

Ana Isabel Calçada Chaves de Morais

MECANISMOS INATOS DE RESISTÊNCIA A INFECCÕES VIRAIS

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2011

Ana Isabel Calçada Chaves de Moraes

MECANISMOS INATOS DE RESISTÊNCIA A INFECÇÕES VIRAIS

Assinatura:

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob orientação do Professor Doutor Rui Medeiros, Prof. Associado com Agregação da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa.

SUMÁRIO

Esta dissertação teve como objectivo geral o estudo dos mecanismos inatos de resistência a infecções virais. Foram assim traçados quatro objectivos específicos: revisão da informação existente na literatura científica; identificação dos mecanismos de resistência mais frequentes; estudo da prevalência da mutação $\Delta 32$ do gene que codifica o co-receptor CCR5 numa população portuguesa com mais de 65 anos de idade e comparação da prevalência da mutação em várias populações Europeias.

Após a revisão da literatura, foram identificados 62 artigos científicos, encontrados nas bases de dados *SCIENCE DIRECT* e *PUBMED* de 1996 a 2010, cujos *abstracts* foram analisados segundo critérios de inclusão específicos. Em consequência deste procedimento foram seleccionados 33 artigos, dos quais vinte se referem ao HIV, cinco ao Flavivírus, quatro ao Influenza vírus, três ao Herpesvírus e um ao vírus da Variola Humana. Os mecanismos de resistência mais frequentes foram identificados no HIV e no Flavivírus.

Através do estudo realizado foi possível determinar a prevalência da mutação CCR5 $\Delta 32$ numa população portuguesa com mais de 65 anos de idade. Foram analisadas 47 amostras de saliva, obtidas recorrendo ao *Kit* comercial *Copan Liquid Amies Elution Swab* (ESwab, Brescia, Itália). A mutação foi detectada pela técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR). Os resultados revelaram que 10,6% dos inquiridos exibem a mutação CCR5 $\Delta 32$ em heterozigotia. Os resultados obtidos confirmam a prevalência da mutação $\Delta 32$ tendo em conta a localização geográfica.

Foi também observado que a presença da mesma poderá estar relacionada com a susceptibilidade ao vírus da gripe asiática ($p=0,031$) e à existência do hábito tabágico ($p=0,024$).

A frequência alélica obtida no presente estudo foi comparada com a frequência alélica da mutação $\Delta 32$ noutros países Europeus. Esta comparação ilustrou a diminuição da frequência alélica do norte para o sul da Europa.

Estudos posteriores poderão utilizar esta pesquisa como suporte para aprofundar o conhecimento nesta matéria.

ABSTRACT

This thesis aimed to study the major mechanisms of innate resistance to viral infections. In order to reach it, four specific objectives were design: a review of existing information in the scientific literature; the identification of the more frequent resistance mechanisms; the study of the prevalence of the mutation $\Delta 32$ of the gene that encodes the CCR5 coreceptor in a Portuguese population over 65 years old and the comparison of the prevalence of the mutation of the $\Delta 32$ allele in several European populations.

To do so, a literature review on innate mechanisms of resistance to viral infections was conducted. The 62 articles found in the databases *PUBMED* and *SCIENCE DIRECT* from 1997 to 2010 were selected. Their abstracts were analyzed according to a specific inclusion criteria. This procedure provided the project with 33 valid articles. Twenty of those articles refer to HIV, five to the Flavivirus, four refer to influenza virus, three to the herpes virus and one to the smallpox virus. The more common mechanisms of resistance have been identified in HIV and Flavivirus.

Through the study it was possible to determine the prevalence of CCR5 $\Delta 32$ mutation in a Portuguese population over 65 years. The study analyzed 47 samples of saliva, which were obtained using the commercial Kit *Copan Liquid Amies Elution Swab* (ESwab, Brescia, Italy). The mutation was detected by the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR). The results revealed that 10,6% of the participants revealed the mutation CCR5 $\Delta 32$ in heterozygosity. This study also confirms the prevalence of CCR5 $\Delta 32$ mutation according to geographical location and it was also noted that the presence of that mutation may be associated with susceptibility to the Asian flu virus ($p=0,031$) as well as the existence of smoking habits ($p=0,024$).

The allele frequency obtained in this study was compared with the $\Delta 32$ allele frequency of the mutation in other European countries. This comparison illustrates the decrease in allelic frequency from north to southern Europe.

Further studies may use this research as a support to deepen the knowledge in this area.

“É esta a vantagem da ambição, podes não chegar à lua, mas tiraste os pés do chão.”

Da Weasel , *Hino Mundial 2006*

DEDICATÓRIA

À minha pequena grande família Mãe, Pai, Irmão e Avó.

AGRADECIMENTOS

PROFESSOR DOUTOR RUI MEDEIROS

MESTRE JANI SILVA

MARIA DA CONCEIÇÃO MORAIS

DULCE MIRANDA

SOFIA FREITAS

PROFESSORA DOUTORA CARLA MARTINS

TODA A EQUIPA DA FARMÁCIA CASTRO CARNEIRO – VILA NOVA DE GAIA

IDOSOS E ORGANIZAÇÃO DO **PROJECTO AFFECTOS** – VALPAÇOS

LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
NOMENCLATURA	v
I. Introdução	1
1. Flavivírus	2
1.1. Dados epidemiológicos	2
1.2. O Flavivírus e as Flaviviroses e os Factores que afectam a actividade viral	2
2. Herpesvírus	4
2.1. O Herpesvírus e patologias associadas	4
2.2. Factores que afectam a actividade viral	6
2.2.1. O código genético do hospedeiro	6
3. Influenza vírus	7
3.1. O Influenza vírus	7
3.2. Factores que afectam a actividade viral	7
3.2.1. O código genético do hospedeiro	7
4. Variola Humana	8
4.1. O vírus da Variola Humana	8
5. Vírus de Imunodeficiência Humana (HIV)	9
5.1. O HIV	9
5.2. A infecção causada pelo HIV	9
5.3. O CCR5	10
5.4. O CCR5 Δ 32	11
5.5. A origem e propagação da mutação	11
II. Objectivos	14
1. Objectivo geral	14
2. Objectivos específicos	14
III. Materiais e métodos	15
1. Revisão da informação existente na literatura científica	15

2. Estudo da prevalência da mutação do alelo $\Delta 32$ do gene que codifica o co-receptor CCR5 numa população portuguesa com mais de 65 anos de idade	16
2.1. Aspectos éticos	16
2.2. População em estudo	16
2.3. Colheita da amostra	16
3. Procedimentos laboratoriais	18
3.1. Processamento das amostras	18
3.2. Isolamento de ácidos nucleicos	18
3.3. Detecção e genotipagem da mutação CCR5 $\Delta 32$ por <i>Polymerase Chain Reaction</i>	18
4. Análise estatística	19
IV. Resultados	20
1. Revisão da informação existente na literatura científica	20
2. Identificação dos Mecanismos mais Frequentes	22
3. Estudo da prevalência da mutação do alelo $\Delta 32$ do gene que codifica co-receptor CCR5 numa população portuguesa com mais de 65 anos de idade	23
4. Comparação da prevalência da mutação em várias populações Europeias	25
V. Discussão	27
VI. Conclusão	34
VII. Bibliografia	36
VIII. Anexos	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Associação das variáveis com os resultados obtidos	24
Tabela 2 – Frequência do CCR5 Δ 32 em diferentes populações Europeias	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalência da mutação a nível mundial	13
Figura 2. Fluxograma que distingue os artigos consoante o vírus	15
Figura 3. Ilustração do <i>kit</i> de colheita usado	17
Figura 4. Procedimento de utilização do ESwab de acordo com o fabricante	17
Figura 5. Pormenor da haste a partir	17
Figura 6. Gele de agarose visualizado sob luz ultra-violeta, exibindo a mutação em heterozigotia.	19
Figura 7. Número de artigos por vírus	20
Figura 8. Quantidade de artigos publicados por ano	20
Figura 9. Temas abordados nos artigos analisados	21
Figura 10. Percentagem de artigos encontrados referentes aos mecanismos de resistência característicos de cada vírus	23
Figura 11. Amostras portadoras da mutação	23
Figura 12. Regressão linear entra a frequência alélica e a localização	26
Figura 13. Relato da acção do sistema imunitário em infecções virais e em enfisema	30

NOMENCLATURA

APC – Células Apresentadoras de Antígeno

BHV - *Bovine Herpesvirus*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

HA – Hemaglutinina

HCV – Vírus da Hepatite C

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HRL - *Locus* de Resistência ao Herpes

HSV – Herpesvírus Simples

INF - Interferão

IL – Interleucina

MHC - *Histocompatibility Complex*

NA - Neuraminidase

NK – *Natural killer*

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – pares de base

PRV - *Porcine Pseudorabies Virus*

RNA – Ácido Ribonucleico

SIDA – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

SNC – Sistema Nervoso Central

TNF – Factor de Necrose tumoral

WNV – *West Nilo Virus*

NOTA 1: A autora ainda não aderiu ao novo acordo ortográfico.

NOTA 2: A notação Anglo-saxónica foi mantida por ser mais facilmente reconhecida pela comunidade científica.

I. INTRODUÇÃO

A motivação para a realização deste estudo foi o facto de, tanto quanto a autora pôde pesquisar, Portugal carecer de passado científico histórico conhecido acerca desta matéria, que se afirma, cada vez mais, como uma possível resposta em infecções virais.

Este trabalho está organizado em seis capítulos, distribuídos do seguinte modo: após este primeiro capítulo introdutório onde se expõe todo o enquadramento teórico, abordando cinco vírus: o Flavivírus, o Herpesvírus, o Influenza, o vírus da Variola Humana e o HIV, segue-se o segundo capítulo, que apresenta os objectivos do estudo. O terceiro capítulo refere-se aos materiais e métodos, onde se encontra a explicação do processo responsável pela reunião da literatura e o procedimento envolvido no estudo da prevalência da mutação do alelo $\Delta 32$ do co-receptor CCR5 numa população portuguesa com mais de 65 anos de idade. O quarto capítulo apresenta os resultados desta dissertação. O quinto expõe a discussão dos resultados obtidos e o sexto e último capítulo, apresenta as conclusões da pesquisa.

1. Flavivírus

1.1. Dados epidemiológicos

A família *Flaviviridae* é composta por três géneros o Flavivírus, o Pestivírus e o vírus da Hepatite C (HCV) (Puig-Basagoiti *et al.*, 2009). O género Flavivírus pode ser subdividido em diferentes estirpes de vírus como West Nilo Vírus (WNV), vírus do dengue, o vírus da febre amarela e o vírus da encefalite Japonesa (Ferreira e Sousa, 2002).

A nível epidemiológico, mais de 50 milhões de pessoas são infectadas pelo vírus do dengue, mais de 200.000 são infectadas com o vírus da febre-amarela e mais de 50.000 são infectadas com o vírus da encefalite Japonesa todos os anos (Gubler *et al.*, 2007). O WNV foi inicialmente identificado no Uganda em 1937 e espalhou-se para diversas partes de África, Ásia, Austrália, Canadá, México e América do Sul e desde 1999 que é responsável por duzentas infecções humanas só nos Estados Unidos da América (Kramer *et al.*, 2007). Estão actualmente à disposição vacinas para o vírus da febre amarela e da encefalite japonesa, no entanto, não foi, ainda, aprovada nenhuma terapêutica antiviral para o tratamento de infecções provocadas por nenhum Flavivírus (Kramer *et al.*, 2007).

1.2. O Flavivírus, as Flaviviroses e os Factores que afectam a actividade viral

A nível morfológico o Flavivírus é um vírus de Ácido Ribonucleico (RNA) de cadeia simples, de, aproximadamente, 50 nm de diâmetro (Chambers *et al.*, 1990) A maioria dos vírus deste género é transmitida biologicamente pela picada de vectores hematófagos, alguns podem ser transmitidos horizontalmente e por via transplacentária (Ferreira & Sousa, 2002).

A resposta imune induzida, tanto em ratos como em humanos, após uma infecção com Flavivírus é direccionada contra múltiplas proteínas virais (Brinton *et al.*, 1998).

A infecção por WNV é normalmente aguda, com febre característica e apenas uma pequena percentagem das infecções humanas resultam em doença neuro invasiva

(Campbell *et al.*, 2002). Normalmente o WNV não é detectado em órgãos periféricos como o coração, rins, fígado, pulmões ou músculos, mas em ratos com défices de Interferão α/β (IFN - α/β) foram detectadas elevadas quantidades do vírus nesses órgãos (Samuel & Diamond, 2005) bem como no soro e no Sistema Nervoso Central (SNC), o que está associado a uma significativa redução da sobrevivência dos neurónios infectados (Keller *et al.*, 2007). Isto demonstra o papel fundamental do IFN - α/β que não só controla a replicação do WNV, mas que também protege os neurónios dos efeitos prejudiciais da infecção (Keller *et al.*, 2007). Todavia as moléculas efectoras responsáveis pelo controlo da replicação do WNV durante a infecção ainda não estão completamente definidas (Keller *et al.*, 2007). A identificação destes compostos antivirais pode ser importante para o desenvolvimento de novas terapias não só contra o WNV, mas também contra outros vírus (Keller *et al.*, 2007).

Há, no entanto, factores não imunes que podem contribuir para uma resistência inata por parte do hospedeiro (Brinton, 1996).

Após investigação foi descoberto em ratos selvagens um gene que confere resistência específica ao Flavivírus (Brinton, 1996; Darnell, 1974). Este gene, denominado de Flv, foi mapeado, em ratos, no cromossoma 5 (Shallem *et al.*, 1993) e demonstrou ser herdado como alelo dominante (Brinton, 1998). Esta resistência não é específica de nenhum órgão (Brinton, 1998).

Foram realizados estudos acerca deste mecanismo de resistência em estirpes de ratos resistentes e susceptíveis e em culturas celulares. Os resultados mostraram que tanto os animais como as culturas celulares resistentes exibiram níveis virais mais baixos do que os susceptíveis após uma infecção com a mesma multiplicidade (Brinton, 1998). Observou-se ainda que mesmo sendo provocada imunossupressão nos animais resistentes, passando a infecção de não-letal a letal, o dia da morte era adiado e a concentração de vírus no cérebro dos resistentes era 1.000-10.000 vezes menor do que nos susceptíveis (Brinton, 1998).

Outros estudos indicam que culturas celulares, células resistentes e células susceptíveis são igualmente infectáveis, indicando que a redução de expressão em células resistentes não é resultado de uma entrada na célula menos eficaz (Brinton, 1998).

A comparação da replicação viral do Flavivírus em células resistentes e susceptíveis mostra uma síntese de RNA menos eficiente nas células resistentes, estes dados sugerem que o gene Flv actua ao nível da replicação viral (Brinton, 1998).

2. Herpesvírus

2.1. O Herpesvírus e patologias associadas

A família *Herpesviridae* é constituída por mais de cem vírus e pode ser dividida em três sub-famílias *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (Ferreira & Sousa, 2002).

A sub família *alphaherpesvirus* engloba o Herpesvírus Simples tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), o Porcine Pseudorabies Vírus (PRV) e o Bovine Herpesvirus (BHV) (Ono *et al.*, 2004).

As partículas do HSV estão envolvidas pela cápside icosaédrica, com 162 capsómeros, esta é ainda cercada por um invólucro, o genoma é Ácido Desoxirribonucleico (DNA) com cerca de 150 kpb (Ferreira & Sousa, 2002). O invólucro confere ao vírus grande fragilidade, o que pode comprometer o desenvolvimento de patogenia (Ferreira & Sousa, 2002). Os humanos são o único reservatório do HSV (Ferreira & Sousa, 2002). Este é transmitido por contacto directo (saliva, fluidos vesiculares e genitais), fômites (copos, escovas de dentes, etc.) e auto-inoculação (infecções oculares) (Ferreira & Sousa, 2002).

O HSV-1 tem uma prevalência na ordem dos 70-90% (Brandt, 2005). Este vírus provoca maioritariamente lesões ao nível da pele e mucosas que começam por um eritema local, progredindo posteriormente para o estado vesicular (Brandt, 2005). As vesículas ao romperem formam úlceras que curam sem originar cicatriz (Brandt, 2005). No entanto, em algumas ocasiões podem ocorrer situações letais, encefalites, infecção neonatal e infecção ocular (Whitley, 1996) - esta última é a principal causa de cegueira nos países desenvolvidos (Liesegang, 2001).

O HSV-2 origina lesões genitais e anais e é transmitido, principalmente, por contacto sexual, razão pela qual, ocorre, geralmente, em indivíduos adultos (Ferreira & Sousa, 2002).

No decorrer da replicação do HSV-1, nas células do epitélio em locais periféricos da infecção, o vírus tem acesso à terminação nervosa local e é transportado por transporte retrógrado axonal até ao núcleo dos neurónios, dentro dos gânglios sensoriais (Khanna *et al.*, 2004). O HSV-1 contamina a mucosa orofaríngea, o vírus instala-se nos gânglios do trigémio. O HSV-2, por sua vez, contamina a região genital e mantém-se nos gânglios sagrados (Ferreira & Sousa, 2002). Aí ocorre replicação do vírus e estabelece-se de seguida uma infecção latente, que persiste durante toda a vida do indivíduo (Khanna *et al.*, 2004). Esta é definida clinicamente como uma situação em que o genoma funcional viral é mantido no interior das células do hospedeiro, mas não ocorre replicação viral (Khanna *et al.*, 2004). A elevada taxa de infecções primárias clinicamente silenciosas e a capacidade de entrar em estado de latência dificultam o controlo da infecção (Brandt, 2005). Na ausência de lesões, a latência do vírus pode permitir derramamento assintomático e por consequência a transmissão a um novo hospedeiro (Brandt, 2005). A recorrência acontece em aproximadamente 50% dos casos. A gravidade e duração da infecção dependem, em parte, do estado imunológico do hospedeiro (Ferreira & Sousa, 2002). Em imunocompetentes as lesões desaparecem em menos de três semanas, não deixando cicatriz, em imunodeprimidos, tanto a primo-infecção como as infecções recorrentes, podem provocar quadros bastante graves e até, em certos casos, originar disseminação do vírus, chegando mesmo ao SNC (Ferreira & Sousa, 2002).

Os antivirais podem ser úteis no tratamento das lesões, mas nada fazem para eliminar a latência do vírus, que permite o desencadear da replicação viral logo que o hospedeiro seja exposto a stress emocional ou físico, ou a deficiências do sistema imunológico (Khanna *et al.*, 2004), como défices imunológicos herdados ou adquiridos, tratamentos de quimioterapia e transplante de órgãos (Brandt, 2005). Para reduzir a recorrência das lesões pode ser efectuado um tratamento profilático com antivirais (Brandt, 2005).

2.2. Factores que afectam a actividade viral

2.2.1. O código genético do hospedeiro

O código genético do hospedeiro pode directa ou indirectamente induzir mecanismos que influenciam a efectividade do vírus. Sabendo que uma redução da concentração viral pode prevenir a doença, os mecanismos desenvolvidos não necessitam de eliminar ou imobilizar totalmente o vírus para evitar lesões (Brandt, 2005).

Foram já efectuados diferentes estudos com o objectivo de encontrar um gene ou um conjunto de genes responsáveis por fenómeno de resistência, mas nenhum deles conseguiu chegar a um resultado claro. Os primeiros sugeriram que um gene sem relação com o *Histocompatibility Complex* (MHC) desempenhou um papel importante numa infecção provocada por meio de uma injeção intraperitoneal (Lopez, 1975). Estudos posteriores demonstram um papel relevante na resistência à infecção por parte do locus do MHC numa infecção da pele (Kastrukoff *et al.*, 1986). Num outro estudo, de infecção ocular em ratos, um novo locus autossómico dominante de resistência, o *Locus* de Resistência ao Herpes (HRL) foi identificado e mapeado no cromossoma 6 de ratos (Lundberg *et al.*, 2003). O seu mecanismo de acção, tanto quanto a autora pôde pesquisar, não foi determinado, necessitando de estudos mais aprofundados. Sabe-se apenas que afecta a replicação viral em tecido ocular e neuronal (Brandt, 2005). A sua acção pode ser desviada pelo *locus* SML, aumentando a resistência em fêmeas (Brandt, 2005). O gene codificado pelo SML não foi ainda mapeado, o que leva a um desconhecimento dos mecanismos envolvidos, mas sabe-se que a administração de diidrotestosterona em ratos do sexo feminino reduz sua resistência, sugerindo que a função hormonal está envolvida (Brandt, 2005). Também foram determinados *loci* nos cromossomas 4, 5, 12, 13 e 14 que parecem ter influência na susceptibilidade/resistência ao HSV em geral, por outro lado *loci* dos cromossomas 10 e 17 parecem ser específicos da infecção ocular (Norose *et al.*, 2002).

3. Influenza vírus

3.1. O Influenza vírus

A gripe é a mais contagiosa das doenças respiratórias e pode ser debilitante, conduzir à hospitalização e até mesmo à morte (Zhang *et al.*, 2009). O agente etiológico desta doença infecciosa é o Influenza vírus, de RNA de cadeia simples (Palese e Shaw, 2007). Das três estirpes (A, B e C) apenas a A e a B causam doença epidémica humana, sendo que a estirpe A é a causadora de todas as pandemias víricas (Zhang *et al.*, 2009). O seu genoma consiste em 8 segmentos separados, que codificam 10 a 11 proteínas, protegido pela nucleocápside (McGeoch *et al.*, 1976). Os viriões estão circundados por um envelope que suporta as glicoproteínas de superfície Hemaglutinina (HA) e Neuraminidase (NA) que são responsáveis pela ligação do vírus ao receptor nas células do hospedeiro e pela libertação de viriões descendentes para as células do hospedeiro, respectivamente, são também o alvo da resposta de anticorpos do hospedeiro (Zhang *et al.*, 2009).

Esta infecção vírica tem associados sintomas respiratórios e activa as citocinas Interleucina-6 (IL-6), Factor de Necrose Tumoral – α (TNF- α) e INF, que contribuem para efeitos sistémicos, febre e mialgias (Peiris *et al.*, 2010). A desregulação do sistema imunitário inato leva a quadros mais complicados como encefalite necrótica aguda e aumento do risco de doenças cardiovasculares (Mizuguchi *et al.*, 2007; Warren-Gash *et al.*, 2009). A infecção concomitante com uma bactéria constitui o maior factor de risco para a morbidade e mortalidade nas infecções sazonais e pandemias do passado, incluindo a gripe de 1918 (Taubenberger e Morens, 2008).

3.2. Factores que afectam a actividade viral

3.2.1. Código genético do hospedeiro

Estudos determinados a aprofundar esta matéria encontraram diferentes *loci* nos cromossomas 2, 7, 11, 15 e 17 que estão associados à resistência ao H5N1 (Boon *et al.*, 2000), contudo o mecanismo responsável pela resistência ainda não foi desvendado.

4. Variola Humana

4.1. O vírus da Variola Humana

A *Smallpox*, pertence à família *Poxviridae* (Mahalingam, Damon e Lidbury, 2004), possui DNA de cadeia dupla e é o agente etiológico da Variola Humana, uma patologia infecciosa conhecida há mais de dois milénios que teve, provavelmente origem na Índia ou Ásia ocidental, disseminando-se no séc. VIII a.C. pelo resto da Ásia, Europa e norte de África (Ferreira & Sousa, 2002).

A variola foi o motor para a elaboração da primeira vacina, desenvolvida por Eduard Jener em 1796, o qual percebeu que os tratadores de gado que eram infectados com outro poxvírus, o da variola bovina, ganhavam uma lesão benigna, frequentemente nas mãos e adquiriam, assim, imunidade ao vírus da Variola Humana (Ferreira & Sousa, 2002). O acto da vacinação foi inicialmente denominado de variolação, sofrendo mais tarde adaptações (Ferreira & Sousa, 2002). O microorganismo usado na produção de vacinas era inicialmente o vírus da variola bovina, actualmente é utilizado um vírus atenuado, distinto do vírus da variola bovina, mas geneticamente, mais semelhante ao da variola humana (Ferreira & Sousa, 2002).

A variola causa estados febris e vesículas cutâneas em humanos e animais e matou aproximadamente 500 milhões de pessoas no séc. XX (Mahalingam, Damon e Lidbury, 2004).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a variola foi erradicada em 1979, sendo o último caso apontado para a Somália em 1977 (Mahalingam, Damon e Lidbury, 2004). Este feito foi conseguido devido à vacinação em massa e também a características intrínsecas do vírus, como o facto de o vírus da Variola não ter hospedeiros que não sejam humanos, de causar elevada e rápida mortalidade e morbidade, de o contacto com outros orthopoxvírus ser capaz de conferir imunidade, de não haver latência viral e de não ser infeccioso antes das lesões aparecerem (Mahalingam, Damon e Lidbury, 2004).

5. Vírus de Imunodeficiência Humana (HIV)

5.1. O HIV

Os agentes etiológicos do Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) são os lentivírus HIV-1 e HIV-2, estes diferem entre si na severidade das infecções, no período de latência, na capacidade de transmissão e localização geográfica (Ferreira & Sousa, 2002).

As partículas virais exibem estrutura esférica e estão circundadas por um invólucro de natureza lipídica, onde está fixa a gp41, que é uma glicoproteína transmembranar, que sustenta na sua extremidade N-terminal a glicoproteína de superfície gp120 (Ferreira & Sousa, 2002). Estas duas glicoproteínas medeiam o processo de penetração nas células alvo. A gp120 liga-se especificamente ao CD₄⁺ e aos receptores das quimiocinas, como o CCR5 (Ferreira & Sousa, 2002). Após esta etapa a gp41, por meio do péptido de fusão, interage com a membrana citoplasmática modificando-a para dar início ao processo de fusão (Ferreira & Sousa, 2002).

5.2. A infecção causada pelo HIV

O relatório da OMS e do Programa das Nações Unidas para o HIV/SIDA publicado em 2010 relativo aos números de 2009 revelou que aproximadamente 33,3 milhões de pessoas vivem com HIV, que foram identificados 2,6 milhões de novas infecções e que morreram 1,8 milhões de cidadãos nesse ano (OMS, 2010).

O mesmo relatório revela ainda que são detectados mais de 700 novos casos diários de infecção por HIV e que 97% destas infecções surgem em países pobres ou em vias de desenvolvimento (OMS, 2010).

As principais formas de contágio de HIV são o contacto com secreções genitais infectadas, por meio de relações sexuais, com sangue ou derivados também infectados, por transmissão vertical (este tem vindo a diminuir devido à administração de anti-retrovirais nas últimas semanas de gravidez) e ainda o leite materno (Ferreira & Sousa, 2002).

O HIV tem tropismo para monócitos, macrófagos e linfócitos T-*helper*, pois estes expressam à sua superfície o receptor CD₄⁺ (Ferreira & Sousa, 2002). A replicação viral nestas células vai destruí-las ou alterar o seu funcionamento, o que resulta numa redução da eficácia da resposta imunológica (Ferreira & Sousa, 2002). A sua enorme capacidade de gerar mutantes, devido aos erros cometidos pela transcriptase reversa viral durante o ciclo replicativo, e a não produção de partículas virais por parte de linfócitos T CD₄⁺ infectados, conduzem à total ineficácia do sistema imunológico no combate ao vírus (Ferreira & Sousa, 2002).

A infecção por HIV tem diferentes fases de evolução clínica, fase aguda ou de infecção primária, fase assintomática ou de latência clínica, fase sintomática precoce e fase sintomática ou fase SIDA (Ferreira & Sousa, 2002). A fase SIDA é caracterizada por uma contagem de células T CD₄⁺ inferior a 200µL (Ferreira & Sousa, 2002). Neste período a carga viral dispara para valores elevadíssimos (Ferreira & Sousa, 2002). A progressão da infecção para esta fase depende de factores como, concentração de carga viral, preservação da arquitectura dos nódulos linfáticos, elevada actividade citolítica mediada pelos linfócitos CD₈⁺, presença de variantes monocitotrópicos do HIV, *background* genético do infectado, presença de co-infecções múltiplas, estirpe viral, factores do hospedeiro e ambientais (Ferreira & Sousa, 2002). Como factor ambiental os homossexuais e os utilizadores de drogas ilícitas constituem o primeiro e segundo grupos, respectivamente, onde a infecção por HIV é mais prevalente (Holmberg, 1996 e Leshner, 1999). No entanto, sabe-se hoje, que a transmissão heterossexual tem vindo a aumentar todos os anos e que actualmente é superior à homossexual (Ferreira & Sousa, 2002).

O HIV utiliza receptores das quimiocinas, como o CCR5, para entrar nas células alvo (Chen *et al.*, 1997 e Platt *et al.*, 1998). Polimorfismos genéticos nestes receptores alteram a expressão do vírus, o que se espelha na capacidade de infecção e de progressão (Kageyama *et al.*, 2002 e John, 2001).

5.3. O CCR5

O CCR5 é um receptor acoplado à proteína G (Mueller e Strange, 2004) constituído por 352 aminoácidos e tem uma massa molecular de 40,6 kDA (Combadiere *et al.*, 1996).

Encontra-se à superfície das células do sistema imunológico (Carrington *et al.*, 1997) e os seus ligandos são: RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β (Samson *et al.*, 1996) controlando assim o desenvolvimento, recrutamento e activação dos linfócitos, representando um papel fundamental na resposta imune contra muitos patógenos (Dragic *et al.*, 1996). A este receptor ligam-se as glicoproteínas do envelope apenas da estirpe M-trópica do HIV-1 (Alkhatib *et al.* 1996; Choe *et al.* 1996; Deng *et al.* 1996; Doranz *et al.* 1996; Dragic *et al.* 1996].

O CCR5 é expresso em linfócitos T efectores e de memória, em monócitos, macrófagos e células dendríticas. O *locus* do gene que o codifica encontra-se no cromossoma 3p21 (Mueller e Strange, 2004 e Liu *et al.*, 1996].

5.4. O CCR5 Δ 32

A depleção de 32 nucleótidos na região que codifica o segundo *loop* externo do cromossoma que codifica o CCR5 causa um *frameshift* e a introdução de um codão *stop* prematuro. Logo, a proteína codificada pelo alelo extraído não é traduzida (Liu *et al.*, 1996). Indivíduos que apresentem homozigotia para esta mutação são resistentes à infecção por HIV-1, mesmo após exposição contínua ao agente etiológico (Liu *et al.*, 1996). Podem ser registadas excepções quando a estirpe em causa utiliza a molécula CXCR4 como co-receptor das células alvo (Samson *et al.*, 1996). Indivíduos heterozigóticos estão sujeitos à infecção por HIV-1, mas apresentam um atraso de 2 a 4 anos no que diz respeito à progressão para a fase SIDA (Stumpf *et al.*, 2004).

5.5. A origem e propagação da mutação

Os estudos iniciais acerca da origem da mutação estimaram que a idade da mutação seria de 700 (Stephens *et al.*, 1998) a 1700 anos (Libert *et al.*, 1998) (com intervalo de 275 a 1875 e 375 a 3675, respectivamente). Estes correlacionaram também a idade estimada com pragas epidémicas históricas (Stephens *et al.*, 1998), afirmando que a pressão selectiva exercida sobre a mutação é da responsabilidade da *Yersinia pestis*, agente etiológico da Praga Bubónica, vulgo Peste Negra (Stumpf e Wilkinson-Herbots, 2004). Pesquisas posteriores, utilizando modelos matemáticos, descrevem da ligação

entre a *Y. pestis* e a mutação, enfatizando uma possível conexão com a *Smallpox*, agente etiológico da Variola Humana (Stumpf e Wilkinson-Herbots, 2004). Para tal basearam-se nos efeitos cumulativos deste vírus, que dizimou maior número de indivíduos, de qualquer idade, saudáveis ou doentes, o que interferiu com o potencial reprodutivo da espécie humana, enquanto que a *Y. pestis* foi fatal principalmente para idosos e doentes (Stumpf e Wilkinson-Herbots, 2004). Esta pesquisa estimou a idade do alelo para aproximadamente 1100 anos (Stephens *et al.*, 1998). Um estudo, de Libert e colaboradores, baseado em diversos microsátélites ligados ao gene do CCR5, concluiu que a mutação ocorreu pela primeira vez acerca de 2000 anos atrás (Libert *et al.*, 1998). No entanto, um estudo mais recente que incluiu marcadores com 32 pequenos polimorfismos nucleares estimou que a idade do CCR5 $\Delta 32$ é de 5075 anos (Sabeti *et al.*, 2005). Este facto é enfatizado por uma análise do DNA de um esqueleto alemão da idade do bronze, que sugere que a mutação tem pelo menos 2900 anos (Hummel *et al.*, 2005), e ainda por um recente estudo de DNA escandinavo da era Mesolítica que concluiu que a primeira mutação deverá ter ocorrido cerca de 5000 anos a.C. (Lidé *et al.*, 2006).

A frequência de CCR5 $\Delta 32$ é mais elevada no norte da Europa, nas zonas circundantes do Báltico e do Mar Branco e na Rússia central, com valores superiores a 15% e sofrendo um decréscimo gradual até ao sul, estando os valores mais baixos presentes no Mediterrâneo (Córsega, Sicília, Sardenha e Creta) (Faure e Royer-Carenzi, 2008). Fora da Europa, apenas se registam valores em regiões vizinhas (Faure e Royer-Carenzi, 2008). Está ausente na África subsariana, este e sudeste da Ásia, América e Oceânia (Faure e Royer-Carenzi, 2008). Facto que pode ser geograficamente visualizado na figura 1.

O facto de o CCR5 $\Delta 32$ ter uma frequência elevada em caucasianos e ser raro ou inexistente em não-caucasianos, levou à especulação de que a mutação teria acontecido apenas uma vez num grupo étnico caucasiano ancestral, posteriormente ao isolamento continental dos caucasianos dos seus ancestrais africanos (Dean *et al.*, 1996, O'Brien e Dean, 1997, Stephens *et al.*, 1998 e Galvani e Novembre, 2005). Antropólogos moleculares estimam que a data da separação é de, aproximadamente, 200.000 anos (com uma janela de 143.000-298.000 anos) (Cann *et al.*, 1987; Vigilant *et al.*, 1991;

Stoneking *et al.*,1992; Ruvolo *et al.*,1993;Goldstein *et al.*,1995; Horai *et al.*,1995; von Haeseler *et al.*,1996).

Existem de igual modo teorias que, com base na distribuição geográfica do alelo, defendem que este apareceu pela primeira vez na Escandinávia (Libert *et al.*, 1998) ou pelo menos que a selecção foi mais forte nesse país. Os *Vikings* podem ter sido os responsáveis pela disseminação da mutação desde esta região até aos restantes países Europeus (Lucotte e Dieterlen, 2003). Pois durante a era *Viking* (século VIII ao século X) estes dominavam os países Escandinavos e tinham grande influência costeira em diversos países Europeus, como França, Espanha e Inglaterra (Lucotte e Dieterlen, 2003).

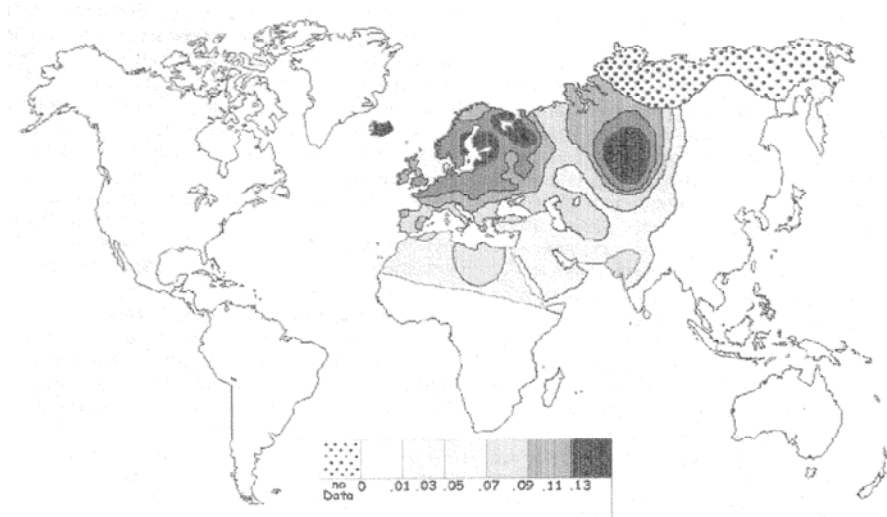


Figura 1. Prevalência da mutação a nível mundial (adaptado de Faure e Royer-Carenzi, 2008).

II. OBJECTIVOS

1. Objectivo Geral

Estudo de mecanismos inatos de resistência a infecções virais.

2. Objectivos Específicos

- Revisão da informação existente na literatura científica;
- Identificação dos mecanismos de resistência mais frequentes;
- Estudo da prevalência da mutação $\Delta 32$ do gene que codifica o co-receptor CCR5 numa população portuguesa com mais de 65 anos de idade;
- Comparação da prevalência da mutação em várias populações Europeias.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Revisão da informação existente na literatura científica

Foi realizada uma revisão sistemática em Janeiro de 2011 baseada na pesquisa de artigos científicos nas bases de dados *Pubmed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) e *sciencedirect* (<http://www.sciencedirect.com/>) com o auxílio das seguintes palavras-chave: CCR5; CCR5 HIV; *Chemokine receptor CCR5*; $\Delta 32$ allele; CCR5 resistance; Flavivírus flv; herpes virus *genetics resistance*; smallpox *human innate resistance*; influenza *human innate resistance*. Desta pesquisa resultaram 62 artigos científicos, dos quais se recolheram diferentes dados como, vírus incidente, autor, jornal, ano de publicação, tema central, população-alvo, mecanismo de resistência, molécula chave e conclusões. Estas informações foram fornecidas pelo *abstract* de cada artigo e serviram para o preenchimento da Tabela presente no Anexo 1. Aos artigos foram aplicados os seguintes critérios de inclusão: data de publicação (1996-2010), tema central do artigo estar, obrigatoriamente, de acordo com o tema em discussão e a resistência discutida ser considerada exclusivamente inata. Foram assim excluídos 29 artigos científicos. A figura 2 mostra que os restantes 33 artigos foram distinguidos por vírus, sendo que cinco se referem ao Flavivírus, três ao herpesvirus, quatro ao influenza vírus, um a Smallpox e vinte ao HIV.

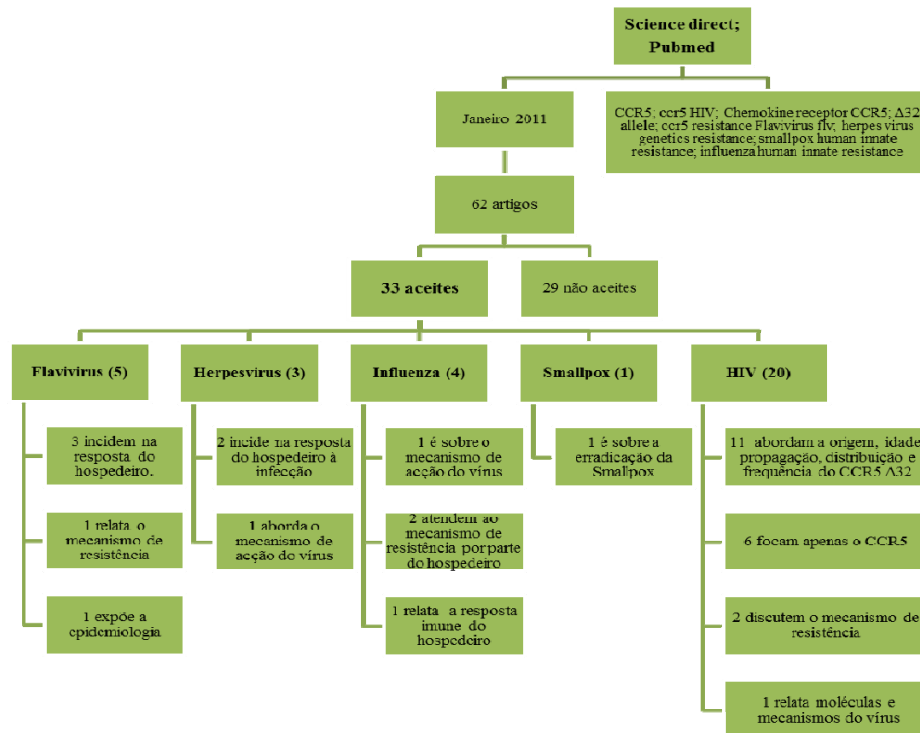


Figura 2. Fluxograma que distingue os artigos consoante o vírus.

2. Estudo da prevalência da mutação $\Delta 32$ do gene que codifica o co-receptor CCR5 numa população portuguesa com mais de 65 anos de idade

2.1. Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pela comissão de ética da Universidade Fernando Pessoa, sendo seguidas as recomendações da Declarações de Helsínquia para elaboração de trabalho de investigação.

2.2. População em estudo

Para a pesquisa da mutação do alelo $\Delta 32$ do gene que codifica o co-receptor CCR5, no dia 24 de Junho de 2011, na localidade de Lebução, Valpaços, foram recolhidas amostras de saliva numa população com idade compreendida entre os 66 e os 91 anos. A colheita foi efectuada pela autora do presente estudo, de forma padronizada, recorrendo às instruções do fabricante do *Kit* usado para esse efeito (*eSwab, Brescia, Itália*).

Todos os inquiridos colaboraram de forma voluntária após explicação do objectivo e das condições do estudo.

A inclusão dos participantes foi efectuada após consentimento informado, em conformidade com os procedimentos éticos [Anexo 2].

Os critérios de inclusão aplicados foram: indivíduos de ambos os sexos; com idade superior a 65 anos; com vida activa, sem registo de doença infecciosa provocada por HIV; preenchimento de um questionário correspondente à amostra cedida [Anexo 2]. Foram excluídos do estudo as amostras com resultado nulo para a pesquisa de CCR5 $\Delta 32$.

2.3. Colheita da amostra

O sistema de colheita e transporte utilizado foi o *Copan Liquid Amies Elution Swab (ESwab, Brescia, Itália)*. Este pode ser utilizado para colheita e transporte de amostras clínicas que contêm bactérias aeróbias, anaeróbias e fastidiosas, Clamídias e Vírus. O

Kit de colheita é composto por uma embalagem estéril, que contém um tubo de ensaio de fundo cônico, etiquetado e preenchido com 1mL de meio de transporte, responsável pela conservação da amostra, e um pacote estéril contendo uma zaragatoa com ponta de fibra de *nylon* suave (eSwab, 2006).

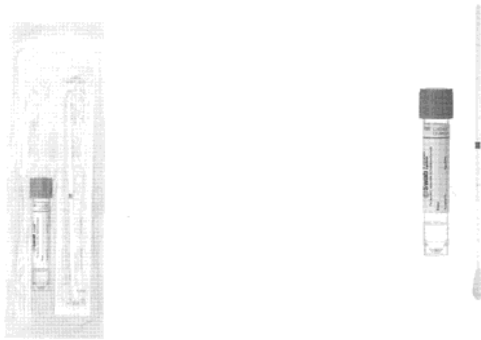


Figura 3. Ilustração do *Kit* de colheita usado. (adaptado de eSwab, 2006)

De acordo com as instruções do *Kit*, a colheita consiste em abrir a bolsa exterior, retirando o tubo de ensaio e a bolsa da zaragatoa; abrir a bolsa da zaragatoa; fazer a colheita e introduzir a zaragatoa no tubo de ensaio previamente aberto; cortar a haste da zaragatoa pela zona colorida; fechar o tubo de ensaio até completo isolamento e preencher na etiqueta os dados da amostra (Figura 4).

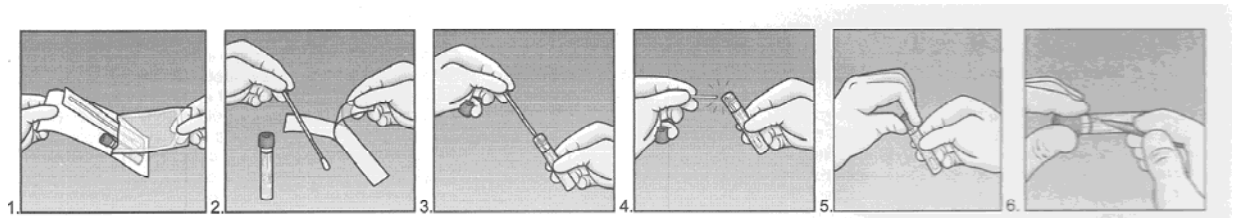


Figura 4. Procedimento de utilização do ESwab de acordo com o fabricante (adaptado de eSwab, 2006).

Ao enroscar a tampa no tubo de ensaio a haste partida da zaragatoa encaixa firmemente para que ao se desenroscar e tirar a tampa do tubo a zaragatoa venha acoplada e o procedimento laboratorial seja mais fácil (Figura 5).

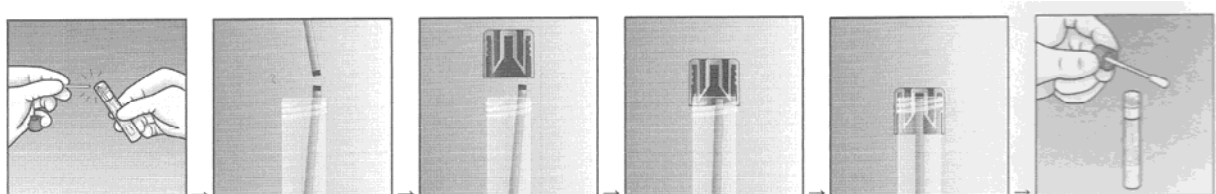


Figura 5. Pormenor da haste a partir (adaptado de eSwab, 2006).

3. Procedimentos laboratoriais

3.1. Processamento das amostras

Após a recolha das salivas as amostras foram mantidas a -20°C até serem processadas laboratorialmente.

3.2. Isolamento de ácidos nucleicos

A extracção de DNA das salivas foi realizada com o *Kit* comercial *QiAamp DNA Blood mini Kit* (*Qiagen, Hilden, Alemanha*) e de acordo com as instruções do fabricante (*Qiagen, 2010*).

3.3. Detecção e genotipagem da mutação CCR5 Δ 32 por *Polymerase Chain Reaction*

Foi amplificada uma porção do gene que codifica o CCR5 com recurso à técnica da PCR, utilizando *primers* que ladeiam a deleção de 32 nucleótidos (CCR532-A: 5'-CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACC-3' e CCR532-B: 5'-CCTGTGCCTCTTCTTCTCATTTCG-3'). Os genes sem mutação e os que sofreram a deleção têm, respectivamente, 189 e 157 pb.

A reacção de amplificação continha 10 ng de DNA, 0,5U Taq DNA Polimerase (*MBI Fermentas, #EP0402*) e o respectivo Tampão de Reacção, 2,5 mM de MgCl₂ (*MBI Fermentas*), 0,2 mM de dinucleosídeos trifosfatados (dNTPs) (*MBI Fermentas, #R0192*) e 0,2 μ M de cada *primer*. As reacções de amplificação foram efectuadas no termociclador programável *Bio-Rad MyCyclerTM* (*Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos da América*) num volume total de 25 μ L. As condições de amplificação foram as seguintes: 5 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1,5 min a 72°C; 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 60°C e 45s a 72°C.

ELECTROFORESE EM GELE DE AGAROSE DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Para verificar a amplificação dos fragmentos de DNA, 10 μ L dos produtos obtidos por PCR foram analisados por electroforese em geles de agarose a 2,5% (p/v), corados com *Sybr Safe* (Invitrogen). De seguida, os geles foram visualizados utilizando transiluminador (*Quantity one, Bio-Rad*) de luz ultra-violeta e com suporte de programa informático. A figura abaixo ilustra um gele que exhibe a mutação CCR5 Δ 32 em heterozigótica.

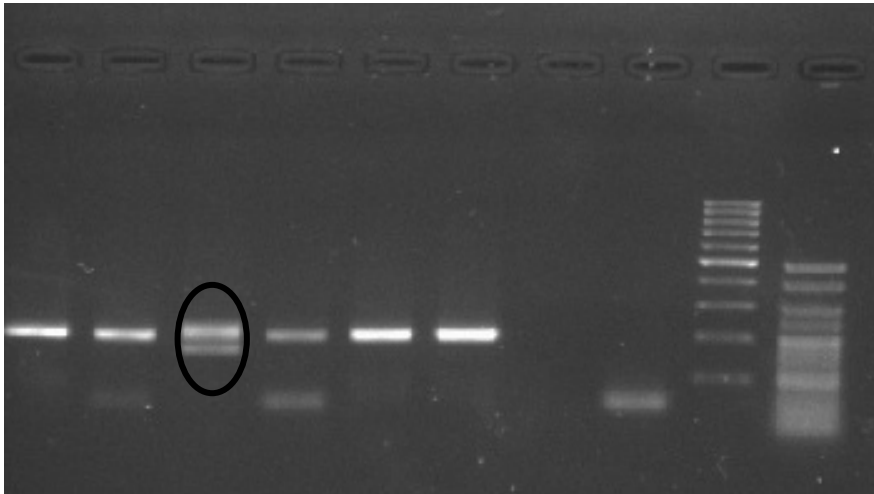


Figura 6. Gele de agarose visualizado sob luz ultra-violeta, exibindo a mutação em heterozigotia.

4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao programa informático *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão para *Windows* 18.0. O teste Qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para comparar as frequências entre as diferentes variáveis e para calcular o p . O valor de p foi considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0,05. As variáveis incluídas neste estudo foram as seguintes: sexo, nacionalidade dos ascendentes, susceptibilidade às doenças víricas infantis, a toma regular da vacina contra a gripe sazonal, a susceptibilidade ao vírus da gripe asiática, hábitos tabágicos e a presença ou não de excesso de peso.

IV. RESULTADOS

1. Revisão da informação existente na literatura científica

A revisão sistemática feita para possibilitar a reunião da literatura resultou na obtenção de 33 artigos proveitosos, sendo que, tal como a figura 7 indica, cinco referem-se ao Flavivírus, três ao Herpesvírus, quatro ao Influenza vírus, um ao vírus da Variola Humana e vinte ao HIV.

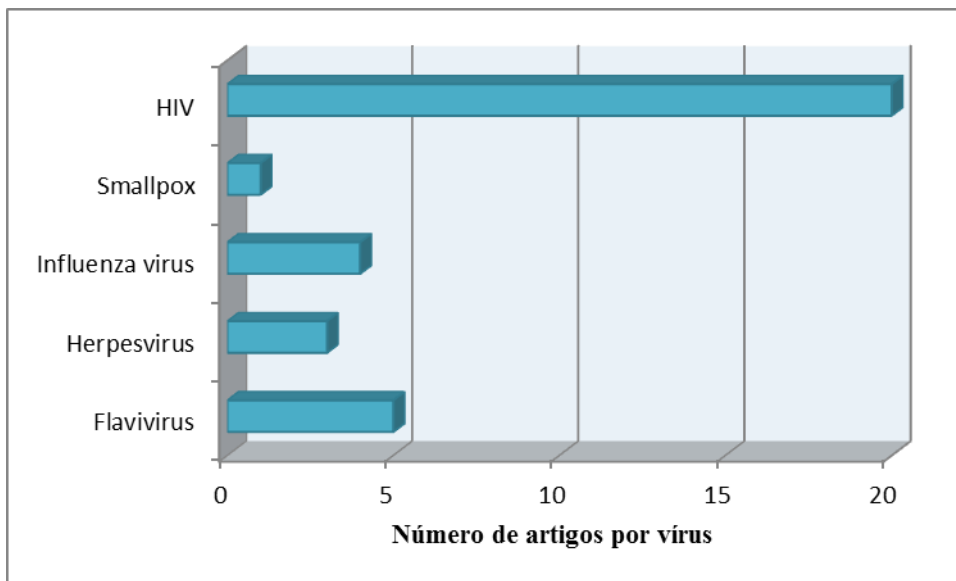


Figura 7. Número de artigos por vírus.

A pesquisa bibliográfica foi realizada em Janeiro de 2011 e incluiu artigos publicados entre 1996 e 2010. Como pode ser observado na figura 8, o ano que reúne maior publicação de artigos desta matéria é 2004, mantendo-se a publicação constante nos restantes anos.

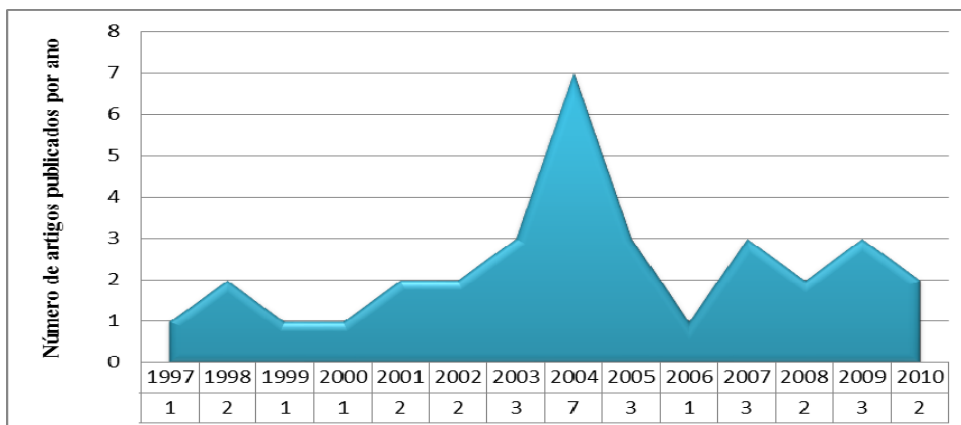


Figura 8. Quantidade de artigos publicados por ano.

Após a análise integral dos 33 artigos estes foram organizados por tema da seguinte forma:

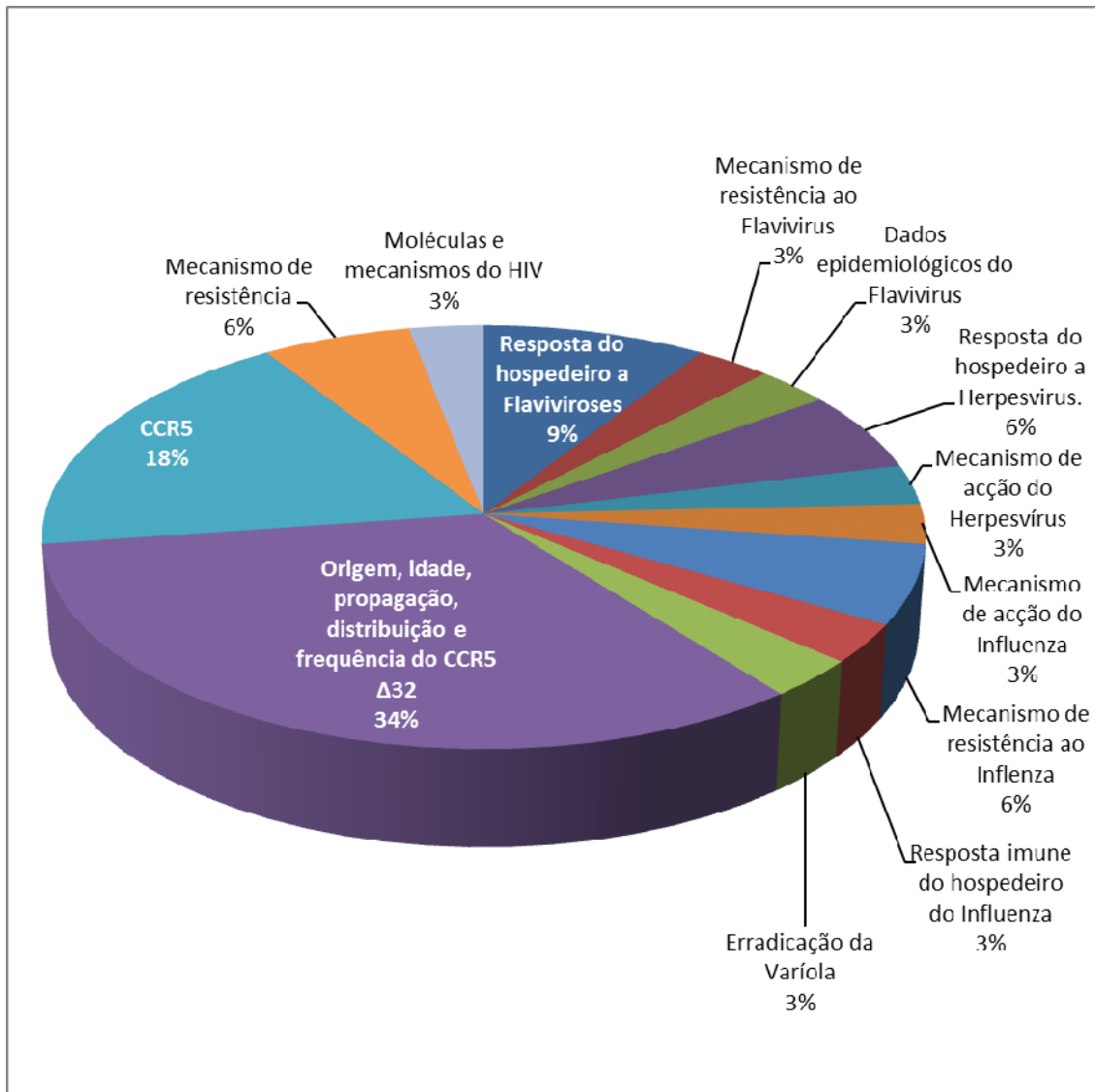


Figura 9. Temas abordados nos artigos analisados.

A figura 9 mostra que o tema mais abordado nos artigos científicos seleccionados é "Origem, idade, propagação, distribuição e frequência do CCR5 Δ 32" com 34% seguido dos artigos sobre o "CCR5" com 18% e da "Resposta do hospedeiro a Flaviviruses" com 9%.

Com 6% dos artigos que foram organizados ficaram três temas: "Resposta do hospedeiro a Herpesvirus", "Mecanismo de resistência ao Influenza" e "Mecanismo de resistência". Os restantes temas rondam todos os 3%.

2. Identificação dos Mecanismos mais Frequentes

Através da análise bibliográfica foram identificados os mecanismos responsáveis pela resistência inata do hospedeiro aos vírus estudados, com exceção do vírus da Variola Humana.

A mutação responsável pela resistência do hospedeiro à infecção por HIV é a deleção de 32 nucleótidos no gene que codifica o CCR5, receptor primário do vírus no organismo (Liu *et al.* 1996).

A resistência inata ao Flavivírus é provocada pelo gene Flv localizado no cromossoma 5 dos ratos (Shallem *et al.*, 1993), o qual, segundo os dados, actua ao nível da replicação viral (Brinton, 1998).

Os mecanismos responsáveis pela resistência inata a vírus como Influenza vírus ou Herpesvírus são ainda pouco documentados. Desta pesquisa resultou a informação de que diferentes mutações em diferentes cromossomas poderiam ser responsáveis por quadros de resistência inata do hospedeiro a algumas estirpes de cada um dos diferentes vírus.

O vírus da Variola Humana, a *Smallpox*, está erradicado desde 1979 (Mahalingam, Damon & Lidbury 2004) e não foram encontrados, nesta revisão bibliográfica, registos científicos que tratem de mecanismos de resistência inata do hospedeiro a este vírus.

A figura 10 relata a quantidade de artigos seleccionados que se debruçam apenas sobre os mecanismos acima referidos. Assim, 57,58 % dos artigos aceites incidem no CCR5 Δ 32, 9,09 % no gene Flv, 6,06% em diferentes mutações que ao ocorrerem em determinados genes conferem resistência à infecção por Herpesvirus, 3,03% em mutações que atribuem resistência a infecções por Influenza vírus e como referido antes não foi encontrada qualquer informação no que concerne à resistência inata ao vírus da Variola Humana.

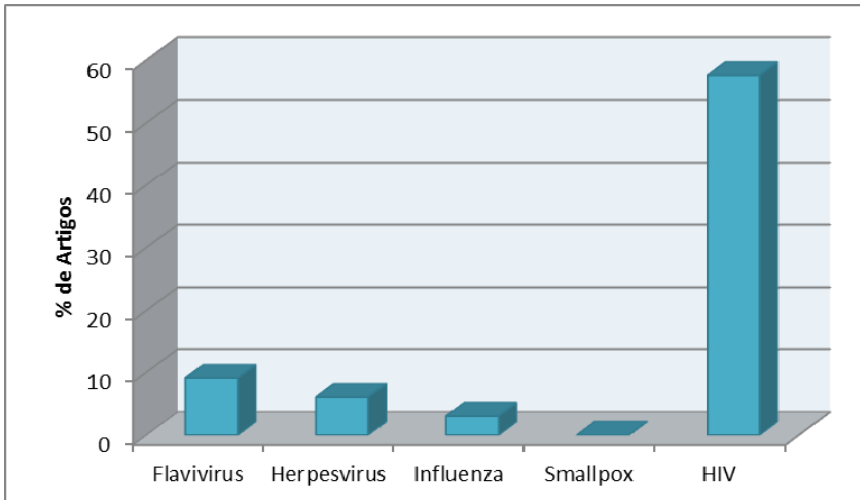


Figura 10. Percentagem de artigos encontrados referentes aos mecanismos de resistência característicos de cada vírus.

3. Estudo da prevalência da mutação $\Delta 32$ do gene que codifica o co-receptor CCR5 numa população portuguesa com mais de 65 anos de idade

O estudo realizado em Valpaços, no mês de Junho do corrente ano, incidente na pesquisa da mutação CCR5 $\Delta 32$, baseou-se na recolha de 50 salivas, destas 3 foram excluídas por não exibirem qualquer resultado. Os participantes eram indivíduos voluntários com média das idades 78,4 anos, dos quais 32 eram do sexo feminino e 15 do sexo masculino. Destes 42 não possuíam a mutação, e 5 exibiram a mutação em heterozigotia. De acordo com estes valores obteve-se a seguinte figura:



Figura 11. Amostras portadoras da mutação.

O preenchimento de um questionário no acto da colheita, com dados dos participantes e a análise da saliva correspondente resultou na seguinte tabela:

Tabela 1. Associação das variáveis com os resultados obtidos.

		TOTAL	Wt/Wt	Wt/del32	χ^2	<i>p</i>
			N (%)	N (%)		
IDADE ± nd			77,5 ± 5,5	78,2 ± 3,11		
Sexo	M	15	12 (80%)	3 (20%)	2,0	0,154
	F	32	30 (93,8%)	2 (6,2%)		
Tem Ascendentes estrangeiros	S	2	2 (100%)	0	0,26	0,609
	N	43	38 (88,4%)	5 (11,6%)		
Sofreu de doenças víricas infantis	S	24	22 (91,7%)	2 (8,3%)	0,06	0,806
	N	16	15 (93,8%)	1 (6,2%)		
Toma regularmente a vacina da gripe	S	35	32 (91,4%)	3 (8,6%)	0,80	0,371
	N	11	9 (81,8%)	2 (18,2%)		
Tive gripe asiática (1957)	S	5	3 (60%)	2 (40%)	4,64	0,031
	N	20	19 (95%)	1 (5%)		
Fumador	S	5	3 (60%)	2 (40%)	5,07	0,024
	N	42	39 (92,9%)	3 (7,1%)		
Tem excesso de peso	S	3	3 (100%)	0	0,38	0,536
	N	44	39 (88,6%)	5 (11,4%)		

De acordo com a Tabela 1 o sexo não é uma variável significativa ($p= 0,154$) e o facto de alguns destes indivíduos serem descendentes de pessoas estrangeiras também não é significativo ($p= 0,609$). A susceptibilidade às doenças víricas infantis também não apresenta ligação com a mutação ($p= 0,806$), a toma regular da vacina da gripe ($p= 0,371$) e o excesso de peso ($p= 0,536$) também não se apresentam como variáveis significativas. Apenas a susceptibilidade inata para o vírus Influenza H₂N₂ – Gripe Asiática 1957 ($p= 0,031$) e o factor adquirido do hábito tabágico ($p= 0,024$) se revelam variáveis significativas. Assim, 40% dos que sofreram de gripe asiática são

heterozigóticos para a mutação e apenas 5% dos que não sofreram da mesma são igualmente heterozigóticos para a mutação; 40% dos inquiridos que fumam apresentam a mutação em heterozigotia e apenas 7,1% dos que não fumam apresentam a mutação.

4. Comparação da prevalência da mutação em várias populações Europeias

Tabela 2. Frequência do CCR5 Δ 32 em diferentes populações Europeias.

Latitude	Local	N	Wt/Wt	Wt/ Δ 32	Δ 32/ Δ 32	Frequência alélica Δ 32	Referência
64°	Islândia	102	75 (73,5%)	24 (23,5%)	3 (2,9%)	0,147	Martinson, 1997
63°	Suécia - Umea	204	152 (74,5%)	46 (22,5%)	6 (2,9%)	0,142	Libert , 1998
63°	Suécia - Umea	299	255 (85,3%)	41 (13,7%)	3 (1,0%)	0,079	Zheng, 2006
60°	Finlândia	98	67 (68,4%)	31 (31,6%)	0	0,158	Libert , 1998
59°	Suécia - Huddinge	803	601 (74,8%)	188 (23,4%)	14 (1,7%)	0,134	Nikolaos. 2009
55°	Rússia	176	133 (75,6%)	43 (24,4%)	0	0,122	Voevodin, 1998
54°	Lituânia	283	220 (77,7%)	61 (21,6%)	2 (0,7%)	0,114	Libert , 1998
53°	Irlanda	44	40 (90,9%)	4 (9,1%)	0	0,045	Martinson, 1997
52°	Alemanha	99	80 (80,8%)	17 (17,2%)	2 (2,0%)	0,106	Lucotte, 1998b
51°	Reino Unido	283	223 (78,8%)	57(20,1%)	3 (1,1%)	0,111	Martinson, 1997
50°	Bélgica –Leuven	310	243 (78,4%)	60 (19,4%)	7 (2,3%)	0,119	Struyf, 2000)
50°	Bélgica - Brussels	704	582 (82,7%)	114 (16,2%)	8 (1,1%)	0,092	Libert , 1998
48°	França – Brest	107	82 (76,6%)	21 (19,6%)	4 (3,7%)	0,135	Lucotte, 1998b
48°	Hungria - Miskolc	99	84 (84,8%)	13 (13,1%)	2 (2,0%)	0,085	Libert , 1998
47°	Hungria-Budapest	560	431 (77,0%)	121 (21,6%)	8 (1,4%)	0,122	Juhász, 2011
46°	Suíça	64	54 (84,4%)	9 (14,1%)	1 (1,6%)	0,085	Lucotte, 1998b
45°	Itália - Milão	98	82 (83,7%)	15 (15,3%)	1 (1,0%)	0,086	Lucotte, 1998b
42°	Portugal-Valpaços	47	42 (89,4%)	5 (10,6%)	0	0,053	Este estudo, 2011
42°	França – Córsega	104	102 (98,1%)	2 (1,9%)	0	0,009	Lucotte, 1998a
41°	Portugal - Porto	124	111 (89,5%)	13 (10,5%)	0	0,052	Lucotte, 1998b
40°	Espanha	250	205 (82%)	42 (16,8%)	3 (1,2%)	0,096	Alvarez, 1998
38°	Itália – Sardenha	264	247 (93,6%)	17 (6,4%)	0	0,021	Battiloro, 2000
37°	Grécia	143	131 (91,6%)	12 (8,4%)	0	0,042	Magierowska 1998
35°	Chipre	1002	945 (94,3%)	56 (5,6%)	1 (0,1%)	0,028	Christodoulou, 1997
35°	Ilha de Creta	200	187 (93,5%)	13 (6,5%)	0	0,032	Apostolakis, 2005

A Tabela 2 é resultado da comparação dos dados obtidos neste estudo com os resultados de outras investigações incidentes na frequência da mutação em diversos locais da Europa.

A mutação está presente em todas as populações de comparação, mesmo que em algumas seja apenas em situações de heterozigotia. É perceptível a diminuição da frequência alélica do $\Delta 32$ do norte para o sul da Europa. Assim, o valor de frequência alélica mais elevado é representado pela Finlândia com 0,158 e o valor mais baixo pela Córsega com 0,009. A frequência alélica obtida no presente estudo foi de 0,053, um valor muito próximo do que foi determinado por Lucotte e Mercier em 1998 (0,052), ambos os estudos encontraram a mutação apenas em heterozigotia em Portugal.

A figura 12 representa graficamente o aumento da frequência alélica desde o mediterrâneo até aos países nórdicos.

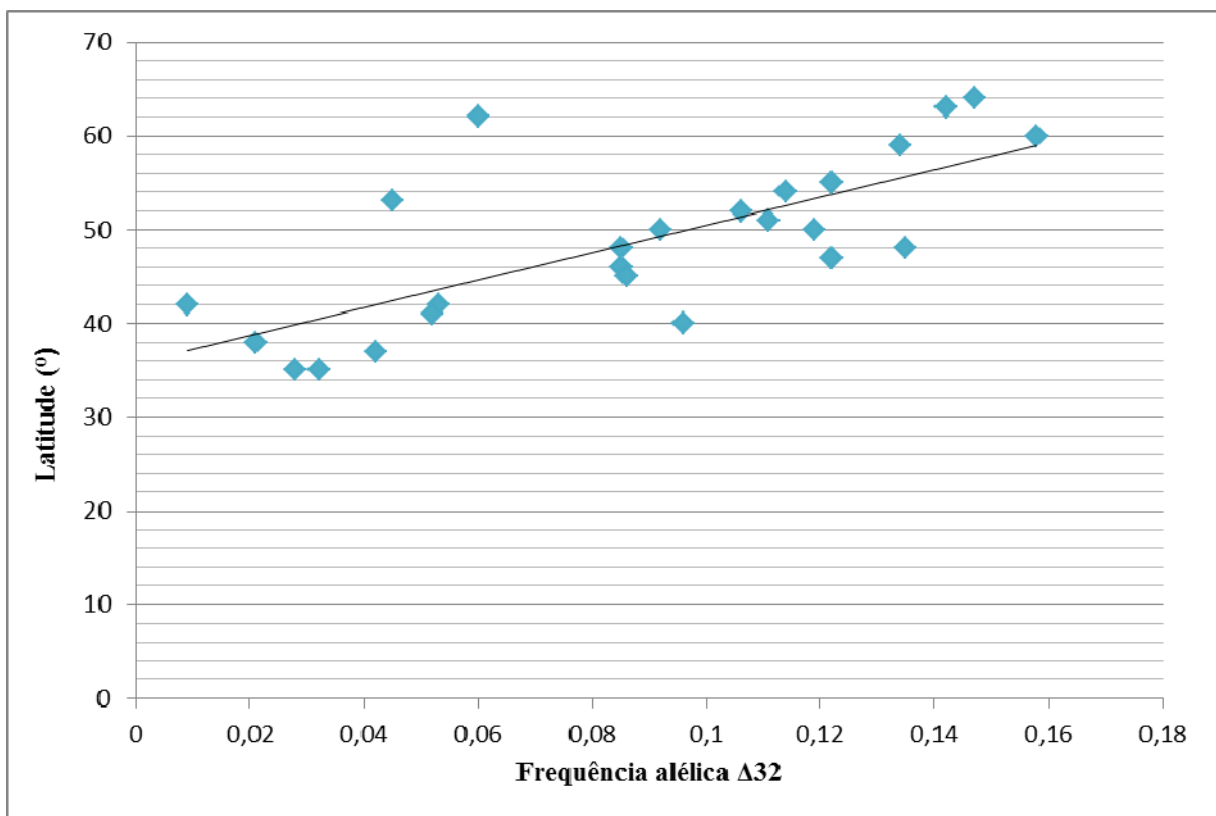


Figura 12. Regressão linear entre a frequência alélica e a localização ($R^2 = 0,531$).

V. DISCUSSÃO

A janela dos anos de publicação de artigos estipulada nesta revisão vai desde 1996 até 2010, estas datas foram assim determinadas para se perceber qual o panorama de publicações nesta matéria desde a descoberta do CCR5 Δ 32, em 1996 (Hutter e Ganepola 2011), até aos dias de hoje. Nesta cronologia nota-se que a publicação aumenta ligeiramente ao longo do tempo, no entanto, não são publicados por ano mais do que 3 artigos científicos por ano (à excepção do ano 2004). O que demonstra que a investigação/publicação nesta área é escassa. Observou-se que 7 dos 33 artigos seleccionados foram publicados no ano de 2004. Este foi o ano em que se comemoraram os 25 anos de erradicação do vírus da Varíola Humana (Mahalingam, Damon & Lidbury, 2004) e o único artigo incluído na selecção sobre Varíola Humana foi publicado nesse ano, no entanto, não foram encontradas mais razões plausíveis para justificar esta circunstância.

A tipologia e quantidade de artigos científicos encontrados sobre cada um dos cinco vírus é um factor indicativo da investigação sobre eles incidente. O HIV é um dos vírus mais conhecidos a nível mundial, segundo dados da OMS, aproximadamente, 33 milhões de pessoas têm HIV e são diagnosticados 700 novos casos de infecção todos os dias (OMS, 2010). A vontade de controlar esta doença infecciosa mobiliza muitas investigações e investigadores, daí os dados resultantes deste pesquisa se terem apresentado mais profundos sobre este vírus.

A necessidade de perceber onde, quando e como surgiu a mutação traduz-se na percentagem de artigos encontrados que especulam a origem, idade, propagação, distribuição e frequência do CCR5 Δ 32 (34% dos artigos aceites). Todavia, nenhuma destas pesquisas se direcciona para o desenvolvimento farmacológico de possíveis curas ou vacinas preventivas. No entanto, investigadores Alemães publicaram recentemente um artigo onde descrevem uma transplantação de células estaminais hematopoiéticas, de um dador homozigótico para CCR5 Δ 32, num paciente portador de HIV – 1 (Hutter & Ganepola, 2011). Este processo foi elaborado há 4 anos e até à data de publicação do artigo o referido paciente não tinha recorrido a qualquer tratamento antiviral e as análises ao sangue periférico e a diferentes tecidos não detectam carga viral nem DNA proviral (Hutter & Ganepola, 2011). Mais experiências são necessárias para compreender se esta mutação pode vir a ser uma resposta de combate contra a HIV.

Tanto quanto a autora pôde pesquisar, até à data da pesquisa não estavam devidamente clarificados mecanismos de resistência específicos do HSV. Foram encontradas e descritas várias investigações independentes, com um objectivo comum: encontrar um gene, ou conjunto de genes, responsáveis pelo fenómeno de resistência. Estas tinham variáveis distintas como, local de infecção e sexo dos participantes. Cada pesquisa encontrou *loci* distintos em cromossomas diferentes, responsáveis por fenómenos de resistência, não chegando nenhum a um consenso. Estas diferenças podem ser justificadas por não haver uniformidade nas variáveis seleccionadas para cada pesquisa. Todavia, tendo em conta que o HSV-1 tem uma prevalência mundial de 70-90% (Brandt, 2005), seria proveitoso apurar se algum *locus* dos diferentes genes encontrados tem realmente o poder de impedir esta infecção.

Através do método de pesquisa utilizado para a revisão bibliográfica apenas se encontraram artigos que exploram os mecanismos responsáveis pela resistência inata ao HSV dos anos 2004 e 2005. Determinadas características do próprio vírus como, a latência; a elevada taxa de infecções primárias clinicamente silenciosas, o que se traduz em relatos de prevalências inferiores ao que existe realmente; e ainda o facto de as úlceras curarem num curto espaço de tempo e sem originarem cicatrizes, ou seja, este vírus, normalmente, não está associado a quadros de mortalidade e morbidade elevada, podem resultar num reduzido interesse por parte dos investigadores, o que se traduz no baixo número de relatos.

Nesta revisão bibliográfica apenas um, dos quatro artigos seleccionados respeitantes ao Influenza vírus, refere a existência de *loci* em diferentes cromossomas associados à resistência ao H₅N₁, sem, no entanto, descrever quaisquer mecanismos que descrevam esta associação (Boon *et al.*, 2009). A falta da existência de mecanismos de resistência específicos do Influenza vírus ou pelo menos a falta de passado científico histórico conhecido pode dever-se ao facto de a capacidade de mutação do vírus ser muito superior à capacidade adaptativa do código genético humano.

A falta de registos científicos que façam referência a mecanismos inatos de resistência ao vírus da Variola Humana, pode dever-se ao facto de o vírus ter sido erradicado em 1979. No entanto, este vírus é apontado como arma biológica de um futuro próximo, pois ninguém nascido após a sua erradicação foi vacinado contra o vírus da Variola, pelo que continua a ser importante o estudo dos mecanismos de resistência associados.

Perante os resultados obtidos formulam-se duas hipóteses: não existe qualquer mutação genética humana capaz de conferir resistência à Varíola Humana, ou não foram efectuados estudos suficientes para descobrir esses mecanismos. Percebe-se que se trata de um vírus com mais de dois milénios, que dizimou milhões de vidas humanas e que o nosso código genético nunca conseguiu desenvolver nenhum mecanismo capaz de limitar a acção do vírus. No entanto, factores como a sua elevada taxa de mortalidade, que impedia o contacto prolongado do hospedeiro com o vírus e a vacinação desde o séc. XVIII, podem ter impedido a interacção hospedeiro-vírus necessária ao desenvolvimento de mecanismos de resistência.

Os estudos de investigação de mecanismos responsáveis pela resistência não podem incluir indivíduos vacinados. Requisito que, devido à vacinação massiva, só actualmente é possível satisfazer. Esta poderá ser uma razão apontada para a falta de estudos nesta matéria.

Os artigos encontrados relatam um gene mapeado no cromossoma 5 que confere resistência ao Flavivírus. Estudos realizados em ratos sugerem que este actua ao nível da replicação viral, porém não foram encontrados, nesta revisão bibliográfica, dados mais aprofundados respeitantes a esta questão, nem registos relativos a investigações realizadas em seres humanos.

Como pode ser observado na Figura 11, dos 47 indivíduos inquiridos apenas 10,6% (5/47) expressam a mutação em heterozigotia, este é um valor que se encaixa no esperado, tendo em conta outras pesquisas realizadas na mesma área geográfica, como o estudo realizado por Lucotte e colaboradores em 1998, confronto que pode ser constatada na Tabela 2.

A comparação dos dados recolhidos através do inquérito realizado com os resultados obtidos da análise das salivas traduziu-se na obtenção de duas variáveis significativas que envolvem a susceptibilidade ao H₂N₂ ($p= 0,031$) e os hábitos tabágicos ($p= 0,024$) com a exibição da mutação.

A relação existente entre a mutação do CCR5 e o tabagismo carece de informação pois, tanto quando a autora pôde pesquisar, foi apenas encontrado um artigo que correlaciona hábitos tabágicos, a mutação e o enfisema pulmonar. Foram, no entanto, encontrados vários artigos que enfatizam a possibilidade de uma relação próxima entre a mutação

CCR5 Δ32 e a susceptibilidade ao vírus Influenza. A figura 13 reflecte os dados obtidos na bibliografia acerca desta matéria.

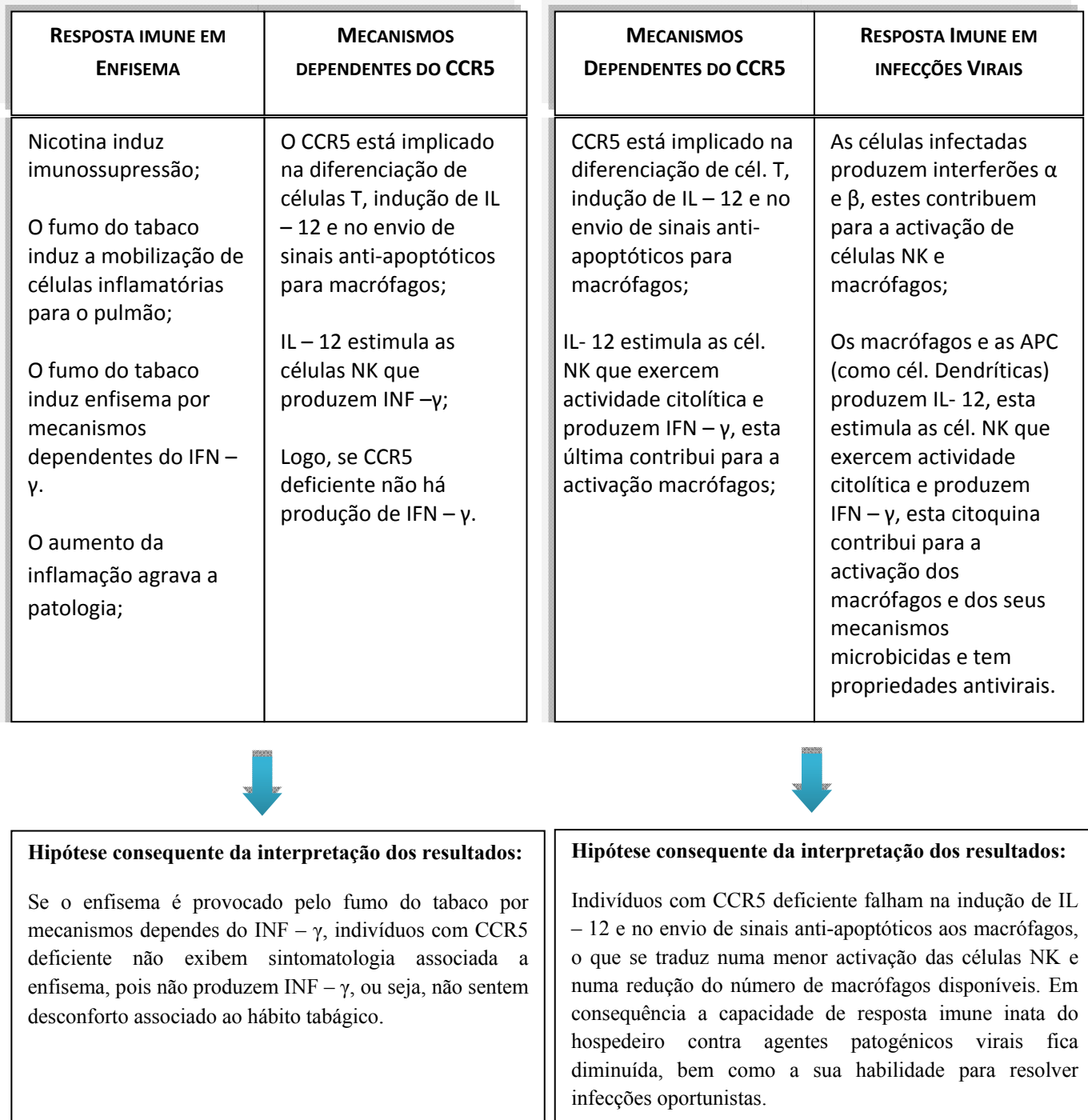


Figura 13. Relato da acção do sistema imunitário em infecções virais e em enfisema.

Tal como está implícito na figura 13 o conhecimento acerca da influência da existência da mutação nos hábitos tabágicos ainda não é aprofundado. A bibliografia encontrada defende que o CCR5 interpreta um papel importante na inflamação dos tecidos, que deficiências no CCR5 provocam redução na inflamação induzida pelo IFN – γ e que o fumo do tabaco induz o enfisema pulmonar por mecanismos dependentes do IFN - γ (Ma *et al.*, 2005). Analisando estes resultados e percebendo que para o enfisema ser desencadeado são necessários mecanismos dependentes do IFN – γ equacionou-se, neste estudo, a seguinte hipótese: indivíduos com CCR5 deficiente não exibem sintomatologia associada a enfisema, pois não produzem INF – γ , ou seja, não sentem desconforto associado ao hábito tabágico.

A resposta imune inata do hospedeiro em infecções virais baseia-se na actividade de células NK e macrófagos, o que é conseguido através da actividade dos IFN α e β e também através da activação da IL – 12 (Arosa, Cardoso e Pacheco, 2007). Segundo dados encontrados na bibliografia, o CCR5 está implicado na indução de IL – 12 (Aliberti *et al.*, 2000) e no envio de sinais anti-apoptóticos aos macrófagos (Tyner *et al.*, 2005). A IL – 12 estimula as células NK que exercem actividade citolítica e produzem IFN – γ , esta citocina contribui para a activação dos macrófagos e dos seus mecanismos microbicidas e tem propriedades antivirais (Arosa, Cardoso e Pacheco, 2007). Analisando estes resultados equacionou-se, neste estudo, a seguinte hipótese: indivíduos com CCR5 deficiente falham na indução de IL – 12 e no envio de sinais anti-apoptóticos aos macrófagos, o que se traduz numa menor activação das células NK e numa redução do número de macrófagos disponíveis. Em consequência a capacidade de resposta imune inata do hospedeiro contra agentes patogénicos virais fica diminuída, bem como a sua habilidade para resolver infecções oportunistas.

Vários autores defendem que a susceptibilidade ao vírus Influenza aumenta em ratos com deficiências no CCR5 (Tyner *et al.*, 2005 e Dawson *et al.*, 2000). Keinan e colaboradores realizaram um estudo em indivíduos severamente infectados pelo pandémico H₁N₁ em 2009 e aperceberam-se que 55,5% dos inquiridos caucasianos eram portadores da mutação CCR5 Δ 32 (Keynan, *et al.*, 2009). O que indica que a mutação é um factor de risco para uma maior severidade da doença, em pacientes caucasianos (Keynan, *et al.*, 2009).

É necessário sublinhar que o presente estudo se baseia numa amostra de apenas 47 indivíduos e que destes somente 5 sofreram de gripe asiática e outros 5 têm hábitos tabágicos, o que pode ter enviesado os resultados obtidos. Estudos futuros, com amostras maiores e onde prevaleçam indivíduos fumadores, poderão aprofundar o conhecimento científico nesta matéria.

A Tabela 2 mostrou ser uma ferramenta útil na comparação da frequência da mutação em diversos países Europeus. Verificou-se que a frequência da mutação, tendo em conta a sua presumível idade, não é tão elevada como se poderia prever, o que é justificado por vários autores entre eles, Dean e colaboradores, devido ao facto de a mutação possivelmente só ter acontecido uma vez, num grupo étnico caucasiano ancestral posterior ao isolamento continental dos caucasianos dos seus ancestrais africanos (Dean *et al.*, 1996). Libert e colaboradores são outros que defendem que a mutação aconteceu pela primeira vez nos países Escandinavos, ou pelo menos que a pressão selectiva foi mais forte nestes países devido à sua distribuição geográfica (Libert, *et al.*, 1998). O decréscimo da frequência alélica do norte até ao sul da Europa é também evidente na Tabela 2, o que, segundo Norose e colaboradores foi conseguido através dos *Vikings* (séc. VIII até séc. X), pois além de estes dominarem os países nórdicos, tinham também relações influentes com a maioria dos restantes países Europeus (Norose, *et al.*, 2002).

De acordo com os dados da mesma Tabela, o estudo realizado na Finlândia, o país com maior frequência alélica, não registou nenhum caso de mutação homocigótica, circunstância que poderá estar relacionada com o reduzido número de participantes no estudo.

Estudos realizados no mesmo país, constantes na Tabela 2, apresentaram frequências alélicas diferentes, como é o caso da Suécia, da Bélgica e da Hungria. No entanto, o número de participantes envolvidos nos estudos e o ano de realização dos mesmos são diferentes. Estas circunstâncias poderão justificar os resultados obtidos. Porém, ao serem analisados os dois estudos realizados em Portugal, com mais de 10 anos de diferença e com número de participantes díspares, encontrou-se uma frequência alélica semelhante. Todavia, os dois estudos Portugueses foram realizados em regiões próximas, ambas no norte do país, enquanto que os estudos Suecos variam 4^o de latitude. Dois dos três estudos realizados na Suécia referenciam a mesma cidade – Umea – e os seus resultados não são semelhantes. Algo idêntico é o caso da Bélgica, os

estudos referenciam duas cidades com a mesma latitude e expõem resultados bastante diferentes. Embora os locais de realização destes estudos apresentem latitudes semelhantes, os participantes podem ser oriundos de outros locais, ou até pertencer a comunidades fechadas, como é o caso dos estudos realizados na Hungria. A pesquisa realizada em Miskolc incluiu apenas indivíduos de etnia cigana.

A França é também alvo de dois estudos que mostraram diferenças relevantes entre as frequências alélicas no mesmo país dependendo da região analisada. As regiões em estudo foram *Brest*, localizada na costa atlântica no norte de França e Córsega, uma ilha mediterrânea. A primeira registou uma frequência alélica de 0,135, enquanto que a Córsega registou o valor mais baixo de toda a Europa, nesta pesquisa, 0,009. Isto sugere que a localização geográfica tem grande influência dentro do mesmo país, pois enquanto que *Brest* era facilmente alcançável pelos *Vikings*, a Córsega, por estar no norte do mediterrâneo, era um porto de difícil acesso a estes navegadores. A desertificação pode ter contribuído para aumentar o desinteresse dos *Vikings* nesta ilha.

VI. CONCLUSÃO

Após discussão dos resultados deste trabalho – cujo objectivo geral foi o estudo de mecanismos inatos de resistência a infecções virais, o qual se subdividiu nos seguintes objectivos específicos: reunião de literatura; identificação dos mecanismos de resistência mais frequentes; estudo da prevalência da mutação do alelo $\Delta 32$ do co-receptor CCR5 numa população portuguesa com mais de 65 anos de idade; comparação da prevalência da mutação em várias populações Europeias – pôde concluir-se que:

O método de pesquisa forneceu ferramentas de suporte à obtenção da bibliografia necessária a este trabalho.

Após a análise dos artigos científicos seleccionados, foi possível identificar e compreender mecanismos de resistência inata ao HIV e ao Flavivírus. Quanto ao Herpesvírus e ao Influenza vírus foram identificados determinados *loci* que poderão influenciar a susceptibilidade a estes vírus, não existindo, no entanto, dados conclusivos acerca desta matéria. Relativamente ao vírus da Varíola Humana não foi encontrado, nesta pesquisa, qualquer registo de mecanismos inatos de resistência do hospedeiro a este vírus.

No estudo da mutação CCR5 $\Delta 32$, numa população do norte de Portugal com mais de 65 anos de idade, verificou-se que 10,6% da amostra analisada era portadora da mutação em heterozigotia e apurou-se ainda a associação estatisticamente significativa entre a exibição da mutação e a sobrevivência à gripe asiática ($p= 0,031$) e o hábito tabágico ($p= 0,024$).

A comparação da frequência alélica obtida neste estudo com frequências encontradas noutras pesquisas confirmou o decréscimo sofrido pela mutação de norte para sul da Europa.

Posto isto pode afirmar-se que os objectivos propostos foram alcançados.

Dos mecanismos apresentados, aquele que é responsável pela resistência inata ao HIV mostrou ser o mais profundamente conhecido, no entanto Portugal carece de passado científico histórico conhecido acerca desta temática, o presente estudo poderá servir de suporte para estudos futuros que visem aprofundar a matéria e formular hipóteses de utilização da mutação na prevenção/tratamento desta infecção viral como foi

recentemente proposto, por investigadores alemães, que utilizaram a transplantação de células estaminais de um dador homozigótico para a mutação.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Aliberti, J., *et al.* (2000). Ccr5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha⁺ dendric cells, *Natural Immunology Journal*, 1, pp. 83-87.
- Alkhatib, G., *et al.* (1996). CC CKR5: a RANTES, MIP1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophagetropic HIV-1, *Science*, 272, pp. 1955-1958.
- Alvarez, V., López-Larrea, C. & Coto, E. (1998). Mutational analysis of the CCR5 and CXCR4 genes (HIV-1 co-receptors) in resistance to HIV-1 infection and AIDS development among intravenous drug users, *Human Genetics*, 102, pp. 483–486.
- Apostolakis, S., *et al.* (2005). Distribution of HIV/AIDS protective SDF1, CCR5 and CCR2 gene variants within Cretan population, *Journal of Clinical Virology*, 34, pp. 310-314.
- Arosa, F., Cardoso, E. & Pacheco, F. (2007). *Fundamentos de Imunologia*. Lisboa, Lidel.
- Battiloro, E., *et al.* (2000). Distribution of the CCR5 Δ 32 allele in Italian type 1-infected and normal individuals, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 16, pp. 181–182.
- Boon, A. C., *et al.* (2009). Host genetic variation affects resistance to infection with a highly pathogenic H5N1 influenza A virus in mice, *Journal of Virology*, 83, pp. 10417-10426.
- Brandt, C. (2005). The role of viral and host genes in corneal infection with herpes simplex virus type 1, *Experimental Eye Research*, 80, pp. 607-621.
- Brinton, M.A. (1996). Host susceptibility to viral disease. *In*: Nathanson, N., Ahmed, R., Gonzalez-Scerano, F., Griffin, D.E., Holmes, K.V., Murphy, F.A., Robinson, H.L. (Eds). *Viral Pathogenesis*. Philadelphia: Lippincott-Raven, pp. 303- 328.
- Brinton, M., *et al.* (1998). Immune mediated and inherited defenses against flaviviruses, *Clinical and Diagnostic Virology*, 10, pp. 129-139.
- Campbell, G.L., *et al.* (2002). West Nile virus, *The Lancet Infectious Disease*, 2, pp. 519-529.

Cann, R. L., Stoneking, M. & Wilson, A. C. (1987). Mitochondrial DNA and human populations, *Nature*, 325, pp. 31-36.

Chambers, T., *et al.* (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication, *Annual Review of Microbiology*, 44, pp. 649-688.

Chen, Z., *et al.* (1997). Genetically divergent strains of simian immunodeficiency virus use CCR5 as a coreceptor for entry, *Journal of Virology*, 71, pp. 2705-2714.

Choe, H., *et al.* (1996). The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates, *Cell*, 85, pp. 1135-1148.

Christodoulou, C., *et al.* (1997). Low frequencies of *CCR5* Δ 32 allele among Greeks in Cyprus, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 13, pp. 1373–1374.

Combadiere, C., *et al.* (1996). Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES, *Biology*, 60, pp. 147- 152.

Darnell, M.B., Koprowski, H. & Lagerspetz, K. (1974). Genetically determined resistance to infection with group B arboviruses. I. Distribution of the resistance gene among various mouse populations and characteristics of gene expression in vivo, *The Journal of Infectious Diseases*, 129, pp. 240-247.

Dawson, T., *et al.* (2000). Contrasting effects of Ccr5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus, *American Journal of Pathology*, 156, pp. 1951-1959.

Dean, M., *et al.* (1996). Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene, *Science*, 273, pp. 1856-1862.

Deng, H., *et al.* (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1, *Nature*, 381, pp. 661-666.

Doranz, B., *et al.* (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2 as fusion cofactors, *Cell*, 85, pp. 1149-1158.

Dragic, T., *et al.* (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CkR5, *Nature*, 381, pp. 667-673.

eSwab collection & transport system (2006). Product insert & how to use swab guide. Itália. Copan innovation, pp. 3-4 e 23-28.

Faure, E., Royer-Carenzi, M. (2008). Is the European spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5-Δ32 allele formed by a breakdown of the pathocenosis due to the historical Roman expansion?, *Infection, Genetics and Evolution*, 8, pp. 864-874.

Ferreira, W. & Sousa, J. (2002). *Microbiologia volume, 3*. Lisboa, Lidel.

Frese, M., *et al.* (1995). Human MxA protein inhibits tick-borne Thogoto virus but not Dhori virus, *Journal of Virology*, 69, pp. 3904-3909.

Galvani, A. & Novembre, J. (2005). The evolutionary of the CCR5-Δ32 HIV-resistance mutation, *Microbes and Infection*, 7, pp. 302-309.

Goldstein, D., *et al.* (1995). Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92, pp. 6723-6727.

Gubler, D., Kuno, G. & Markoff, L. (2007). Flaviviruses. *In*: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, 1, pp. 1153-1253.

Haeseler, A., Sajantila, A. & Paabo, S. (1996). The genetical archaeology of the human genome, *Nature Genetics*, 14, pp. 135-140.

Haller, O., Frese, M. & Kochs, G. (1998). Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses, *Review of Science and Technology Off. Int. Epiz*, 17, pp.220-230.

Holmberg, S. (1996). The estimated prevalence and incidence of HIV in 96 large US metropolitan areas, *American Journal of Public Health*, 86, pp. 642-654.

Horai, S., *et al.* (1995). Recent African origin of modern humans revealed by complete sequences of hominoid mitochondrial DNAs, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92, pp. 532-536.

- Hummel, S., *et al.* (2005). Detection of the CCR5-D32 HIV resistance gene in Bronze Age skeletons, *Genes & Immunity*, 6, pp. 371-374.
- Hutter, G., & Ganepola, S. (2011). Eradication of HIV by transplantation of CCR5 – Deficient Hematopoietic Stem Cells, *The Scientific World Journal*, 11, pp. 1068-1076.
- John, G., *et al.* (2001). CCR5 promoter polymorphisms in a Kenyan perinatal human immunodeficiency virus type 1 cohort: Association with increased 2-year maternal mortality, *Journal of Infectious Diseases*, 184, pp. 89-92.
- Juhász, E., *et al.* (2011). The Consequence of a Founder Effect: CCR5-Δ32, CCR2-64I and SDF1-3'A Polymorphism in Vlach Gypsy Population in Hungary, *Pathology & Oncology Research*, 11, pp. 9424-9425.
- Kageyama, S., *et al.* (2001). Research committee on prevention of developing illness and therapy for HIV-infected patients. Polymorphism of CCR5 affecting HIV disease progression in the Japanese population, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 17, pp. 991-995.
- Kastrukoff, L.F., Tau, A.S. & Puterman, M.L. (1986). Genetics of natural resistance to herpes simplex virus type I latent infection of the peripheral nervous system in mice, *Journal of General Virology*, 67, pp. 613-621.
- Keller, B., *et al.* (2007). Innate immune evasion by hepatitis C virus and West Nile virus, *Cytokine & Growth Factor*, 18, pp. 535-544.
- Keynan, Y., *et al.* (2009). Chemokine Receptor 5 Δ32 Allele in Patients with Severe Pandemic (H1N1), *Emerging Infectious Diseases*, 16, pp. 1621-1622.
- Khanna, K., *et al.* (2004). Immune control of herpes simplex virus during latency, *Current Opinion in Immunology*, 16, pp. 463-469.
- Kramer, L., Li, J. & Shi, P.Y. (2007). West Nile virus, *The Lancet Neurology*, 6, pp. 171-182.
- Leshner, A. (1999). Drug abuse research helps curtail the spread of deadly infectious diseases, *NIDA Notes*, 14, pp. 3-4.

- Libert, F., *et al.* (1998). 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, pp. 399-406.
- Lidé, K., Linderholm, A. & Götherström, A. (2006). Pushing it back. Dating the CCR5-D32 bp deletion to the Mesolithic in Sweden and its implications for the Meso/ Neo transition. *Documenta Praehistorica XXXIII, Neolithic Studies*, 13, pp. 577-582.
- Liesegang, T.J. (2001). Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea*, 20, pp. 1-13.
- Liu, R., *et al.* (1996). Homozygous defect in HIV-1 co-receptor accounts for resistance to some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection, *Cell*, 86, pp. 367-377.
- Lopez, C. (1975). Genetics of natural resistance to herpes virus infections in mice, *Nature*, 258, p. 152.
- Lucotte, G. & Dieterlen, F. (2003). More about Viking hypothesis of origin of the $\Delta 32$ mutation in the CCR5 gene conferring resistance to HIV-1 infection, *Infection, Genetics and Evolution*, 3, pp. 293-295.
- Lucotte, G. & Mercier, G. (1998b). Distributions of the CCR5 gene 32 bp deletion in Europe, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 19, pp. 174-177.
- Lucotte, G. & Mercier, G. (1998a). $\Delta 32$ Mutation frequencies of the CCR5 co-receptor in different French regions, *C. R. Academy of Sciences Paris*, 321, pp. 409-413.
- Lundberg, P., *et al.* (2003). A locus on mouse chromosome 6 that determines resistance to herpes simplex virus also influences reactivation, while an unlinked locus augments resistance of female mouse, *Journal of Virology*, 77, pp. 11661-11673.
- Ma, B., *et al.* (2005). Role of CCR5 in IFN- γ - induced and cigarette smoke - induced emphysema, *The Journal of Clinical Investigation*, 115, pp. 3460-3472.
- Magierowska, M., *et al.* (1998). Distribution of the CCR5 gene 32 base pair deletion and SDF 1-3A variant in healthy individuals from different populations, *Immunogenetics*, 48, pp. 417- 419.

- Mahalingam, S., Damon, I. & Lidbury, B. (2004). 25 years since the eradication of smallpox: why poxvirus research is still relevant, *Trends in Immunology*, 25, pp. 636-639.
- Martinson, J.J., *et al.* (1997). Global distribution of the CCR5 gene 32 base pair deletion, *Nature Genetics*, 16, pp. 100–102.
- McGeoch, D., Fellner, P. & Newton, C. (1976). Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 73, pp. 3045-3049.
- Mizuguchi, M., *et al.* (2007). Acute encephalopathy associated with influenza and other viral infections, *Acta Neurologica Scandinavica*, 186, pp. 45-56.
- Mueller, A. & Strange, P. (2004). The chemokine receptor, CCR5, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, pp. 35-38.
- Nikolaos, K., *et al.* (2009). Common CCR 5 Polymorphism in Stroke The CCR 5 D32 Polymorphism Differentiates Cardioembolism from Other Aetiologies of Ischaemic Cerebrovascular Diseases. *Scandinavian Journal of Immunology*, 70, pp. 475-480.
- Norose, K., *et al.* (2002). Mapping of genes involved in murine herpes simplex virus keratitis: identification of genes and their modifiers, *Journal of Virology*, 76, pp. 3502-3510.
- O'Brien, S. J. & Dean, M. (1997). In search of AIDS-resistance genes, *Scientific American*, 277, pp. 44-51.
- Ono, E., *et al.* (2004). Enhanced resistance to herpes simplex virus type 1 infection in transgenic mice expressing a soluble form of herpesvirus entry mediator, *Virology*, 320, pp. 267-275.
- Palese, P. & Shaw, M.L. (2007). Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.). *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1648-1689.
- Pavlovic, J., Haller, O. & Staeheli, P. (1992). Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle, *Journal of Virology*, 66, pp. 2564–2569.

Peiris, J., Hui, K. & Yen, H. (2010). Host response to influenza virus: protection versus immunopathology, *Current Opinion in Immunology*, 22, pp. 475-481.

Platt, E. J., *et al.* (1998). Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1, *Journal of Virology*, 72, pp. 2855-2864.

Puig-Basagoiti, F., *et al.* (2009). Identification and characterization of inhibitors of West Nile virus, *Antiviral Research*, 83, pp. 71-79.

Qiagen 2010. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. *In*: Qiagen (ed)

Ruvolo, M., *et al.* (1993) Mitochondrial COII sequences and modern human origins, *Molecular Biology Evolution*, 10, pp. 1115-1135.

Sabeti, P.C., *et al.* (2005). The case for selection at CCR5-D32, *PLoS Biology*, 3, p. 378.

Samson, M., *et al.* (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene, *Nature*, 382, pp. 722-725.

Samuel, M. & Diamond, M. (2005). Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival, *Journal of Virology*, 79, pp. 13350-13361.

Shallem, G.R., *et al.* (1993). Characterization of allelic forms at the retinal degeneration (rd) and b-glucuronidase (Gus) loci for the mapping of the flavivirus resistance (Flv) gene on the mouse chromosome 5, *Mouse Genome*, 91, pp. 572-574.

Staeheli, P., Pitossi, F. & Pavlovic, J. (1993). Mx-proteins: GTPases with antiviral activity, *Trends in Cell Biology*, 3, pp. 268-272.

Stephens, J., *et al.* (1998). Dating the origin of the CCR5-Δ32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes, *American Journal of Human Genetics*, 62, pp. 1507-1515.

- Stoneking, M., *et al.* (1992). New approaches to dating suggest a recent age for the human mtDNA ancestor, *Philosophical Transactions of the Royal Society London Biological Sciences*, 337, pp. 167-175.
- Struyf, F., *et al.* (2000). Prevalence of CCR5 and CCR2 HIV-Coreceptor Gene Polymorphisms in Belgium, *Human Heredity*, 50, pp. 304-307.
- Taubenberger, J. & Morens, D. (2008). The pathology of influenza virus infections, *Annual Review Pathology*, 3, pp. 499-522.
- Tyner, J., *et al.* (2005). CCL5-Ccr5 interaction provides antiapoptotic signals for macrophage survival during viral infection, *Nature Medicine*, 11, pp. 1180-1187.
- Stumpf, M. & Wilkinson-Herbots. (2004). Allelic histories: positive selection on a HIV-resistance allele, *Trends in Ecology and Evolution*, 19, pp. 166-168.
- Vigilant, L., *et al.* (1991). African populations and the evolution of human mitochondrial DNA, *Science*, 253, pp. 1503-1507.
- Voevodin, A., Samilchuk, E. & Dashti, S. (1998). A survey for 32 nucleotide deletion in the CCR5 chemokine receptor gene (*Dccr-5*) conferring resistance to human immunodeficiency virus type 1 in different ethnic groups and in chimpanzees. *Journal of Medical Virology*, 55, pp. 147-151.
- Zhang, L., *et al.* (2009). Systems-based candidate genes for human response to influenza infection, *Infection, Genetics and Evolution*, 9, pp. 1148-1157.
- Zheng, B., *et al.* (2006). Genetic Polymorphism of Chemokine Receptors CCR2 and CCR5 in Swedish Cervical Cancer Patients, *Anticancer Research*, 26, pp. 3669-3674.
- Warren-Gash, C., Smeeth, L. & Hayward, A.C. (2009). Influenza as a trigger for acute myocardial infarction or death from cardiovascular disease: a systematic review, *Lancet Infectious Disease*, 9, pp. 601-610.
- Whitley, R. J. (1996). Herpes simplex viruses, in: Fields, B. N., Knipe, D. A., Howley, P. M. (Eds.). *Fields Virology*, 2. Philadelphia, Lippincott – Raven, pp. 2297-2843.
- World Health Organization Home Page. [Em linha]. Disponível em <http://www.who.int/en/>. [Consultado em 12/10/2011].

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Tabela que contém informação acerca de todos os artigos analisados

Anexo 2. Inquérito realizado aos participantes