, J.J.; O'BRIEN, T.R. **Contrasting influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV infection and disease progression.** Science 277:959-965, 1997.

SOUZA, A.R., LANE, S.J., NAKAHOSTEEN, J.A., YOSHIMURA, T., LEE, T.H., POSTON, R.N. **Increases expression of the monocyte chemoattractant protein-1 in bronchial tissue from asthmatic subjects.** Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.10:142-147, 1994.

SPAGNOLO, P.; RENZONI, E.A.; WELLS, A.U.; COPLEY, S.J.; DESAI, S.R.; SATO, H.; GRUTTERS, J.C.; ABDALLAH, A.; TAEGTMEYER, A.; DU BOIS, R.M.; WELSH, K.I. **C-C Chemokine Receptor 5 Gene Variants in Relation to Lung Disease in Sarcoidosis.** Am J Respir Crit Care Med. Jun 23. 2005.

SPRINGER, T.A. **Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.** Cell 76:301-314, 1994.

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.; ODDOUX, C.; DI GIOVINE, F.S.; NASIOULAS, G.; CHANDLER, D.; ASEEV, M.; HANSON, M.; KALAYDJIEVA, L.; GLAVAC, D.; GASPARINI, P.; KANAVAKIS, E.; CLAUSTRES, M.; KAMBOURIS, M.; OSTRER, H.; DUFF, G.; BARANOV, V.; SIBUL, H.; METSPALU, A.; GOLDMAN, D.; MARTIN, N.; DUFFY, D.; SCHMIDTKE, J.; ESTIVILL, X.; O'BRIEN, S.J.; DEAN, M. **Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes.** Am J Hum Genet. 62(6):1507-15, 1998.

THELEN M. **Dancing to the tune of chemokines.** Nature Immunol 2:129-34, 2001.
THELEN, M.; PEVERI, P.; KERNEN, P.; VON TSCHARNER, V.; WALZ, A. BAGGIOLINI, M. **Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist.** FASEB J 2:2702-6, 1988.

TITUS, R.G., RIBEIRO, J.M.C. **Salivary gland lysates from the sandfly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity.** Science 239:1306, 1988.

TRKOLA, A., DRAGIC, T., ARTHOS, J., BINLEY, J.M., OLSON, W.C., ALLAWAY, G.P., CHENG-MAYER, C., ROBINSON, J., MADDON, P.J., MOORE, J.P. **CD-4 dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its correceptor CCR-5.** Nature 384:184-187, 1996.

VALLI, L.C.P.; PASSOS, V.M.A.; DIETZE, R. CALLAHAN H.L. **Humoral immune responses among mucosal and cutaneous leishmaniasis patients caused by *Leishmania braziliensis*.** J Parasitol 85:1076-83, 1999.

WANG, F.S.; HONG, W.G.; CAO, Y.; LIU, M.X.; JIN, L.; HU, L.P.; WANG, Z.; FENG, T.J.; HOU, J.; ZHANG, B.; SHI, M.; XU, D.P.; LEI, Z.Y.; WANG, B.; LIU, Z.D.; YE, J.J.; PENG, L.; QIU, Y.; WINKLER, C. **Population survey of CCR5 delta32, CCR5 m303, CCR2b 64I, and SDF1 3'A allele frequencies in indigenous Chinese healthy individuals, and in HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals in HIV-1 risk groups.** J Acquir Immune Defic Syndr. 32(2):124-30, 2003.

WHO. Disponível em:
http://www.who.int/tdr/publications/publications/insect_vectors.htm. Acesso em: 05 out. 2004.

WHO. **Weekly Epidemiological Record.** 77:365-370, 2002.

WHO. **TDR diseases – Leishmaniasis.** 2004. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm>. Acesso em 01.12.2005.

WOLDAY, D. ***Leishmania* and HIV-1 Interaction. Immunopathogenic mechanisms.** Microbiology and Tumor Biology Center. Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. 2000.

WU, L., GERARD, N.P., WYATT, R., CHOE, H., PAROLIN, C., RUFFING, N., BORSETTI, A., CARDOSO, A.A., DESJARDIN, E., NEWMAN, W., GERARD, C., SODROSKI, J., **CD-4- induced interaction of primary HIV-1 gp 120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR5.** Nature 384:184-187, 1996.

YANG, X.; AHMAD, T.; GOGUS, F.; VERITY, D.; WALLACE, G.R.; MADANAT, W.; KANAWATI, C.A.; STANFORD, M.R.; FORTUNE, F.; JEWELL, D.P.; MARSHALL, S.E. **Analysis of the CC chemokine receptor (CCR5) Delta32 polymorphism in Behcet's disease.** Eur J Immunogenet, 31(1):11-14, 2004.

YING, S., TABORDA-BARATA, L., MENG, Q., HUMBERT, M., KAY, A.B.. **The kinetics of allergen-induced transcription of messenger RNA for monocyte chemoattractant protein-3 and RANTES in the skin of human atopic subjects: relationship to eosinophil, T cell, and macrophage recruitment.** J. Exp. Med. 181: 2153-2159, 1995.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. **The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites.** Annu Rev Microbiol 48: 449, 1994.

ZIMMERMAN, P.A.; BUCKLER-WHITE, A.; ALKHATIB, G.; SPALDING, T.; KUBOFCIK, J.; COMBADIERI, C.; WEISSMAN, D.; COHEN, O.; RUBBERT, A.; LAM, G.; VACCAREZZA, M.; KENNEDY, P.E.; KUMARASWAMI, V.; GIORGI, J.V.; DETELS, R.; HUNER, 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 12:121-7, 2000.

ZUNIGA, J.A.; VILLARREAL-GARZA, C.; QUIROZ-MORALES, V.; FLORES, E.; VARGAS-ALARCÓN, G.; GRANADOS, J.; REYES-TERÁN, G. **Biological relevance of the polymorphism in the CCR5 gene in diseased and healthy Mexican individuals.** Clin Exp Rheumatol. 21(3):351-4, 2003.

ANEXOS

ANEXO 1
ANALYSIS OF THE CC CHEMOKINE RECEPTOR 5 (CCR5) DELTA32
POLYMORPHISM IN A BRAZILIAN POPULATION WITH
CUTANEOUS LEISHMANIASIS

ANEXO 1 – ANALYSIS OF THE CC CHEMOKINE RECEPTOR 5 (CCR5) DELTA32 POLYMORPHISM IN A BRAZILIAN POPULATION WITH CUTANEOUS LEISHMANIASIS

Karen Brajão de Oliveira (MS), Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Center, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil.

Edna Maria Vissoci Reiche, (MD) Department of Pathology, Clinical Analysis, and Toxicology; Health Sciences Center, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil.

Helena Morimoto, (MD) Department of Pathology, Clinical Analysis, and Toxicology; Health Sciences Center, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil.

Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, (PhD) Department of Biology, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

Dirceu Estevão, (MD) Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Center, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil.

Rubens Pontello, (M) Department of Pathology, Clinical Analysis, and Toxicology, Department of Dermatology, Health Sciences Center, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil

Thiago Franco Nasser, Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Center, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil.

Maria Angelica Ehara Watanabe (PhD) Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Center, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil.

Address for correspondence: Profa Dra Maria Angelica Ehara Watanabe (PhD), Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário – CEP 86051-970 – Londrina, PR, Brasil.

E-mail: maewat@uel.br
maewat@sercomtel.com.br

ABSTRACT

Patients with mucocutaneous leishmaniasis show a vigorous T cell immune response against *L. braziliensis*. Since the Th response is associated with inflammation the non-functional CCR5 may relies in a less severe inflammatory state. The aim of this study was to investigate the CCR5 gene in a Brazilian population with leishmaniasis compared with healthy control subjects and to determine the progression from cutaneous to mucocutaneous leishmaniasis in the $\Delta 32$ allele carriers. Among 100 patients with Montenegro skin test and indirect immunofluorescence assay values positive for leishmaniasis, there were 32% women and 68% men. The patients were 89% CCR5/CCR5, 10% CCR5/ $\Delta 32$ and 1% $\Delta 32/\Delta 32$, while healthy subjects showed a 91% incidence of CCR5/CCR5, 8% of CCR5/ $\Delta 32$ and 1% of $\Delta 32/\Delta 32$. The CCR5/CCR5 patients (89%) showed a large spectrum of clinical manifestations, where 22.47% had active mucous lesions and 77.53% had cutaneous lesions. In this work, the $\Delta 32$ allele carriers (10%) showed only cutaneous manifestations when compared to wild-type individuals. Finally, with regard to the $\Delta 32$ allele carriers, a less severe spectrum of clinical manifestations was observed, in comparison to wild-type individuals. Although a lack of mucocutaneous lesions was evident among $\Delta 32$ allele carriers, the number of individuals studied was small. Therefore, further investigations are needed to elucidate the role of CCR5 in the clinical aspects of leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis, CCR5, Montenegro skin Test

Introduction

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a parasitic protozoal disease, which is widespread in most countries of Latin America and caused by different species of the genus *Leishmania* (01). It is considered endemic in 88 countries (02). *Leishmania braziliensis* is regarded as the most important parasite associated with localized cutaneous leishmaniasis in the Americas (03), and as the most frequent and widely distributed *Leishmania* parasite in Brazil (04).

ACL, conventionally known as localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and / or mucocutaneous leishmaniasis (MCL), develops a large spectrum of clinical forms of disease (05). The cutaneous disease is characterized by single or multiple localized lesions on exposed areas of skin that typically ulcerate. The incubation period ranges from two to six weeks. Mucocutaneous leishmaniasis typically involves several lesions that undergo extensive ulcerations, and after months to years, metastatic lesions appear in the nasopharynx; nasal obstruction and epistaxis are frequent presenting symptoms (06).

The spectrum of clinical and immunopathological manifestations of ACL has been the subject of many investigations in an attempt to fully understand the host immune mechanisms that play a crucial role in the pathogenesis of the disease (01). Macrophages are proposed primary host cells for *Leishmania*, but the role of these cells has not been well

characterized, neither in disease prevention nor in disease progression independent of T-cells (07).

It is known that chemokines are important determinants of the early inflammatory response (08, 09, 10). Physiologically, chemokine receptors mediate the chemotaxis of T-cells and phagocytes to areas of inflammation (11).

The CCR5 gene product is a member of the seven-transmembrane G-protein-coupled receptor family which responds to normal beta-chemokine ligands, and is involved in the chemotaxis of leukocytes towards inflammation sites (12, 13). A mutant allele of the beta-chemokine receptor gene CCR5 bearing a 32-bp deletion in the region corresponding to the second extracellular loop of CCR5 (denoted as delta CCR5 or CCR5 Δ 32), which prevents cell invasion by the primary transmitting strain of HIV-1, has been characterized (14, 15, 16, 17).

CCR5 is present only in certain cell types, specifically, lymphocytes, dendritic cells and macrophages (18). The CCR5 Δ 32 variant results in a non-functional form of the chemokine receptor which is incapable of binding beta chemokines (RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta). CCR5 Δ 32 causes significant defects in the chemotaxis mediated by these ligands, and it has been implicated in a variety of immune-mediated diseases (19, 10).

Renal transplant recipients homozygous for the deletion have been observed to survive significantly longer than those heterozygous or homozygous for the wild-type allele (20). Several studies maintain that the CCR5 Δ 32 deletion could be associated with resistance to HIV-infection and confers protection against asthma, rheumatoid arthritis (RA), multiple sclerosis, and renal allograft rejection among Caucasians. Considerable variation in the global distribution of CCR5 Δ 32 has been observed. Heterozygosity and homozygosity for CCR5 Δ 32 occurs in about 10-15% and 1% of the Caucasoid ethnic group, respectively (21).

Patients with mucocutaneous leishmaniasis display severe inflammatory state associated with Th1 immune response. The non-functional CCR5 Δ 32 allele can lead to a less severe immune response. In this study we investigated the CCR5 Δ 32 gene in a Brazilian population with leishmaniasis compared to healthy control subjects, and examined the progression of cutaneous to mucocutaneous lesions in the Δ 32 allele carriers.

Materials and Methods

Samples: Following approval from the Human Ethics Committee of Londrina State University, we studied 100 Brazilian patients with positive diagnosis for cutaneous leishmaniasis, who were seen at Londrina State University Clinical Hospital, and 100 healthy control subjects.

Sample selection: The samples consisted of 5mL of peripheral blood drawn with EDTA as anticoagulant. Leishmaniasis diagnosis was confirmed by indirect immunofluorescence assay (IIF) and Montenegro skin test.

Indirect immunofluorescence assay: This test was performed according to the standards used by Londrina State University Clinical Hospital. The titers of antibodies against *Leishmania* were measured using inactivated *Leishmania brasiliensis* promastigotes, 10⁶ *Leishmania*/mL of the reference strain OMS-MHOM/BR/75/M2903, in buffered saline, pH 7.2, fixed on commercially available slides (CPPI-Centro Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, Secretaria de Estado da Saúde, Curitiba, Brazil) and fluorescein-conjugated goat anti-human IgG (Biolab Merieux, Rio de Janeiro, Brazil) as a second antibody at an initial serum dilution of 1:20. Slides were read using a Nikon immunofluorescence microscope, 40X. A serum sample was considered reactive when the titer value was $\geq 1:20$. Positive and negative controls were included in each slide.

Montenegro skin test: the Montenegro skin test was performed using commercially available antigens of *Leishmania brasiliensis* promastigotes (CPPI-Centro Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, Secretaria de Estado da Saúde, Curitiba, Brazil). The reactions were performed by intradermal injection of 0.1mL antigen into the patients' forearms. The test was read 48-72 h later and induration ≥ 5 mm in diameter was considered positive.

DNA extraction: Genomic DNA was isolated from peripheral blood cells using the technique described by Kirby (1990) (22). DNA was extracted from whole

blood in the presence of 0.2M NaCl and 0.25% SDS, for 4h at 37°C. After precipitation with ethanol, the pellet was dried and resuspended in 50µL of milli Q water.

DNA amplification of CCR5 - Polymerase chain reaction: DNA was analyzed using PCR with specific primers for CCR5: CCR5.1 (sense, 5'- ACC AGA TCT CAA AAA GAA -3') and CCR5.2 (antisense, 5'- CAT GAT GGT GAA GAT AAG CCT CA -3'), GenBank Accession: AF009962.

Samples were amplified using the kit buffer plus 1.5mmol/l Taq polymerase (Invitrogen, Life Technologies, USA). PCR procedure was 5 min denaturation at 94°C, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 58°C and 1 min at 72°C, and 10 min elongation at 72°C, carried out in a thermocycler (PCR-Sprint Hybaid). All DNA amplification reactions were performed with appropriate negative controls in parallel to detect contamination at each step of the procedure. PCR products of 225 and 193 base pairs were analyzed by electrophoresis in a 3% agarose gel and visualized using UV fluorescence after staining with ethidium bromide.

Statistical analysis: The $\Delta 32$ allele frequency was calculated as: $[1 \times (h + 2H)] / 2N$, where h represents the heterozygous genotype, H the homozygous genotype and N the sample size for each population. Genotype data were analyzed by the chi-square (χ^2) test with the level of significance set at $p < 0.05$. Demographic characteristics were evaluated by the t-test, Microanal Origin™ 4.1.

Results

In the present investigation, 100 patients (32 women and 68 men) aged 3 – 80 years with ACL, most infected in North Parana State, were studied. Diagnosis of the disease was based on clinical criteria, indirect immunofluorescence assay (IIF) and Montenegro skin test.

The heterogeneous age distribution between genders is shown in Table 1, and it can be noted that there were more men than women aged 21-60 years old, showing a significant difference ($p < 0.05$).

The titers for IIF were higher than 1:20 (median 1:160) in all samples of leishmaniasis patients, who also showed a positive Montenegro skin test ($\geq 5\text{mm}$) (median, 15mm; mean \pm S.E., 16.60 ± 0.83).

Table1. Demographic characteristics of leishmaniasis patients.

Age (years)	Gender (n)		Total
	Female	Male	
03 - 10	04	06	10
11 – 20	05	08	13
21 – 60	16*	42*	58*
> 60	07	12	19
Total	32	68	100

* P<0.05

Since the Brazilian population has a heterogeneous ethnic origin, Table 2 shows a breakdown of genotypes, wild-type (CCR5/CCR5) and $\Delta 32$ allele frequencies, in a group of 100 Brazilian patients with leishmaniasis and 100 healthy control subjects. The populations examined did not show a significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium.

Table 2. Genotypic and allelic frequencies for the $\Delta 32$ and wt alleles of CCR5 in leishmaniasis patients in Brazil.

Study subjects	Number of samples	Genotype (n) ^a			Allelic frequency ^b	
		CCR5/CCR5	CCR5/ $\Delta 32$	$\Delta 32/\Delta 32$	wt	$\Delta 32$
Leishmaniasis patients	100 *	89	10	01	0.94	0.06
Healthy subjects	100 **	91	08	01	0.95	0.05

* χ^2 in HWE = 1.2876 1 degree of freedom

p>0.05

** χ^2 in HWE = 2.493 1 degree of freedom

p>0.05

^a Leishmaniasis patients x Healthy subjects

$\chi^2 = 0.244$ (2 degrees of freedom; p>0.05)

^b Leishmaniasis patients x Healthy subjects

$\chi^2 = 0.288$ (1 degree of freedom; p>0.05)

The frequencies of these alleles did not show a significant difference between leishmaniasis patients and healthy control subjects (p>0.05).

A total of 89 (89%) wild-type individuals (CCR5/CCR5) had a single localized lesion; there was a small initial lesion which was erythematous, solid, elevated and covered by a central crust, which in some patients developed into an ulcerated lesion with a very characteristic raised border and granular base. In this latter group, 22.47% (20/89) presented with mucocutaneous lesions in the nasal mucous membranes and perforation of the nasal cartilaginous septum, where coryza and epistaxis were also present. Among the $\Delta 32$ carriers 10% (10/100), just the cutaneous form was observed showing an ulcerated and erythematous lesion with a central crust and granular base (Table 3).

Table 3. Clinical aspects in accordance to the patient's genotype.

Clinical Aspects	Genotype	
	CCR5/CCR5	$\Delta 32$ carriers
Cutaneous Lesions	69	11
Mucocutaneous Lesions	20	00
Total	89	11

Fisher exact teste: $p = 0.074$

All of the CCR5/CCR5 patients who showed lesions in their nasal cartilaginous septum (22.47%, 20/89) had an ulcerated lesion as the first sign of disease. Among these patients, 55% (11/20) showed the lesion in the nasal mucosa only after 2.85 (± 0.5) years, and the mean for the Montenegro skin

test in these patients was 11.87 (\pm 2.45) mm. The 45% (09/20) patients who developed the nasal mucosa lesion 16.25 (\pm 4.06) years later had a mean Montenegro skin test of 25.0 (\pm 2.74) mm.

Discussion

The incidence of cutaneous leishmaniasis (CL) in Brazil increased from 21,800 cases in 1998 to 60,000 in 2003 (23). Increases have been mainly attributed to behavioral and environmental changes, promoting the development of new settlements, intrusion into primary forest, deforestations, massive migration from rural to urban areas, fast and unplanned urbanization, and the building of dams and new irrigation schemes (24).

We demonstrated that men aged 21 – 60 years are more accomplished than women at the same age ($p < 0.05$), what may be explained by men exposition to rural work, although there are data showing a change in this pattern, with accomplishment of persons from both genders and different ages (25). Fernandes et al. (2004) (26) also observed that there was no significant difference in the age distribution between sexes.

With regard to the immunology of ACL, investigations have principally examined the profile of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets, and the cytokines produced by these cells in the lesions of patients. Although peripheral T-cell responses in human leishmaniasis involve a mixture of Th1 and Th2 cells (27), the Th responses elicited at the lesion site are not yet fully elucidated. In ACL caused by *L. braziliensis*, Th1 cytokines predominate over Th2 cytokines (28, 29).

It is known that chemokines have the potential to stimulate T-cell activation, although the pattern of activation may differ for different chemokine – chemokine receptor interactions (30). Chemokine receptor 5 (CCR5) plays an important role in the recruitment of macrophages, monocytes and T-cells in inflammation (31, 32), driving an immune response involving a Th1 cytokine pattern (18). The CCR5 Δ 32 deletion may alter the expression or the function of the protein product (33).

In the Brazilian urban population, which is characterized by intense ethnic admixture, the frequency of normal CCR5/CCR5 homozygous individuals was found to be 93% and 7% for the frequency of CCR5/ Δ 32 heterozygous individuals (34).

In this work, the examination of 100 leishmaniasis patients for CCR5 Δ 32 deletion showed that 89% (89/100) were homozygotes for the wild allele, 10% (10/100) carried the Δ 32 allele in the heterozygous state and 1% (01/100) were homozygotes for the variant allele.

The wild-type allele was present in the homozygous state in 89% of the patient group, who displayed a single localized lesion covered by a central crust, the initial lesion was often small, and a very characteristic ulcerated lesion usually developed afterwards. Mucocutaneous lesions, generally in the nasal mucous membranes, were observed in 22.47% (20/89) of these patients, and the cartilaginous septum was frequently perforated.

It has been demonstrated that *in vitro* analysis of monocytes from $\Delta 32$ carriers showed a reduced chemotactic response to CCR5 ligands (31). Since Th1 immune response is associated with inflammation, therefore the non-functional CCR5 $\Delta 32$ allele relies in less effective Th1 responses, once CCR5 molecule is normally expressed in macrophages, T lymphocytes and dendritic cells, driving a Th1 immune response (35, 18).

The proposed spectrum of ACL is based on the subsequent cellular and humoral immune responses elicited by these parasites. Among the wild-type patients (22.47%, 20/89) who displayed mucosal lesions, all of them presented with an ulcerated lesion at first. It has been suggested that a hematogenic or lymphatic dissemination of the parasite in patients could lead to the mucocutaneous form of leishmaniasis (36, 37) at the same time as cutaneous lesions or months to years after initial lesions have healed (01).

All of our leishmaniasis patients had positive values for the Montenegro skin test. It is known that once it is positive it remains positive for life (26). In the present work 55% (11/20) patients showed the lesion in the nasal mucosa only

after 2.85 (\pm 0.5) years, and the mean for the Montenegro skin test in these patients was 11.87 (\pm 2.45) mm. The 45% (9/20) patients who developed the nasal mucosa lesion 16.25 (\pm 4.06) years later had a mean value for the Montenegro skin test of 25.0 (\pm 2.74) mm. On the other hand, all of the Δ 32 allele carriers (10%, 10/100) displayed only the cutaneous form of leishmaniasis.

This is in accordance with Silveira et al. (2004) (01) who verified the fact that mucocutaneous patients show a vigorous T-cell immune response against *L. braziliensis*. It is known that CCR5 ligands (CCL3/MIP-2, CCL4/MIP-1 β , and CCL5/RANTES) are involved in the development of Th1 cells (38). Mucocutaneous leishmaniasis is a disease associated with a strong Th1 immune response to Leishmania antigen. Bacellar et al. (2002) (39) offer evidence that CD4⁺ Th1 type cells are responsible for the exaggerated production of antigen – specific TNF- α and IFN- γ , and this response is poorly regulated by IL-10 and TGF- β . Faria et al. (2005) (40) have demonstrated that decreased *in situ* expression of IL-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis.

The exact pathogenic mechanism of mucocutaneous leishmaniasis has not been elucidated. It has been suggested that mucocutaneous leishmaniasis may represent a polar hypersensitivity reaction to leishmania infection (41).

Recently it has been proposed that *Leishmania major* modulates chemokines and its receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity (42).

It is possible that patients with mucocutaneous lesions showed a stronger T-cell response and that delta32 carriers could have had a weaker response and migratory capacity due to the non-functional form of the chemokine receptor. Because there is small number of $\Delta 32$ allele carriers examined, further studies are needed to clarify the role of CCR5 in the clinical features of leishmaniasis.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, and Karen Brajão de Oliveira received a fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES) and Coordenadoria de Pós-Graduação - Londrina State University- CPG-UEL. We also thank Dr. A. Leyva for English language editing of the manuscript.

References

- (01) Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99(3):239.
- (02) WHO. Weekly Epidemiological Record 2002; 77:365.
- (03) Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, eds. The Leishmaniases in Biology and Medicine. London: Academic Press, 1987; 01.
- (04) Coutinho SG, Da-Cruz AM, Bertho AL, Santiago MA, De-Luca P. Immunologic patterns associated with cure in human american cutaneous leishmaniasis. Braz J Med Biol Res 1998; 31:139.
- (05) Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis – The Neotropical Leishmania Species. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D, eds. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. London: Arnold, 1998; 242.
- (06) Herwaldt BL, Arana BA, Navin TR. The natural history of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. J Infect Dis 1992; 165:518.
- (07) Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune Response to *Leishmania* infection. Indian J Med Res 2004; 119:238.
- (08) Murphy PM. The Molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. Annu.Rev Immunology 1994; 12:593.
- (09) Samson M, Labbe O, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. Biochemistry 1996; 35:3362.
- (10) Yang X, Ahmad T, Gogus F, et al. Analysis of the CC chemokine receptor (CCR5) Delta32 polymorphism in Behcet's disease. Eur J Immunogenet 2004; 31:11.
- (11) Horuk R. Molecular properties of the chemokine receptor family. Trends Pharmacol Sci 1994; 15:159.
- (12) Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. Nature 1998; 392(6676):565.

- (13) Proost P, Wuyts A, van Damme J. The role of chemokines in inflammation. *Int J Clin Lab Res* 1996; 26(4):211.
- (14) Liu R, Paxton WA, Choe S, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86:367.
- (15) Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat. Genet* 1997; 16(1):100.
- (16) Biti R, French R, Young J, Bennets B, Stewart G, Liang T. HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat Med* 1997; 3:252.
- (17) Theodorou I, Meyer L, Magierowska M, Katlama C, Rouzioux C and SeroCo Study Group. HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR5delta32: SeroCo Study Group. *Lancet* 1997; 349:1219.
- (18) Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391(6665):344.
- (19) Smith MW, Dean M, Carrington M, et al. Contrasting influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV infection and disease progression. *Science* 1997; 277:959.
- (20) Fildes JE, Walker AH, Howlett R, et al. Donor CCR5 Delta32 polymorphism and outcome following cardiac transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37(5):2247.
- (21) Zuniga JA, Villarreal-Garza C, Quiroz-Morales V, et al. Biological relevance of the polymorphism in the CCR5 gene in diseased and healthy Mexican individuals. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21(3):351.
- (22). Kirby LT. DNA fingerprinting: an introduction. New York: Stocton Press, 1990.
- (23) Desjeux P. Leishmaniasis. *Nature* 2004, 2:692.
- (24) Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97(suppl 1):3.
- (25) WHO TDR diseases – Leishmaniasis. 2004. In: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm>

- (26) Fernandes NC, Morgan I, Maceira JP, Cuzzia T, Noe RAM. American tegumentary leishmaniasis: hospitalized cases in Rio de Janeiro. *An Bras Dermatol* 2004; 79(4):431.
- (27) Reed SG, Scott PA. T-cell and cytokine responses in leishmaniosis. *Curr Opin Immunol* 1993; 5:524.
- (28) Caceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sanchez MA, et al. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* 1993; 91:500.
- (29) Louzir HL, Melby PC, Salah AB, et al. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *J Infect Dis* 1998; 177:1987.
- (30) Nanki T, Lipsky PE. Stimulation of T-cell activation by CXCL12/SDF-1 involves a G-protein mediated signaling pathway. *Cell Immunol* 2001; 214:145.
- (31) Panzer U, Schneider A, Steinmetz OM, et al. The chemokine receptor 5 Delta32 mutation is associated with increased renal survival in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int* 2005; 67:75.
- (32) Spagnolo P, Renzoni EA, Wells AU, et al. C-C Chemokine Receptor 5 Gene Variants in Relation to Lung Disease in Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(6):721.
- (33) Sidoti A, D'Angelo R, Rinaldi C, et al. Distribution of the mutated delta32 allele of the CCR5 gene in a Sicilian population. *Int J Immunogenet* 2005; 32(3):193.
- (34) Passos GA Jr, Picanco VP. Frequency of the delta ccr5 deletion allele in the urban Brazilian population. *Immunol Lett* 1998; 61(2-3):205.
- (35) Chies JA, Hutz MH. High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36:71.
- (36) Martinez JE, Arias AL, Escobar MA, Saravia NG. Haemoculture of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from two cases of mucosal leishmaniasis: re-examination of haematogenous dissemination. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86:392.
- (37) Ministério da Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose tegumentar americana. Brasília: Fundação Nacional de Saúde Pública, 2000.

- (38) Ji J, Sun J, Soon L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* 2003; 71(8):7278.
- (39) Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 2002; 70(12):6734.
- (40) Faria DR, Gollob KJ, Barbosa JJr, et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun* 2005; 73(12):7853.
- (41) Azulay RD, Azulay Jr DR. Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis. *Int J Dermatol* 1995; 34:303.
- (42) Steigerwald M, Moll H. *Leishmania major* modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity. *Infect Immun* 2005; 73(4):2564.

ANEXO 2

**ENVOLVIMENTO DAS QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES NA
PATOGENESE DE DOENÇAS INFECCIOSAS E INFLAMATÓRIAS**

ANEXO 2 – ENVOLVIMENTO DAS QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES NA PATOGÊNESE DE DOENÇAS INFECCIOSAS E INFLAMATÓRIAS

INVOLVEMENT OF CHEMOKINES AND ITS RECEPTORS IN THE PATHOGENESIS OF INFECCIOUS AND INFLAMMATORY DISEASES

Karen Brajão de Oliveira

Biomédica pela Universidade Estadual de Londrina

Mestre pelo Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental pela Universidade Estadual de Londrina.

Endereço para Correspondência: **Karen Brajão de Oliveira (M)**, Laboratório de Imunologia - Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário - CEP 86051-970 - Londrina, PR, Brasil.

Telefone / fax: (043) 3371-5728

e-mail: kagi@sercomtel.com.br

Revisão de Literatura.

Karen Brajão de Oliveira¹, Thiago Franco Nasser², Carlos Eduardo Coral de Oliveira¹, Júlio César Voltarelli³, Sueli Donizete Borelli⁴; Jair Tonon¹, Edna Maria Vissoci Reiche⁵ Maria Angelica Ehara Watanabe⁶

RESUMO

¹ M - Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

² Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

³ MD, PhD - Departamento de Clínica Médica, FMRP – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

⁴ MD, PhD – Departamento de Análises Clínicas – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

⁵ MD – Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

⁶ MD, PhD - Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

A migração dos leucócitos é essencial à resposta inflamatória e à resposta do hospedeiro frente ao processo infeccioso e este processo é controlado por quimiocinas, as quais são citocinas quimiotáticas e têm assumido um papel central na patofisiologia de várias doenças e mostrado seu potencial como alvo terapêutico. Poucos campos de estudo da Biologia Molecular e Imunologia sofreram revolução tão acentuada quanto o campo das quimiocinas e sua fundamental importância na patofisiologia humana. Desta forma, pretendemos abordar, nesta revisão, áreas básicas como a estrutura das quimiocinas, nomenclatura, receptores, mecanismo de ação, bem como seu envolvimento na regulação do sistema imunológico, em processos infecciosos e inflamatórios. Portanto, esta revisão tem como objetivo apresentar os aspectos gerais do envolvimento das quimiocinas na patogênese das doenças inflamatórias e infecciosas.

Palavras-chave: Quimiocinas, doenças inflamatórias, doenças infecciosas.

ABSTRACT

The migration of leucocytes to tissues is essential for inflammation and the host response to infection and this process is controlled by chemokines, which are chemotactic cytokines and have displayed a central role in the pathophysiology of many diseases and have shown their potential as targets for therapy. The field of chemokines and its role in human pathophysiology was one that mostly evolved in Molecular Biology and Immunology. Thus, in this review we discuss the basics of chemokine structures, nomenclature, chemokine receptors, mechanisms of action, as well as the involvement of chemokines in the regulation of immune system in inflammatory and infectious diseases.. Therefore this review attempts to describe the general aspects of the involvement of chemokines in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases.

Keywords: chemokines, inflammatory diseases, infectious diseases.

INTRODUÇÃO

As quimiocinas foram estabelecidas como citocinas quimioatraentes em 1992 após o Encontro Internacional de Imunologia em Budapest (Lindley *et al.*, 1993). As quimiocinas constituem uma grande família de mediadores inflamatórios e imunológicos, e apresentam algumas similaridades como também algumas diferenças com as citocinas. Assim como as citocinas, as quimiocinas são proteínas secretórias produzidas por leucócitos e células teciduais constitutivamente ou após indução, e exercem seus efeitos localmente de forma autócrina ou parácrina. Entretanto, as quimiocinas são moléculas muito menores que as citocinas e desempenham sua atividade via receptores com sete α -hélices transmembrana acoplados à proteína G, os quais são considerados essenciais para atração de leucócitos (Baggiolini, 2001).

Quimiocinas são citocinas quimiotáticas, que têm a função de mensageiros intercelulares, as quais carregam sinais regulatórios de célula para célula. São produzidas por vários tipos celulares e estão presentes principalmente em processos inflamatórios, onde a presença de leucócitos é essencial na resposta do hospedeiro durante a infecção (Baggiolini *et al.*, 1997).

QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES

Cerca de quarenta quimiocinas foram identificadas até agora, a maioria nos últimos anos. As relações entre os diferentes tipos de quimiocinas não foram inicialmente avaliadas o que levou à criação de uma nomenclatura peculiar (Baggiolini, 2001). Quimiocinas são constituídas de 70 a 130 aminoácidos com quatro resíduos de cisteína conservados (Baggiolini, 1997).

As quimiocinas apresentam uma homologia estrutural baseada em seus resíduos conservados de cisteína, e também na capacidade particular de ligar-se a receptores acoplados à

proteína G transmembrana (Zlotnik & Yoshie, 2000). Quatro famílias de quimiocinas foram descritas: CC, CXC, XC, e CX₃C; duas famílias principais, CXC e CC, também conhecidas como α e β quimiocinas, são distinguidas de acordo com a posição dos dois primeiros resíduos de cisteína, os quais são separados por um aminoácido variável (CXC) ou são adjacentes (CC). As cisteínas formam duas pontes dissulfeto (Cys1 \rightarrow Cys3 e Cys2 \rightarrow Cys4), o que confere às quimiocinas sua estrutura tridimensional. As pontes dissulfeto mantêm as regiões amino terminais juntas, o que é essencial para sua atividade biológica (Baggiolini, 2001) (Figura 1).

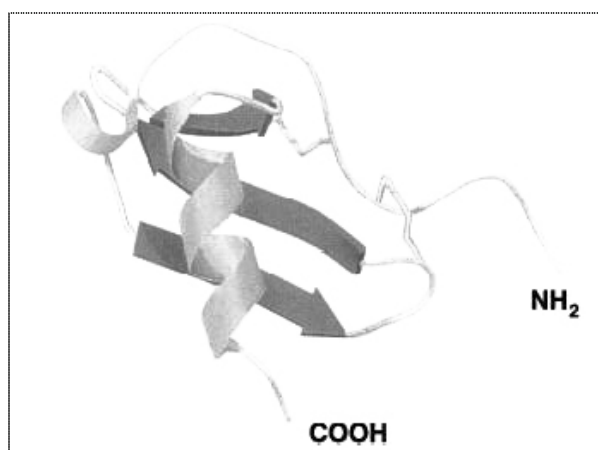


Figura 1. **Estrutura básica de quimiocina.** Estrutura tridimensional da quimiocina SDF-1 obtida por análise de ressonância magnética nuclear em solução. A figura mostra pontes dissulfeto, cadeias β pregueadas e cadeias α hélice (Baggiolini, 2001).

Uma nomenclatura sistemática para as quimiocinas e para seus receptores se tornou necessária com a descoberta de muitas moléculas novas. Esta classificação (Zlotnik & Yoshie, 2000) baseia-se no princípio estabelecido para os receptores na Conferência Gordon em Citocinas Quimiotáticas de 1966. Os receptores são definidos como CXC, CC, XC e CX₃C, seguidos pela letra R (receptor) e um número. As quimiocinas são definidas seguindo o mesmo padrão, baseado em sua estrutura, seguidas

pela letra L (ligante) e pelo número de seu gene. Enquanto que a nomenclatura sistemática tem sido adotada para os receptores, a maioria das quimiocinas ainda é distinguida por seus nomes tradicionais (Baggiolini, 2001) (Tabela 1).

Tabela 1. Receptores de Quimiocinas e seus respectivos ligantes.

Receptor de Quimiocinas	Quimiocinas Ligantes	Célula alvo
CXCR1	IL-8 (CXCL8), GCP-2 (CXCL6)	Neutrófilo
CXCR2	IL-8 (CXCL8), GCP-2 (CXCL6), GRO- α, β, γ (CXCL1, CXCL2, CXCL3), NAP-2 (CXCL7), ENA78 (CXCL5)	Neutrófilo
CXCR3	IP-10 (CXCL10), MIG (CXCL9), I-TAC (CXCL11)	Célula TH1, célula NK
CXCR4	SDF-1 (CXCL12)	Célula dendrítica, monócito, célula T em repouso
CXCR5	BCA-1 (CXCL13)	Célula B
X3CR1	Fractalcina	Célula T ativada, Célula NK, monócito
CCR1	MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13), HCC-1 (CCL14)	Monócito, célula T ativada, célula dendrítica
CCR2	MCP-1,-2,-3,-4 (CCL2, CCL8, CCL7, CCL13)	Monócito, basófilo, célula T ativada, célula dendrítica
CCR3	RANTES (CCL5), Eotaxina (CCL11), Eotaxina-2 (CCL24),-3 (CCL26), MCP-3 (CCL7),-4 (CCL13)	Eosinófilo, basófilo, célula TH2
CCR4	TARC (CCL17), MDC (CCL22)	Célula T ativada, célula dendrítica, célula TH2
CCR5	RANTES (CCL5), MIP-1 α (CCL3) 1 β (CCL4), MCP-2 (CCL8)	Monocito, célula dendrítica, célula NK, célula T ativada
CCR6	LARC (CCL20), MIP-1 α (CCL3)	Célula T ativada, célula dendrítica madura
CCR7	ELC (CCL19)	Célula T ativada, célula dendrítica madura
CCR8	I-309 (CCL1), TARC (CCL17), MIP-1 β (CCL4)	Monócito, célula TH2
CCR9	MCP-1,-2,-3,-4 (CCL2, CCL8, CCL7, CCL13) RANTES (CCL5), HCC-1 (CCL14)	Células Progenitoras hematopoiéticas, monócitos
XCR1	Linfotaccina	Célula T em repouso

Para cada família de quimiocinas descrita, existem receptores respectivos (CCR, CXCR, XCR e CX3CR), acoplados à proteína G, os quais mediarão suas funções junto às células-alvo. A maioria dos receptores reconhece mais de uma quimiocina e muitas quimiocinas se ligam a mais de um receptor (Baggiolini, 2001). Contudo, os receptores CC ligam-se somente às quimiocinas CC, e do mesmo modo, os receptores CXC ligam-se somente às quimiocinas CXC. Esta restrição ligante-receptor provavelmente está relacionada às diferenças estruturais entre as quimiocinas CC e CXC, as quais têm estruturas primárias, secundárias e terciárias similares, mas quaternárias diferentes (Lodi *et al.*, 1994).

Em soluções concentradas diversas quimiocinas se associam para formarem dímeros (Baldwin *et al.*, 1991). A estrutura geral dos dímeros é diferente para quimiocinas CXC e CC. Originalmente, acreditava-se que a interação com seus receptores era através de mecanismos distintos, entretanto, descobriu-se que a tendência de formar dímeros era variável, e que algumas quimiocinas são sempre monoméricas, como a proteína quimioatraente de monócitos (MCP-3) (Kim *et al.*, 1996).

Estudos visando a identificação dos domínios das quimiocinas que estão envolvidos na sua ligação com o receptor e sua ativação foram descritos primeiramente com a IL-8. Revelou-se a importância da região amino terminal e identificou-se uma sequência de três resíduos, Glu-Leu-Arg precedendo a primeira cisteína, o qual é essencial para a atividade da IL-8 (Clark-Lewis *et al.*, 1995). Após a clonagem dos receptores de IL-8, verificou-se que tal sequência é essencial para sua ativação através das quimiocinas, e que a mesma é conservada em todos os ligantes naturais do CXCR1 e CXCR2 (Baggiolini *et al.*, 1997). Entretanto, os efeitos da IL-8 não podem ser mimetizados com oligopeptídeos contendo a sequência Glu-Leu-Arg-Cys (Clark-Lewis *et al.*, 1995). Estes resultados indicam que outros sítios de reconhecimento são necessários. Tais sítios são identificados logo após a segunda cisteína e antes da terceira, por mutagênese ou pela síntese de análogos híbridos da forma de IL-8 de 72 resíduos (Clark-Lewis *et al.*, 1995). O sucesso destes experimentos motivou estudos similares com muitas outras quimiocinas, os quais confirmaram a importância da região amino terminal para a ativação do receptor.

Estudos mais recentes com o SDF-1 (CXCL12), o ligante específico para o CXCR4, o qual é amplamente expresso em leucócitos e células de tecidos e também é um co-receptor para o HIV, levou à identificação de seqüências para o reconhecimento e ativação do receptor (Crump *et al.*, 1997; Zlotnik & Yoshie, 2000).

A identificação de um grande número de receptores de quimiocinas e a caracterização de sua seletividade e expressão em diferentes tipos de leucócitos têm fornecido informações sobre a regulação do tráfego de leucócitos na saúde e em doenças humanas. Fagócitos sangüíneos expressam diferentes tipos e combinações de receptores de quimiocinas, CXCR1 e CXCR2. Os receptores de IL-8 são encontrados exclusivamente em neutrófilos, os quais estão envolvidos principalmente da defesa contra bactérias. Monócitos, eosinófilos e basófilos compartilham alguns receptores e expressam outros com exclusividade (CCR3 em eosinófilos e basófilos e CCR5 em monócitos) e, portanto podem ser recrutados seletivamente por quimiocinas apropriadas (Baggiolini, 2001).

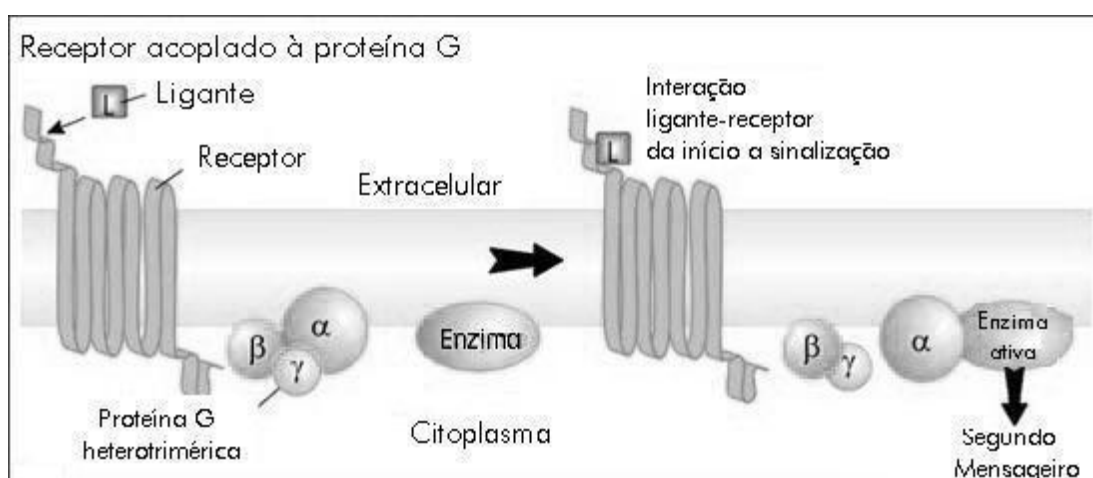
Em contraste aos fagócitos, que apresentam receptores de quimiocinas de forma restrita, os linfócitos T podem expressar a maioria deles, como demonstrado em estudos recentes (Sallusto *et al.*, 2000; Loetscher *et al.*, 2000). A expressão de receptores nas células T é regulada por citocinas (como IL-2, IL-4 e IFN- γ) e outras moléculas efetoras e refletem o grau de diferenciação funcional (Baggiolini, 2001).

Foi demonstrado que a cultura de células T em presença de IL-2 aumenta progressivamente a expressão de muitos receptores de quimiocinas, denominados CCR1, CCR2, CCR5 e CXCR3, e a resposta quimiotática frente a RANTES, MCP-1, MIP-1 β , IP10 e outras (Loetscher *et al.*, 1996). O efeito da IL-2 é reversível, o número de receptores e a responsividade decaem rapidamente com a retirada da citocina e se restabelecem quando a mesma é adicionada novamente. Estas observações geraram muito interesse e muitos grupos começaram a estudar a expressão de receptores de quimiocinas no contexto da diferenciação de células T e aquisição de

propriedades funcionais. Demonstrou-se que células Th1 e Th2 quando obtidas pela cultura em presença de citocinas apropriadas apresentam um repertório diferente de receptores de quimiocinas: CCR5 e CXCR3 para Th1 e CCR3 e CCR4 para células Th2 (Sallusto *et al.*, 1998; Bonecchi *et al.*, 1998).

MECANISMO DE ATIVAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR QUIMIOCINAS

A ativação do receptor de quimiocinas inicia-se com a interação extracelular de seus ligantes e a ativação do complexo de proteína G. Um aspecto interessante é que os receptores de quimiocinas podem ligar-se a diferentes tipos de proteína G, as quais representam uma grande classe de proteínas transdutoras



de sinais (Figura 2).

Figura 2. Receptor de quimiocinas. Representação esquemática do receptor de quimiocinas, demonstrando os sete domínios transmembrana. Os receptores são acoplados à proteína G e podem enviar sinais de quimiotaxia, sobrevivência, proliferação ou diferenciação para o núcleo.

Com a ligação de quimiocinas, a proteína G trimérica é ativada pela troca do GDP por GTP, e se dissocia em subunidade α ligada ao GTP e subunidade $\beta\gamma$. A subunidade $\beta\gamma$ ativa sinais para transdução de enzimas, produzindo segundos mensageiros. Tem sido sugerido que a subunidade α além de regular a atividade da subunidade $\beta\gamma$, pode ser uma molécula sinalizadora através da ativação de tirosina quinases (Thelen, 2001).

Após a ligação das quimiocinas com os respectivos receptores, haverá internalização destes receptores, os quais devem ser degradados ou reciclados, tornando a membrana celular temporariamente não responsiva a uma ligação posterior. A região C-terminal possui alvos que podem ser fosforilados por proteínas quinases, o que permite a ligação de moléculas regulatórias, que também provocam dessensibilização do receptor através do desacoplamento. Uma outra maneira pela qual pode haver regulação é através da inativação da proteína G pela ação de GTPases como as proteínas regulatórias de sinalização de proteína G (RGS). O estudo da sinalização é importante como base para uma melhor caracterização da ação das quimiocinas com diferentes funções biológicas e para a identificação de processos bioquímicos que podem ser alvos terapêuticos regulando as atividades das quimiocinas (Baggiolini, 2001).

Estudos com neutrófilos estimulados com IL-8 demonstraram que as quimiocinas induzem rapidamente uma mudança na morfologia celular, resultante da polimerização e despolimerização da actina (Thelen *et al.*, 1988) e do aumento da expressão e ativação de integrinas através dos quais os leucócitos aderem às células epiteliais antes da migração (Springer, 1994). Outro efeito característico é a liberação do conteúdo dos grânulos, como exemplo proteases dos neutrófilos, monócitos, linfócitos T CD8⁺ e células NK, histamina de basófilos e proteínas citotóxicas de eosinófilos, a produção de lipídeos bioativos, e a formação de radicais de oxigênio durante o "burst" respiratório (Baggiolini *et al.*, 1997). A liberação é observada em altas concentrações de quimiocinas e aumentam após o condicionamento das células com citocinas inflamatórias. A liberação *in vivo* pode ocorrer uma vez que os leucócitos tenham alcançado seu alvo, como exemplo um foco de infecção e

inflamação, onde altos níveis de quimiocinas aumentam as ações antimicrobianas de defesa celular (Baggiolini *et al.*, 1997).

EXPRESSÃO DAS QUIMIOCINAS EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS

Quando as quimiocinas foram identificadas, estas proteínas não tinham sua atividade biológica conhecida, mas já eram associadas com doenças inflamatórias (exemplo: fator plaquetário-4) (Deuel *et al.*, 1977) e o IP-10 – proteína induzida por interferon, de 10 kD. (Luster *et al.*, 1985). Somente após a identificação da interleucina-8 (Yoshimura *et al.*, 1987), uma proteína quimioatraente para monócitos (Matsushima *et al.*, 1989) e a proteína inflamatória de macrófagos (MIP) α e β (Wolpe *et al.*, 1988), é que se correlacionaram fatores quimioatraentes com fatores estruturais em comum dessas proteínas.

Doenças inflamatórias são caracterizadas por um aumento seletivo de diversos subgrupos de leucócitos, um processo controlado pela expressão de algumas quimiocinas (Luster *et al.*, 1997).

Cada doença demonstra um infiltrado inflamatório característico com regulação de RNA mensageiro e concentração protéica das quimiocinas distintos. O tipo de infiltrado inflamatório que caracteriza uma determinada doença é controlado, em parte, pelo subgrupo de quimiocinas expresso no tecido afetado (Chollet-Martin *et al.*, 1993).

Em muitas doenças crônicas, ocorre a infiltração tecidual de linfócitos e macrófagos. Lesões granulomatosas, características da hanseníase e sarcoidose, apresentam infiltrados de linfócitos ativados e altas concentrações de IP-10 (Gottlieb *et al.*, 1988). No processo de aterosclerose, macrófagos e linfócitos são as células potencialmente encontradas nos vasos sanguíneos afetados; sugerindo que as mesmas devem ter papel central na patogênese da aterosclerose, atuando

como progenitores das células que armazenam lipídeos e também como uma fonte de fatores de crescimento que promovem a hiperplasia da camada íntima. O mecanismo de recrutamento de monócitos nas lesões ateroscleróticas é desconhecido, mas a proteína I quimioatraente de monócitos (MCP-I) tem sido detectada em artérias carótidas doentes e não em artérias normais (Nelken *et al.*, 1991). Durante doenças vasculares, como a aterosclerose, os receptores de quimiocinas CCR3 e CXCR4 estão super-expressos, sugerindo que seus ligantes, eotaxina/CCL11 e o SDF-1/CXCL12, respectivamente, podem desempenhar um importante papel na aterosclerose, restenose e na ruptura de placas gordurosas, servindo, desta forma, como potenciais alvos terapêuticos (Kodali *et al.*, 2005).

Na asma, na rinite e na dermatite atópica observam-se um acúmulo e uma ativação seletiva de eosinófilos e mastócitos. Os mediadores derivados destas células participam na patogenia dessas doenças alérgicas (Bousquet *et al.*, 1990). Fatores liberadores de histamina, como a eotaxina e as proteínas quimioatraentes de monócitos, são bastante conhecidos e muito importantes nos processos alérgicos e inflamatórios (Luster *et al.*, 1997). Estas quimiocinas atuam como principais fatores na liberação de histamina na ausência de antígeno e anticorpos IgE (Souza *et al.*, 1994). Além disso, várias quimiocinas que atuam sobre os eosinófilos têm sua concentração aumentada no tecido epitelial de pacientes com dermatite atópica, rinite alérgica ou asma após a apresentação de um determinado antígeno. É provável, portanto que as quimiocinas estabeleçam uma relação molecular entre a resposta imunológica ativada por um antígeno específico e a migração dos eosinófilos aos tecidos. Sabe-se que a interação eotaxina / CCR3 tem importância fundamental no recrutamento de eosinófilos durante a asma, o que implica que um bloqueio da eosinofilia pulmonar induzida por antígeno requer o antagonismo de múltiplos ligantes do CCR3 (Pope *et al.*, 2005).

A colite ulcerativa e a doença de Crohn são caracterizadas por inflamação crônica com superposição de exacerbações agudas. Na fase crônica, os macrófagos e os linfócitos infiltram o intestino, e na fase aguda, neutrófilos e talvez eosinófilos, deixam a circulação para entrar na mucosa intestinal. Muitas quimiocinas estão presentes no tecido intestinal dos pacientes com estas patologias.

Na mucosa intestinal inflamada durante a colite ulcerativa e a doença de Crohn, células mononucleares expressam predominantemente CCR5 e CXCR3 (Oki et al., 2005).

Na psoríase observam-se neutrófilos, os quais foram atraídos pela IL-8 e GRO- α (denominado oncogene-alfa relacionado com o crescimento, embora não seja realmente um oncogene) e linfócitos T ativados, cujos quimioatraentes são o IP-10 e a proteína I quimioatraente para monócitos (MCP-I). Nas placas de psoríase foram identificados quimioatraentes para ambos os tipos celulares, mas não foram encontrados em pele normal (Gottlieb *et al.*, 1988; Gillitzer *et al.*, 1991). O tratamento com sucesso da psoríase resulta em um decréscimo de IP-10 (Gottlieb *et al.*, 1988). Recentemente, identificou-se que linfócitos NK são protagonistas na patogênese da psoríase, expressando altos níveis de CXCR3 e CCR5 e que induzem a expressão de moléculas de MHC classe II e ICAM-1, bem como a liberação de CXCL10 e CCL5 (Ottaviani *et al.*, 2006).

As quimiocinas e seus receptores, além de governar a migração das células leucêmicas, podem também contribuir com uma notável resistência à apoptose induzida pela quimioterapia. Observou-se que as células leucêmicas escapam da apoptose *in vitro* quando entram em contato com células produtoras de SDF/CXCL12.

O sequenciamento da quimiocina SDF-1/CXCL12 (Genbank L36033) revelou um polimorfismo no segmento evolucionariamente conservado da região 3' não codificadora (3'UTR), do gene estrutural transcrito. Este polimorfismo, designado SDF1-3'A, pode ter funções regulatórias importantes, resultantes do aumento na concentração de SDF1 (Winkler et al., 1998).

As análises de Cavassin *et al.* (2004) demonstraram que a porcentagem de portadores do gene 3'A da quimiocina SDF-1/CXCL12 apresenta variação estatisticamente significativa entre os pacientes diagnosticados com linfoma em relação aos pacientes diagnosticados com leucemia linfóide. Essa variação genética deve representar uma função regulatória importante pelo possível aumento de SDF-1 pelo estroma dos linfonodos.

QUIMIOCINAS EM DOENÇAS INFECCIOSAS

A concentração de potentes quimioatraentes para neutrófilos, tal como a interleucina-8, encontra-se aumentada no fluido broncoalveolar de pacientes com doenças pulmonares (Chollet-Martin *et al.*, 1993). Por exemplo, em síndromes respiratórias e em muitos processos agudos, como a pneumonia bacteriana, observa-se um influxo maciço de neutrófilos ao tecido. Já em pacientes com fibrose cística infectados com *Pseudomonas aeruginosa*, os níveis de células Th2 CCR4⁺ estão elevados se comparados a pacientes com fibrose cística sem a infecção e com indivíduos controle (Hartl *et al.*, 2006).

Os mecanismos da resposta imune na Leishmaniose Tegumentar Americana ainda não estão devidamente esclarecidos, apesar dos inúmeros estudos. No início, a doença pode ser limitada e auto-resolutiva, e posteriormente pode evoluir para leishmaniose mucocutânea. Uma vez que a resposta imune do tipo Th1 está associada com inflamação, o alelo CCR5/ Δ 32 não funcional resultaria em uma resposta Th1 menos efetiva, levando conseqüentemente a um estado inflamatório menos severo (Chies e Hutz, 2003), pois a leishmaniose cutânea causada pela *L. braziliensis* resulta na ativação de uma resposta imune Th1 altamente específica (Silveira *et al.*, 2004). Análises *in vitro* têm demonstrado que células de portadores do alelo Δ 32 apresentam um resposta quimiotática reduzida aos ligantes do CCR5 (Panzer *et al.*, 2005). Oliveira *et al.* (2006) demonstraram que embora não haja diferença quanto a frequência alélica do CCR5 Δ 32 entre os pacientes com leishmaniose e indivíduos saudáveis, os portadores do alelo Δ 32 apresentaram apenas manifestações cutâneas da leishmaniose, enquanto que indivíduos selvagens para o mesmo alelo apresentaram também lesões mucocutâneas.

Os vírus, para garantirem seu acesso ao citoplasma e ao núcleo celular, onde exercem seu papel patogênico, ligam-se a receptores nos leucócitos; como exemplo o vírus Epstein Barr que se liga ao receptor para complemento 3 e os rinovírus que se ligam a molécula 1 de adesão intercelular (Baggiolini, 2001).

Nas meningites virais, os monócitos e linfócitos são recrutados ao tecido nervoso, sendo possível observar um aumento na concentração de quimiocinas que atuam sobre essas células no fluido cerebrospinal, tais como IP-10 e proteína-I quimioatraente de monócitos. O aumento na concentração de quimiocinas correlaciona-se com a quantidade de células infiltradas nas meninges (Lahrtz *et al.*, 1997).

Os receptores para quimiocinas servem como co-receptores para dois importantes patógenos, o Plasmodium e o HIV. O *Plasmodium vivax* liga-se ao DARC (receptor nos eritrócitos) (Horuk *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 2006) e o HIV liga-se a vários receptores para quimiocinas. Esses receptores acabam por determinar o tropismo viral por facilitarem a entrada às células (Deng *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996).

A importância dos receptores de quimiocinas na patofisiologia do HIV tornou-se aparente quando se descobriu um polimorfismo para CCR5, o qual poderia explicar porque certos pacientes com alto risco para infecção por HIV-1 permanecem não infectados (Samson *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996). Indivíduos que são homozigotos para a deleção de 32 pares de bases no gene para o CCR5 não têm a síntese de proteínas CCR5 funcionais, e os mesmos não são encontrados dentre os pacientes HIV positivos. Além disso, células de indivíduos com esta mutação podem apresentar resistência à infecção por HIV-1 "*in vitro*" (Paxton *et al.*, 1996). Observou-se também que pessoas heterozigotas para tal deleção apresentam uma progressão mais lenta na infecção pelo HIV-1 do que os indivíduos onde não há constatação desta mutação. Este fato pode ocorrer devido à existência de uma associação entre a gp120 e o CD4 e o receptor para quimiocina antes do HIV infectar as células, apesar do mecanismo molecular implicado na fusão celular com o vírus não estar totalmente elucidado (Trkola *et al.*, 1996; Dettin *et al.*, 2002).

A partir dos estudos sobre o polimorfismo genético do receptor CCR5, várias pesquisas sobre mutações nos genes que codificam outros receptores de quimiocinas e seus ligantes foram desenvolvidas em diferentes populações de indivíduos não-infectados pelo HIV-1, expostos ao HIV-1 e que permaneciam não-infectados e em indivíduos infectados pelo HIV-1 em diferentes estágios de

evolução da doença. Estudos *in vitro* demonstraram que SDF1 α , uma das duas variantes transcricionais do SDF1, é capaz de diminuir a expressão do co-receptor CXCR4 nas células por indução da endocitose, bloqueando de maneira efetiva a infecção pelo HIV-1 T-trópico. Entretanto, este bloqueio não ocorre na infecção por HIV-1 M-trópico (Feng *et al.*, 1996; Oberlin *et al.*, 1996).

O polimorfismo na região conservada 3' não transcrita (3'UTR) do gene que codifica a quimiocina SDF1 tem sido associado tanto com uma maior resistência à infecção bem como com o retardo da progressão da infecção pelo HIV-1 como com uma maior progressão para AIDS e morte por esta doença (Winkler *et al.*, 1998; Mummidi *et al.*, 1998).

Reiche *et al.* (2006), em um estudo transversal, avaliaram as prevalências do polimorfismo genético do SDF1 e do alelo mutante SDF1-3'A em indivíduos saudáveis, em indivíduos expostos ao HIV-1 mas não infectados e em pacientes infectados pelo HIV-1 assintomáticos e com AIDS e obtiveram uma frequência geral do alelo mutante SDF1-3'A não diferindo significativamente entre os indivíduos analisados, reforçando a hipótese de que o alelo SDF1-3'A, isoladamente, pode não prevenir o risco de infecção pelo HIV-1 (Reiche *et al.*, 2006).

O CXCR4 é o co-receptor de quimiocinas mais comumente utilizado pelo HIV-1 com tropismo por células T. Vírus com tropismo pelas células T indutoras de sincício geralmente aparecem na fase mais tardia do curso de infecção, durante o *phenotypic switch* que frequentemente precede a fase dos sintomas da AIDS. O SDF-1/CXCL12 é um ligante para o CXCR4, sendo que este funciona como co-receptor durante a infecção pelo HIV. Tem sido demonstrado que não há relação entre o alelo SDF-1 3'A e indução de sincício (Watanabe *et al.*, 2003).

Muitos vírus expressam citocinas e receptores para citocinas que são importantes no processo infeccioso (ex. Poxvírus codificam receptores funcionais para interleucina-1 beta e interferon-gama). Do mesmo modo, muitos dos herpesvírus expressam homólogos de receptores para quimiocinas e muitos deles conseguem se ligar as quimiocinas. Recentemente, o herpesvírus-8, associado ao Sarcoma de Kaposi, demonstrou ser capaz de codificar um receptor ativo para

quimiocina, o qual estimula a proliferação celular (independente de agonista) (Arvanitakis *et al.*, 1997). Embora o papel destes receptores homólogos de quimiocinas não seja conhecido nos processos infecciosos, os mesmos apresentam relação entre o sistema de quimiocinas e o desenvolvimento de doenças em humanos. Além disso, o herpesvírus humano tipo 6, o herpesvírus - 8 associado ao Sarcoma de Kaposi e o vírus *Molluscum contagiosum* codificam homólogos de quimiocinas CC.

CONCLUSÃO

As quimiocinas são uma fascinante família de citocinas cujo papel que está começando a ser melhor compreendido. Acredita-se que controlem homeostaticamente a circulação dos leucócitos pelos tecidos. A contínua recirculação de linfócitos pelo sangue, tecidos e vasos linfáticos ocorre de maneira organizada; trazendo linfócitos imaturos aos linfonodos a fim de que eles encontrem diferentes antígenos e se transformem em linfócitos de memória, garantindo o bom desempenho das funções de defesa. Os macrófagos, eosinófilos e mastócitos, que são produzidos na medula óssea, também migram aos tecidos onde desempenham seu papel biológico. O papel das quimiocinas na regulação do movimento celular aos tecidos começou a ser elucidado através do estudo em camundongos deficientes de alguma quimiocina em particular.

O termo quimiocina foi aplicado a estas moléculas, pois acreditava-se que sua principal atividade biológica era de quimiotaxia, ou seja, direcionar o movimento de outras células durante os processos inflamatórios. Recentemente, tornou-se evidente que seus efeitos estendem-se muito além de atrair leucócitos aos sítios de inflamação. Sólidas evidências indicam que as quimiocinas participam no desenvolvimento dos órgãos, nos processos inflamatórios e infecciosos, na angiogênese, na recirculação dos leucócitos e na regulação imunológica.

As quimiocinas e seus receptores desempenham um importante papel na patogénia tanto de doenças infecciosas, quanto em doenças inflamatórias, contudo, alterações nos níveis de

quimiocinas e ou inibição da sua ação através de bloqueio do receptor podem apresentar conseqüências drásticas para a patofisiologia de processos inflamatórios. Desta forma as quimiocinas e seus receptores têm sido alvo de estudo para melhor compreensão dos mecanismos que envolvem muitas doenças.

REFERÊNCIAS

- ARVANITAKIS, L.; GERAS-RAAKA, E.; VARMA, A.; GERSHENGORN, M.C.; CESARMAN, E. Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature* v.385, p.347-350, 1997.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. *Journal of Internal Medicine* v.250, p.91-104, 2001.
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Human chemokines: an update. *Annual Review of Immunology* v.15, p.675-705, 1997.
- BLEUL, C.C.; FARZAN, M.; CHOE, H.; PAROLIN, C.; CLARK-LEWIS, I.; SODROKSI, J.; SPRINGER, T.A. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* v.382, p.829-833, 1996.
- BONECCHI, R.; BIANCHI, G.; BORDIGNON, P.P.; D'AMBROSIO, D.; LANG, R.; BORSATTI, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; GRAY, P.A.; MANTOVANI, A.; SINIGAGLIA, F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* v.187, p.129-134, 1998.
- BOUSQUET, J.; CHANEZ, P.; LACOSTE, J.Y.; BARNEON, G.; GHAVANIAN, N.; ENANDER, I.; VENGE, P.; AHLSTEDT, S.; SIMONY-LAFONTAINE, J.; GODARD, P. Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.* v.323, p.1033-1039, 1990.
- CAVASSIN, G.G.O.; DE LUCCA, F.L.; ANDRE, N.D.; COVAS, D.T.; FUNGARO, M.H.P.; VOLTARELLI, J.C.; WATANABE, M.A.E. Molecular investigation of the stromal cell-derived factor-1 chemokine in lymphoid leukemia and lymphoma patients from Brazil. *Blood Cell Mol Dis*, v.33, p.90-93, 2004.
- CHIES, J.A.; HUTZ, M.H. High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Braz J Med Biol Res*, v.36, n.1, p.71-75, 2003.
- CHOE, H.; FARZAN, M.; SUN, Y.; SULLIVAN, N.; ROLLINS, B.; PONATH, P.D.; WU, L.; MACKAY, C.R.; LAROSA, G.; NEWMAN, W.; GERARD, N.; GERARD, C.; SODROSKI, J. The (beta)-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* v.85, p.1135-1148, 1996.
- CHOLLET-MARTIN, S.; MONTRAVERS, P.; GIBERT, C.; ELBIM, C.; DESMONTS, J.M.; FAGON, J.Y.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A. High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome. *Infect Immun.*, v.61, p.4553-4559, 1993.
- CLARK-LEWIS, I.; KIM, K.S.; RAJARATHNAM, K.; GONG, J.H.; DEWALD, B.; MOSER, B.; BAGGIOLINI, M.; SYKES, B.D. Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukocyte Biol* v.57, p.703-711, 1995.
- CRUMP, M.P.; GONG, J.H.; LOETSCHER, P.; RAJARATHNAM, K.; AMARA, A.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; VIRILIZIER, J.L.; BAGGIOLINI, M.; SYKES, B.D.; CLARK-LEWIS, I. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor 1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO Journal*, v.16, n.23, p.6996-7007, 1997.
- DENG, H.; LIU, R.; ELLMEIER, W.; CHOE, S.; UNUTMAZ, D.; BURKHART, M.; DIMARZIO, P.; MARMON, S.; SUTTON, R.E.; HILL, C.M.; DAVIS, C.B.; PEIPER, S.C.; SCHALL, T.J.; LITTMAN, D.R.;

LANDAU, N.R. *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. Nature*, v.381, p.661-666, 1996.

DETTIN, M.; SCARINCI, C.; PASQUATO, A., DI BELLO, C. Synthetic peptides for study of human immunodeficiency virus infection. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, v.102-103, n.1-6, p.41-48, 2002.

DEUEL, T.F.; KEIM, P.S.; FARMER, M.; HEINRIKSON, R.L.; Amino acid sequence of human platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.74, n.6, p.2256-8, 1977.

FENG, Y., BRODER, C.C., KENNEDY, P.E., BERGER, E.A.. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein coupled receptor. *Science*, v.272, p.872-877, 1996.

GILLITZER, R.; WOLFF, K.; TONG, D.; MULLER, C.; YOSHIMURA, T.; HARTMANN, A.A.; STINGL, G.; BERGER, R. MCP-1 mRNA expression in basal keratinocytes of psoriatic lesions. *N. Engl. J.Med.*, v.324, p.954-960, 1991.

GOTTLIEB, A.B.; LUSTER, A.D.; POSNETT, D.N.; CARTER, D.M. Detection of a gamma interferon-induced protein IP-10 in psoriatic plaques. *J. Exp. Med.*, v.168, p.941-948, 1988.

HARTL, D.; GRIESE, M.; KAPPLER, M.; ZISSEL, G.; REINHARDT, D.; REBHAN, C.; SCHENDEL, DJ.; KRAUSS-ETSCHMANN, S. Pulmonary T(H)2 response in *Pseudomonas aeruginosa*-infected patients with cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*, v.117, p.204-211, 2006.

HORUK, R.; CHITNIS, C.E.; DARBONNE, W.C.; COLBY, T.J.; RYBICKI, A.; HADLEY, T.J.; MILLER, L. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science*, v.261, p.1182-1184, 1993.

KIM, K.S.; RAJARATHNAM, K.; CLARK-LEWIS, I.; SYKES, B.D. Structural characterization of a monomeric chemokine: monocyte chemoattractant protein-3. *FEBS Lett* v.395, p.277-282, 1996.

KODALI, R.; HAJJOU, M.; BERMAN, A.B.; BANSAL, M.B.; ZHANG, S.; PAN, J.J.; SCHECTER, A.D. Chemokines induce matrix metalloproteinase-2 through activation of epidermal growth factor receptor in arterial smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2005 Dec 9; [Epub ahead of print].

LAHRTZ, F.; PIALI, L.; NADAL, D.; PFISTER, H.W.; SPANAUS, K.S.; BAGGIOLINI, M.; FONTANA, A. Chemokines in viral meningitis: chemotactic cerebrospinal fluid factors include MCP-1 and IP-10 for monocytes and activate T lymphocytes. *Eur. J. Immunol*, v.27, p.2484-2489, 1997.

LINDLEY, I.J.D.; WESTWICK, J.; KUNKEL, S.L. Nomenclature announcement - the chemokines. *Immunol Today*, v.14, p.24, 1993.

LIU, R.; PAXTON, W.A.; CHOE, S.; CERA DINI, D.; MARTIN, S.R.; HORUK, R.; MACDONALD, M.E.; STUHLMANN, H.; KOUP, R.A.; LANDAU, N.R. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* v.86, p.367-377, 1996.

LODI, P. J.; GARRETT, D.S.; KUSZEWSKI, J.; TSANG, M.L.; WEATHERBEE, J.A.; LEONARD, W.J.; GRONENBORN, A.M.; CLORE, G.M. High-resolution solution structure of the beta chemokine MIP-1 (beta) by multidimensional NMR. *Science* v.263, p.1762-1767, 1994.

LOETSCHER, P.; SEITZ, M.; BAGGIOLINI, M.; MOSER, B. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J. Exp. Med.* v.184, p.569-577, 1996.

LOETSCHER, P.; MOSER, B.; BAGGIOLINI, M. Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv Immunol*, v.74, p.127-80, 2000.

LUSTER, A.D.; ROTHENBERG, M.E. Role of the chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *J. Leukoc. Biol.* , v.62, p.620-633, 1997.

LUSTER, A.D.; UNKELESS, J.C.; RAVETCH, J.V.; Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature*, v.315, n.6021, p.672-676. 1985.

MATSUSHIMA, K.; LARSEN, C.G.; DUBOIS, G.C.; OPPENHEIM, J.J.; Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Med*, v.169, n.4, p1485-1490. 1989.

MUMMIDI, S.; AHUJA, S.S.; GONZALEZ, E.; ANDERSON, S.A.; SANTIAGO, E.N.; STEPHAN, K.T. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rate of HIV-1 disease progression. *Nat Med*, v.4, n.7, p.786-793, 1998.

NELKEN, N.A.; COUGHLIN, S.R.; GORDON, D.; WILCOX, J.N.. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J. Clin. Invest.*, v.88, p.1121-1127, 1991.

OBERLIN, E.; AMARA, A.; BACHELERIE, F.; BESSIA, C.; VIRELIZIER, J.L.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; SCHWARTZ, O.; HEARD, J.M.; CLARK-LEWIS, I. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, v.382, p.833-835, 1996.

OKI, M.; OHTANI, H.; KINOUCI, Y.; SATO, E.; NAKAMURA, S.; MATSUMOTO, T.; NAGURA, H.; YOSHIE, O.; SHIMOSEGAWA, T. Accumulation of CCR5+ T cells around RANTES+ granulomas in Crohn's disease: a pivotal site of Th1-shifted immune response? *Lab Invest.*, v.85, n.1, p.137-45, 2005.

OLIVEIRA, K.B.; PONTELLO, R.; REICHE, E.M.V.; MORIMOTO, H.K., ESTEVÃO, D.; FUNGARO, M.H.P.; NASSER, T.F., WATANABE, M.A.E. Analysis of the CC chemokine receptor 5 (CCR5) Delta 32 polymorphism in a Brazilian population with cutaneous leishmaniasis. *Journal of Cutaneous Pathology* (IN PRESS) Inglaterra, 2006.

OTTAVIANI, C.; NASORRI, F.; BEDINI, C.; DE PITA, O.; GIROLOMONI, G.; CAVANI A. CD56(bright)CD16(-) NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. *Eur J Immunol.*, v.36, p.118-128, 2006.

PANZER, U.; SCHNEIDER, A.; STEINMETZ, O.M.; WENZEL, U.; BARTH, P.; REINKING R.; BECKER, J.U.; HARENDZA, S.; ZAHNER, G.; FISCHEREDER, M.; KRAMER, B.K.; SCHLONDORFF, D.; OSTENDORF, T.; FLOEGE, J.; HELMCHEN, U.; STAHL, R.A. The chemokine receptor 5 Delta32 mutation is associated with increased renal survival in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int*, v.67, n.1, p.75-81, 2005.

PAXTON, W.A.; MARTIN, S.R.; TSE, D.; O'BRIEN, T.R.; SKURNICK, J.; VANDEVANTER, N.L.; PADIAN, N.; BRAUN, J.F.; KOTLER, D.P.; WOLINSKYM, S.M.; KOUP, R.A. Relative resistance to HIV-1 of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high risk sexual exposure. *Natural Medicine*, v.2, p.412-417, 1996.

POPE, S.M.; ZIMMERMANN, N.; STRINGER, K.F.; KAROW, M.L.; ROTHENBERG, M.E. The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. *J Immunol*, v.175, n.8, p.5341-5350, 2005.

REICHE, E.M.V.; WATANABE, M.A.E.; MORIMOTO, H.K.; MORIMOTO, A.A.; MATSUO, T.; MIRANDA, H.C.; OLIVEIRA, K.B.; BONAMETTI, A.M. SDF1 genetic polymorphism in healthy individuals and in HIV exposed but uninfected individuals and in HIV-1 infected patients from Brazilian population. *International Journal of Immunogenetics*, IN PRESS, Inglaterra 2006.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A.; MACKAY, C.R. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today*, v.19, p.568-574, 1998.

SALLUSTO, F.; MACKAY, C.R.; LANZAVECCHIA, A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol*, v.18, p.593-620, 2000.

SAMSON, M.; LIBERT, F.; DORANZ, B.J.; RUCKER, J.; LIESNARD, C.; FARBER, C.M.; SARAGOSTI, S.; LAPOMEROULIE, 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*, v.332, p.722-725, 1996.

SHEN, H.; SCHUSTER, R.; STRINGER, K.F.; WALTZ, S.E.; LENTSCH, A.B. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) regulates prostate tumor growth. *FASEB J*, v.20, n.1, p.59-64, 2006.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.99, n.3, p.239-251, 2004.

SOUZA, A.R.; LANE, S.J.; NAKAHOSTEEN, J.A.; YOSHIMURA, T.; LEE, T.H.; POSTON, R.N. Increases expression of the monocyte chemoattractant protein-1 in bronchial tissue from asthmatic subjects. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, v.10, p.142-147, 1994.

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, v.76, p.301-314, 1994.

THELEN, M.; PEVERI, P.; KERNEN, P.; VON TSCHARNER, V.; WALZ, A. BAGGIOLINI, M. Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. *FASEB J*, v.2, p.2702-2706, 1988.

THELEN, M. Dancing to the tune of chemokines. *Nature Immunol* 2:129-134, 2001.

TRKOLA, A.; DRAGIC, T.; ARTHOS, J.; BINLEY, J.M.; OLSON, W.C.; ALLAWAY, G.P.; CHENG-MAYER, C.; ROBINSON, J.; MADDON, P.J.; MOORE, J.P. CD-4 dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its coreceptor CCR-5. *Nature*, v.384, p.184-187, 1996.

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

WATANABE, M.A.E.; MARIAMILANEZI, C.; VOLTARELLI, J.C.; DELGADO, M.O.; KASHIMA, S.; CAVASSIN, G.G.O.; COVAS, D.T. SDF-1 gene polymorphism and syncytia induction in Brazilian HIV-1 infected individuals. *Microbial Pathogenesis*, v.35, p.31-34, 2003.

WINKLER, C.; MODI, W.; SMITH, M.W.; NELSON, G.W.; WU, X.; CARRINGTON, M.; DEAN, M.; HONJO, T.; TASHIRO, K.; YABE, D.; BUCHBINDER, S.; VITTINGHOFF, E.; GOEDERT, J.J.; O'BRIEN, T.R.; JACOBSON, L.P.; DETELS, R.; DONFIELD, S.; WILLOUGHBY, A.; GOMPERTS, E.; VLAHOV, D.; PHAIR, J.; O'BRIEN, S.J. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. *Science*, v.118, p.681-688, 1998.

WOLPE, S.D.; DAVATELIS, G.; SHERRY, B.; BEUTLER, B.; HESSE, D.G.; NGUYEN, H.T.; MOLDAWER, L.L.; NATHAN, C.F.; LOWRY, S.F.; CERAMI, A. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med.*, v.167, n.2, p.570-81, 1988.

YOSHIMURA, T.; MATSUSHIMA, K.; TANAKA, S.; ROBINSON, E.A; APPELLA, E.; OPPENHEIM, J.J.; LEONARD, E.J. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.84, n.24, p.9233-9237, 1987.