



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

KARLA RHAYANNE DOS SANTOS LINS

**POLIMORFISMO NO GENE CCR5 DELTA 32 EM PACIENTES COM A DOENÇA
DE PARKINSON EM UMA POPULAÇÃO PERNAMBUCANA**

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RECIFE

2023

KARLA RHAYANNE DOS SANTOS LINS

**POLIMORFISMO NO GENE CCR5 DELTA 32 EM PACIENTES COM A DOENÇA
DE PARKINSON EM UMA POPULAÇÃO PERNAMBUCANA**

Relatório de Estágio Supervisionado Obrigatório
apresentado à Universidade Federal Rural de
Pernambuco como parte das exigências para obtenção
do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Sousa.
Professor Associado do Departamento de Biologia da
UFRPE.

RECIFE

2023

RELAÇÃO DE ESTÁGIO REALIZADO

NOME: Karla Rhayanne dos Santos Lins

MATRÍCULA: 70556236424

CURSO: Ciências Biológicas Bacharelado

ORIENTADOR (A): Paulo Roberto Eleutério de Souza

ESTABELECIMENTO DE ENSINO: Universidade Federal Rural de Pernambuco

ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:


LOCAL DE REALIZAÇÃO: Genoma — UFRPE


ENDEREÇO: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n — Dois Irmãos, Recife — PE, CEP 52171-900

PERÍODO: Junho de 2019 a Abril de 2023

CARGA HORÁRIA: 2.400 horas

SUPERVISOR (A): Paulo Roberto Eleutério de Souza

Documento assinado digitalmente
 **PAULO ROBERTO ELEUTERIO DE SOUZA**
Data: 19/03/2026 16:53:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
 **KARLA RHAYANNE DOS SANTOS LINS**
Data: 19/03/2026 17:46:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

ORIENTADOR / CONCEDENTE

ESTAGIÁRIO (A)

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva, cuja etiologia ainda não está completamente esclarecida, porém sabe-se que é uma doença de origem multifatorial. Neste sentido, vários genes têm sido estudados quanto à sua associação com o surgimento da doença. Entre estes, o receptor CCR5 tem sido apontado como um possível fator causador da doença, uma vez que estudos prévios comprovam relação deste receptor com neurônios e células da glia, resultando na manutenção das atividades neuronais normais. Além disso, verificou-se que a deleção de 32 pares de bases no receptor do gene CCR5 esteja relacionada com alteração na sua expressão, podendo influenciar na atividade neuronal normal. Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar se existe relação entre a deleção CCR5 Δ 32 com a progressão da doença de Parkinson, em pacientes diagnosticados com a DP numa população de Pernambuco. Um total de 213 amostras de DNA de pacientes com a DP, armazenadas no Laboratório Genoma da UFRPE, oriundos do ambulatório do serviço Pró-Parkinson do Hospital das Clínicas UFPE foram avaliados. A amplificação do gene CCR5 foi realizada através da técnica da PCR convencional, e analisada em gel de agarose 2%. Nossos resultados não mostraram associação do polimorfismo com nenhum dos sintomas motores e não motores da doença de Parkinson ($p > 0,05$). Porém, a interpretação dos resultados deve ser considerada contendo algumas limitações devido à baixa frequência do alelo CCR5 Δ 32 na população de estudo. Além disso, este é o primeiro estudo a avaliar a relação deste gene com a progressão da DP. Desta forma, mais pesquisas, em outras populações de estudo, são necessárias para investigar o papel desse polimorfismo na patogênese da doença.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; CCR5; Polimorfismo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	11
2.1 Geral	11
2.2 Específicos	11
3 DESENVOLVIMENTO (MATERIAL E MÉTODOS)	12
3.1 Desenho de estudo	12
3.2 Amplificação do gene CCR5	12
3.3 Condições da reação e análise do amplicon	12
3.4 Análises estatísticas	13
4 REFERENCIAL TEÓRICO	13
4.1 A doença de Parkinson: marco histórico	13
4.2 Epidemiologia	14
4.3 Neuroinflamação e o processo neurodegenerativo na DP	15
4.4 Etiologia da doença de Parkinson	17
4.5 Quimiocinas	18
4.6 CCR5 e a DP	20
5 RESULTADOS	22
5.1 Análise das variáveis paramétricas: início da doença, estágio HY e índice de progressão	22
5.2 Análise das variáveis dicotômicas	23
6 DISCUSSÃO	25
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva de caráter multifatorial, descrita pela primeira vez pelo médico britânico James Parkinson, em 1817, em um trabalho intitulado "An Essay on the Shaking Palsy", no qual ele caracterizou os principais sintomas da doença com base na observação clínica de três pacientes, ainda sem o auxílio do diagnóstico neurológico formal (PARKINSON, 1817; BERRIOS, 2016). Entre o século XVIII e o início do século XIX, o que hoje reconhecemos como DP era classificado como paralisia agitante — termo que implicava uma perda de movimentos e sensibilidade com tremor como manifestação central. Apenas em 1864, Charcot e Vulpian formalizaram a denominação "doença de Parkinson", corrigindo uma lacuna histórica e atribuindo ao fenômeno uma identidade clínica própria (BERRIOS, 2016).

Do ponto de vista epidemiológico, a DP é considerada a segunda doença neurodegenerativa mais frequente no mundo, afetando entre 1% e 2% da população em todos os grupos étnicos e classes socioeconômicas. Em países industrializados, estima-se uma prevalência de 0,3% na população geral, alcançando 1% em pessoas acima de 60 anos e 3% naquelas acima de 80 anos, com taxa de incidência variando entre 8 e 18 por 100 mil pessoas/ano (LEE; GILBERT, 2016). Na Europa, as taxas de prevalência e incidência estimadas para a DP variam entre 65 e 12.500 por 100 mil e 5 e 346 por 100 mil pessoas por ano, respectivamente (CAMPENHAUSEN et al., 2005). No Brasil, estima-se que cerca de 200 mil pessoas sejam acometidas pela doença, embora os dados epidemiológicos nacionais ainda sejam escassos (DA SILVA; DE CARVALHO, 2019; WERNECK, 2010).

Patologicamente, a DP é caracterizada pela degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância nigra pars compacta (SNPc), com perda de suas projeções ascendentes para o striatum, conseqüente diminuição do conteúdo de dopamina estriatal e acúmulo de alfa-sinucleína em inclusões intracitoplasmáticas denominadas corpos de Lewy (CL), responsáveis pela maioria dos sintomas motores observados na doença (HIRSCH; HUNOT, 2009; SPILLANTINI et al., 1997; WAKABAYASHI et al., 2013). Quando os pacientes recebem o diagnóstico, uma proporção substancial de neurônios dopaminérgicos já foi perdida e a neurodegeneração já se estendeu a outras regiões do sistema nervoso central (SNC).

A etiologia da DP ainda não está completamente elucidada, mas sabe-se que fatores genéticos e ambientais contribuem de forma combinada para o surgimento e progressão da doença. Causas genéticas identificáveis respondem por aproximadamente 5 a 10% dos casos, enquanto predisposição genética, toxinas ambientais e envelhecimento são apontados como fatores de risco relevantes (NAGATSU; SAWADA, 2006). Entre os mecanismos moleculares implicados na degeneração celular, destacam-se disfunções mitocondriais, estresse oxidativo, acúmulo de proteínas alteradas, excitotoxicidade e apoptose (HIRSCH; HUNOT, 2009). Além disso, resultados de estudos pós-morte e modelos animais sugerem que a neuroinflamação desempenha um papel relevante na progressão da neurodegeneração (NAGATSU; SAWADA, 2006; TANSEY et al., 2007; GLASS et al., 2010; HIRSCH et al., 2003).

Nesse contexto, o processo inflamatório no SNC vem sendo apontado como um dos principais fatores associados a distúrbios neurodegenerativos. O sistema nervoso central é composto por células especializadas chamadas células da glia — incluindo astrócitos, microglia, oligodendrócitos e NG2 —, responsáveis pela manutenção, nutrição e proteção do SNC (RANSOHOFF et al., 2016; MECCA et al., 2018; ALLEN et al., 2018). Em condições inflamatórias, essas células liberam mediadores como citocinas e interleucinas pró-inflamatórias, que podem levar a um estado de neuroinflamação crônica associado ao surgimento e progressão de doenças neurodegenerativas, incluindo a DP (BRODIN; DAVIS, 2017; KEMPUJAR et al., 2019). Na DP especificamente, foi observada uma diminuição do fenótipo microglial anti-inflamatório e um aumento do pró-inflamatório, criando um ciclo vicioso no qual a ativação glial amplifica a perda neuronal e a perda neuronal perpetua a ativação das células gliais (LEE et al., 2019; KEMPUJAR et al., 2016).

Nesse cenário inflamatório, as quimiocinas emergem como moléculas de interesse central. Trata-se de pequenas proteínas quimioatrativas de baixo peso molecular (8–15 kDa) que se ligam a receptores acoplados à proteína G e desempenham papel fundamental na migração celular, vigilância imunitária e modulação da inflamação (RAMAN et al., 2011; ROSSI; ZLOTNIK, 2000). No contexto das doenças neurodegenerativas, as quimiocinas tanto podem contribuir para a neurodegeneração quanto para a proteção do SNC, a depender do tipo de receptor ativado e do contexto imunológico (LIU et al., 2019; GUALTIEROTTI et al., 2017).

O receptor CCR5 (Chemokine-CC-motif-receptor 5), localizado no cromossomo 3p21, é amplamente envolvido no recrutamento de leucócitos para o local da inflamação, incluindo a

migração de células natural killer e células Th1 (BALISTRERI et al., 2007; CHOI et al., 2013). Sua expressão constitutiva é detectada em monócitos, astrócitos, neurônios associados à memória e microglia, e estudos comprovam que sua relação com neurônios e células da glia resulta na manutenção das atividades neuronais normais (CHOI et al., 2013; KHORRAM KHORSHID et al., 2012). Além disso, estima-se que o CCR5 esteja associado a mecanismos que promovem a neuroproteção do SNC e influenciam a sobrevivência neuronal (JORDAN et al., 2019).

Um polimorfismo de particular interesse nesse receptor é a deleção de 32 pares de bases no gene CCR5 (CCR5 Δ 32), que resulta em uma proteína truncada e inativa de 215 aminoácidos — em vez dos 352 aminoácidos da proteína funcional —, com deficiência em domínios essenciais para interações com a proteína G e transdução de sinal (MARTINSON et al., 1997). Essa deleção está presente em 2 a 10% da população geral e é mais frequentemente observada em populações caucasianas do norte da Europa (BALISTRERI et al., 2007; SALDANHA, 2008). Variações na expressão ou na função do receptor CCR5, causadas por polimorfismos genéticos, podem afetar processos gliais e neuronais e, assim, estar associadas à predisposição e progressão de doenças neurodegenerativas (OTAEGUI et al., 2007; BALISTRERI et al., 2007).

Diante do exposto e da escassez de investigações que relacionem o polimorfismo CCR5 Δ 32 especificamente à progressão da doença de Parkinson, o presente estudo objetivou avaliar se existe associação entre essa deleção e as características clínicas da DP — incluindo sintomas motores e não motores — em uma coorte de pacientes diagnosticados em uma população pernambucana, atendidos no ambulatório do serviço Pró-Parkinson do Hospital das Clínicas da UFPE. Para o melhor do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a avaliar essa associação na população brasileira.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Verificar uma possível relação entre a deleção de 32 pares de bases no gene CCR5 com a progressão da doença de Parkinson numa população de Pernambuco.

2.2 Específicos

- Determinar a frequência alélica e genotípica do polimorfismo na população de estudo;
- Avaliar a relação entre as frequências alélicas e genotípicas da deleção com a progressão da doença.

3 DESENVOLVIMENTO (MATERIAL E MÉTODOS)

3.1 Desenho de estudo

O presente estudo correspondeu a um estudo transversal (cross-seccional) de base hospitalar, com indivíduos diagnosticados com a doença de Parkinson no ambulatório do serviço PRÓ-PARKINSON do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), no período compreendido entre os meses de janeiro de 2016 a dezembro de 2017. Todos os pacientes foram oriundos da região metropolitana de Recife-PE e diagnosticados com a doença pelo médico responsável, baseado nos critérios do Banco de Cérebros da Sociedade da Doença de Parkinson do Reino Unido. Foram utilizadas neste estudo amostras de DNA de pacientes armazenadas no Laboratório Genoma da UFRPE, sob a responsabilidade do coordenador do projeto, com 213 indivíduos diagnosticados com a doença de Parkinson.

3.2 Amplificação do gene CCR5

A presença da deleção de 32 pb do gene CCR5 foi analisada por meio da técnica da PCR convencional, usando os pares de primers: senso (5'-CTTCATCATCCTC-CTGACAATCG-3') e antisenso (5'-GACCAGCCCCAAGTTGACTATC-3'), conforme descrito por Kristiansen et al. (2001). A reação de amplificação da região do gene CCR5 foi realizada num volume final de 15 µL, contendo: ~50 ng de DNA, 1X Master Mix PCR 2X (PROMEGA) e 1 µM de cada primer.

3.3 Condições da reação e análise do amplicon

A reação de PCR foi realizada de acordo com as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min; seguidas por 30 ciclos de: 94°C por 45 s; anelamento dos primers por 45 s e extensão a 72°C por 30 s; e uma extensão final a 72°C por 5 min, conforme descrito por

Mukhtar (2017). Em seguida, as amostras foram submetidas a separação eletroforética em gel de agarose a 3%, coradas com Syber Green, e visualizadas sob transiluminador de luz ultravioleta. Fragmento amplificado contendo 262 pb corresponde a indivíduos homozigotos do tipo selvagem do gene CCR5; fragmento contendo 230 pb corresponde a indivíduos homozigotos do tipo mutante CCR5 Δ 32. Indivíduos heterozigotos apresentam dois fragmentos: 265 pb e 230 pb.

3.4 Análises estatísticas

As frequências alélicas e genóticas foram determinadas por contagem direta, e os resultados obtidos foram utilizados para análise de variáveis dicotômicas pelo SNPSTAT, calculadas usando o modelo dominante, tendo em vista que o estudo possui dois tipos de genótipos: W/W e W/D. Os testes de comparação de médias (Teste T ou Mann-Whitney) foram utilizados para analisar as variáveis quantitativas por meio do software PRISMA.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 A doença de Parkinson: marco histórico

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por inflamação crônica, sendo descrita pela primeira vez pelo médico britânico James Parkinson, em 1817, num trabalho intitulado "An Essay on the Shaking Palsy". No estudo, ele descreveu os principais sintomas da doença quando o diagnóstico neurológico ainda não era conhecido. James Parkinson caracterizou as peculiaridades da doença em três pacientes, visando desmistificar o déficit cognitivo de intelecto como efeito colateral da paralisia. Entretanto, apenas em 1864, Charcot e Vulpian corrigiram uma lacuna histórica, denominando esse problema neurológico de doença de Parkinson (PARKINSON, 1817, p. 1; BERRIOS, 2016).

Entre o século XVIII e o início do século XIX, o que ainda era conhecido como paralisia foi considerado uma perda de movimentos e sensibilidade, tendo como característica sintomática o tremor. Apenas após a publicação de James Parkinson, o termo "paralisia" passou a ser considerado como algo mais profundo, sendo caracterizado como uma incapacidade ou enfraquecimento da sensibilidade e do movimento voluntário. De acordo com Parkinson, o tremor teria um início insidioso, com leve sensação de fraqueza, fadiga e interferência gradual em tarefas como escrever e comer (CULLEN, 1809; PARKINSON, 1817, pp. 3-7; BERRIOS, 2016).

Em 1893, foram feitas as primeiras observações e hipóteses acerca da hereditariedade da DP mencionadas por Gowers, após perceber que 15% de seus pacientes tinham familiares com tremor isolado ou Parkinson. Em 1945, Mjões descreveu casos familiares da doença e propôs que a DP teria traço autossômico dominante com 60% de penetração (GARCIA-RUIZ, 2014). Apenas em 1912, o patologista alemão Fritz Heinrich Lewy identificou estruturas anormais no cérebro dos pacientes — as agregações anormais de proteínas alfa-sinucleínas, observadas no córtex cerebral, mesencéfalo e tronco cerebral, que se tornaram uma característica marcante da doença (BERRIOS, 2016).

4.2 Epidemiologia

A doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente em todo o mundo, afetando entre 1% e 2% da população em todos os grupos étnicos e classes socioeconômicas. Em países industrializados, estima-se uma prevalência de 0,3% da DP na população geral; 1% em pessoas acima de 60 anos e 3% em pessoas acima de 80 anos, com taxa de incidência variando entre 8 a 18 por 100 mil pessoas/ano (LEE; GILBERT, 2016). Na Europa, as taxas de prevalência e incidência estimadas para DP variam entre 65 e 12.500 por 100 mil e 5 e 346 por 100 mil pessoas por ano, respectivamente (CAMPENHAUSEN et al., 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2014), a prevalência da DP é estimada entre 100 e 200 casos por 100 mil habitantes, e acredita-se que existam em média 10 milhões de pessoas vivendo com a doença. No Brasil, ainda não existem muitos estudos estatísticos para DP, porém estima-se que 200 mil pessoas sejam acometidas pela doença (DA SILVA; DE CARVALHO, 2019). A incidência e prevalência da doença aumentam com a idade: 4/100.000 indivíduos entre 50 e 59 anos; e 1/100.000 para aqueles entre 70 e 79 anos (WERNECK, 2010).

4.3 Neuroinflamação e o processo neurodegenerativo na DP

O sistema nervoso central (SNC) é considerado um dos mais complexos sistemas existentes no corpo humano. Existem células especializadas que atuam no cérebro para a sua estabilidade, conhecidas como células da glia, que servem para a manutenção, nutrição e proteção deste sistema. Dependendo da espécie, elas podem representar de 5 a 20% das células nervosas em um cérebro adulto, sendo compostas por: glia radial, astrócitos, microglia, NG2 e oligodendrócitos (RANSOHOFF et al., 2016; MECCA et al., 2018; ALLEN et al., 2018).

Em estados fisiológicos normais, a micróglia apresenta ramificações que verificam continuamente o parênquima circundante, atuando como fagócito mononuclear. Ao reconhecer uma anormalidade — como lesão tecidual ou infecção —, ocorrem mudanças morfológicas nessas células para um estado pró-inflamatório ativado, a fim de limitar os danos no tecido nervoso. Essa micróglia então muda para um fenótipo anti-inflamatório, promovendo a

expressão de citocinas e fatores de crescimento, cicatrização e restabelecimento da homeostase (MECCA et al., 2018; LEE et al., 2019).

Diversas alterações podem levar a um estado inflamatório no SNC, como infecções virais e bacterianas, liberação de lipopolissacarídeo (LPS), liberação de Ca^{2+} e o aumento de ferro na glia, fazendo com que astrócitos e microglias liberem mediadores inflamatórios. Com o envelhecimento, o aumento desses mediadores pode levar a um estado neuroinflamatório que contribui para o surgimento de doenças neurodegenerativas (BRODIN; DAVIS, 2017; RANSOHOFF, 2016; MECCA et al., 2018; KEMPUJAR et al., 2019).

Patologicamente, a DP é caracterizada pela degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância nigra pars compacta (SNPc), perda de suas projeções ascendentes para o striatum, diminuição do conteúdo de dopamina estriatal e acúmulo de alfa-sinucleína em inclusões intracitoplasmáticas chamadas corpos de Lewy (CL) (HIRSCH; HUNOT, 2009). Os CL são inclusões intraneuronais, redondas e eosinofílicas, compostos por mais de 90 proteínas, sendo os principais componentes a α -sinucleína e a ubiquitina (WAKABAYASHI et al., 2013; SPILLANTINI et al., 1997).

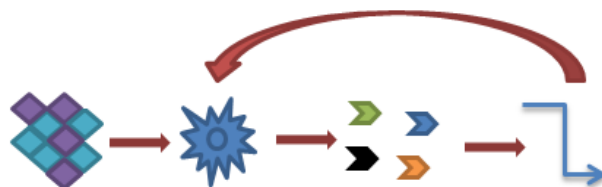


Figura 1 — Na DP, o acúmulo de Alfa-sinucleína ativa as células da glia, que liberam citocinas recrutando células do sistema imune, causando neurotoxicidade no SNC e declínio de neurônios dopaminérgicos, o que retroalimenta o estado de inflamação crônica.

Fonte: Harms AS et al. (2018); Dos-Santos-Pereira M et al. (2018).

4.4 Etiologia da doença de Parkinson

A etiologia da doença de Parkinson ainda não está completamente elucidada, mas diferentes causas genéticas têm sido identificadas em aproximadamente 5 a 10% dos casos. Sabe-se que esta é uma doença multifatorial que envolve fatores genéticos e ambientais. A predisposição genética, toxinas ambientais e envelhecimento são sugeridos como fatores de risco para o início e a progressão da doença (NAGATSU; SAWADA, 2006). Por outro lado, disfunções mitocondriais, estresse oxidativo, acúmulo de proteínas alteradas, excitotoxicidade e apoptose têm sido implicados como mecanismos moleculares e celulares responsáveis pela degeneração celular na DP (HIRSCH; HUNOT, 2009). Além disso, resultados de estudos pós-morte e estudos *in vivo* em pacientes e modelos animais sugerem que a neuroinflamação também contribui para a neurodegeneração (NAGATSU; SAWADA, 2006; TANSEY et al., 2007; GLASS et al., 2010; HIRSCH et al., 2003).

Devido à perda neuronal, observa-se um aumento no número de células ativas na substância negra na DP. Na doença, a neuroinflamação é vista como um ciclo vicioso e fator que leva a danos neuronais. Não se sabe ao certo o que dá início à morte celular, mas uma vez iniciado o processo, ele é uma das causas que leva à ativação das células gliais, provocando a progressão da doença (KEMPUJAR et al., 2016). Em geral, essas condições podem ser predispostas pelo acúmulo patológico de alfa-sinucleína, levando à ativação da glia e à formação dos corpos de Lewy e neuritos de Lewy (KEMPUJAR et al., 2016; LEE et al., 2019; DOS SANTOS PEREIRA et al., 2018).

Além disso, na DP foi observada uma diminuição do fenótipo microglial anti-inflamatório e um aumento do pró-inflamatório; astrócitos ativos regulam a liberação de fatores pró-inflamatórios e estão associados com a ativação da microglia, além de atuarem impedindo a regeneração axonal por formação de cicatrizes no SNC. Desta forma, astrócitos e microglia são as principais células associadas com a neuroinflamação em doenças neurodegenerativas (LEE et al., 2019; LI et al., 2019).

4.5 Quimiocinas

As quimiocinas são pequenas proteínas quimioatrativas de baixo peso molecular (8–15 kDa) que se ligam às proteínas G acopladas aos receptores de quimiocinas. Elas desempenham

um importante papel na migração celular, no desenvolvimento, na vigilância imunitária, na inflamação e em muitas condições patológicas (RAMAN et al., 2011). Essas proteínas são capazes de estimular e direcionar células imunes até o local da inflamação, promovendo a aderência às células-alvo, e se envolvem em processos de angiogênese, direcionamento de linfócitos e de órgãos linfoides secundários (ROSSI; ZLOTNIK, 2000; KLEINE-LOWINSKI et al., 2003; ZHENG et al., 2006).

Elas possuem uma estrutura tridimensional conservada, com uma folha beta centrada em três filamentos, uma alfa-hélice terminal C helicoidal sobrejacente e um terminal N em loop não estruturado, curto e conservado, extremamente importante para a ligação e ativação do receptor. Cada subfamília é definida pelas variações nessa configuração determinadas a partir da disposição e concentração dos resíduos de cisteínas e das sequências primárias de aminoácidos que formam ligações dissulfeto (HUGHES; BHATT, 2018; LEGLER; RANSOHOFF, 2016; KUFAREVA et al., 2017).

Cada receptor quimiotático encontra-se acoplado na superfície celular por sete segmentos helicoidais transmembranares acoplados à proteína G ou beta-arrestinas, liberando sinais transmembranares indutores para as quimiocinas (HUGHES; BHATT, 2018; STONE et al., 2017). De forma geral, existem aproximadamente 20 receptores conhecidos, nomeados utilizando a subfamília à qual pertencem, seguido da letra R e um número de identificação (STONE et al., 2017).

Tabela 1 — Principais quimiocinas envolvidas na resposta imune

Subfamília	Ligante	Nome comum	Receptor	Função
CC	CCL2	MCP-1	CCR2, CCR9, CCR11	Recrutamento de monócitos para o local da inflamação.
CC	CCL3	MIP-1-Alfa	CCR1, CCR5, CCR9	Recrutamento de células Natural Killer (NK).
CC	CCL4	MIP-1-Beta	CCR1, CCR5, CCR9	Recrutamento de células Natural Killer (NK).
CC	CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR4, CCR5	Recrutamento de células T ativadas para o local da inflamação.

CXC	CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	Estimula a liberação dos grânulos nos neutrófilos.
CXC	CXCL12	SDF-1	CXCR4	Promove o recrutamento de células hematopoiéticas.
CX3C	CX3CL1	Fractalquina	CX3CR1	Promove a comunicação entre os neurônios e as células da glia; relacionada ao trânsito de células imunes como monócitos, NK e células T.

Fonte: Gualtierotti et al. (2017); Stone et al. (2017).

4.6 CCR5 e a DP

Em doenças neurodegenerativas, as quimiocinas tanto podem contribuir com a neurodegeneração quanto podem proteger o SNC. As quimiocinas podem ativar a microglia e favorecer o tráfego de células imunes transendotelial pela barreira hematoencefálica até o SNC, proporcionando uma resposta inflamatória drástica e levando a danos e perdas neuronais. Além disso, a própria ativação da microglia já é um estímulo para a produção e secreção de quimiocinas, levando a um ciclo de respostas exageradas que amplifica a neuroinflamação (LIU et al., 2019; GUALTIEROTTI et al., 2017).

Uma importante quimiocina do grupo CC é o receptor CCR5 (Chemokine-CC-motif-receptor 5), localizado no cromossomo 3p21. Este receptor está amplamente envolvido com o recrutamento de leucócitos para o local da inflamação, devido à sua atuação incluir a migração, o crescimento na concentração de quimiocinas, células natural killers e células Th1 (BALISTRERI et al., 2007; CHOI et al., 2013).

Predominantemente, é possível detectar o CCR5 se expressando na superfície de monócitos e, quando observado no sistema nervoso, sua expressão constitutiva ocorre normalmente em astrócitos, neurônios associados à memória e microglia. Estudos comprovam que a relação deste receptor com neurônios e células da glia resulte na manutenção das atividades neuronais normais (CHOI et al., 2013; KHORRAM KHORSHID et al., 2012). Estima-se que o CCR5 esteja associado com os mecanismos que promovem a neuroproteção do SNC e influenciam a sobrevivência neuronal (JORDAN et al., 2019). O CCR5 é um receptor de

amplo espectro que se liga às quimiocinas CCL3, CCL4, CCL5, CCL11 e CCL13 (PALOMINO; MARTI, 2015; JORDAN et al., 2019).

Um fator intrigante associado a esta quimiocina foi a descoberta da relação direta entre a dopamina e o CCR5. Ao se estudar um grupo imunodeficiente pelo vírus HIV, tratado com metanfetamina, percebeu-se que a dopamina é um fator epigenético transcricional para o CCR5, e os efeitos em sua transcrição são mediados por receptores dopaminérgicos, principalmente pelo DRD4 e DRD1 (BASOVA et al., 2018; MONDAL et al., 2019).

Ainda não está claro o efeito do CCR5 em doenças neurodegenerativas, uma vez que o mesmo demonstrou ter resultados neuroprotetores e neurodegenerativos dependendo da doença ao qual o estudo foi direcionado (MONDAL et al., 2019). Variações na expressão ou na função causadas por polimorfismos genéticos de quimiocinas e seus receptores podem afetar estas funções e assim estar associadas com a predisposição e, possivelmente, a origem da DP. Estima-se que haja uma relação entre a deleção de 32 pares de bases no gene CCR5 — que resulta na produção de um receptor truncado e inativo — com o processo de inflamação em doenças neurodegenerativas (BALISTRERI et al., 2007; OTAEGUI et al., 2007).

Uma vez que importantes fatores na etiopatogênese da DP têm sido sugeridos para predisposição e progressão da doença, o objetivo deste estudo foi verificar se existe uma associação entre a deleção de 32 pb no gene CCR5 com a progressão da DP. Para o melhor dos nossos conhecimentos, este é o primeiro estudo a avaliar a associação deste polimorfismo com a progressão da DP na população brasileira.

5 RESULTADOS

Dos 213 pacientes diagnosticados com a doença de Parkinson, 194 foram genotipados para a presença da deleção no gene CCR5 como sendo do tipo selvagem (WT/WT), ou seja, sem a deleção de 32 pb. Os outros 19 pacientes tiveram mutação em apenas um dos alelos, sendo genotipados como heterozigotos (WT/D), e nenhum paciente foi homozigoto para a deleção (D/D).

5.1 Análise das variáveis paramétricas: início da doença, estágio HY e índice de progressão da doença

Para o início da doença, a média de idade dos pacientes com genótipo homozigoto selvagem WT/WT foi de $55,64 \pm 0,7350$ anos, enquanto a média de idade dos pacientes com genótipo WT/D foi de $53,89 \pm 2,4850$ anos. Para o estágio da escala HY, a média foi de $2,356 \pm 0,8531$ para pacientes com genótipo WT/WT e de $2,316 \pm 1,250$ para pacientes WT/D. Em relação ao índice de progressão, a média foi de $0,3957 \pm 0,2494$ para pacientes com genótipo WT/WT e de $0,3551 \pm 0,2172$ para pacientes com genótipo WT/D. Contudo, as análises estatísticas não mostraram diferença significativa para nenhuma das variáveis analisadas ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 — Normalidade das variáveis quantitativas no início da doença, estágio HY e índice de progressão

Variável	CCR5Δ32 WT/WT (Média ± Desvio Padrão)	CCR5Δ32 WT/D (Média ± Desvio Padrão)	p-Value
Início da doença	55,64 ± 0,7350	53,89 ± 2,4850	0,2676*
Estágio HY	2,356 ± 0,8531	2,316 ± 1,250	0,4090**
Índice de Progressão	0,3957 ± 0,2494	0,3551 ± 0,2172	0,0014**

* Teste t de Student — teste paramétrico de comparação de médias

** Mann-Whitney — teste não paramétrico de comparação de médias

5.2 Análise das variáveis dicotômicas (dor, bradicinesia, rigidez, tremor, discinesia, flutuação motora, alucinação visual e fadiga)

A Tabela 3 mostra a análise das variáveis categóricas dicotômicas, conforme relatado pelos pacientes com a doença de Parkinson, e a sua relação com o genótipo WT/WT ou WT/D. Em relação à ocorrência de dor, dos indivíduos que apresentaram genótipo WT/WT, 176 apresentaram dor e 18 não apresentaram. Como não houve nenhum indivíduo heterozigoto WT/D sem apresentar dor, não foi possível calcular o odds ratio (OR). Para a ocorrência de bradicinesia, não houve diferença estatisticamente significativa entre os genótipos (p-value = 0,53). Em relação à rigidez (p-value = 0,94), ao tremor (p-value = 0,67), à discinesia (p-value = 0,43), à flutuação motora (p-value = 0,75), à alucinação visual (p-value = 0,59) e à fadiga (p-value = 0,99), nenhuma diferença significativa foi detectada entre os grupos analisados. Diante do exposto, não foi encontrada diferença significativa para nenhuma das variáveis analisadas.

Tabela 3 — Variação categórica dicotômica para ocorrência de sintomas em pacientes com doença de Parkinson com genótipo W/W e W/D para CCR5A32

Variável/Genótipo CCR5A32	Presença N (%)	Ausência N (%)	OR (95% IC)	p-Value
DOR				
WT/WT	176 (0,91)	18 (0,09)	1	0,11
WT/D	18 (0,93)	0	NA	
BRADICINESIA				
WT/WT	176 (0,91)	18 (0,95)	1	0,53
WT/D	18 (0,09)	1 (0,05)	0,54 (0,07–4,31)	
RIGIDEZ				
WT/WT	162 (0,91)	32 (0,91)	1	0,94
WT/D	16 (0,09)	3 (0,09)	0,95 (0,26–3,45)	
TREMOR				
WT/WT	60 (0,92)	134 (0,90)	1	0,67
WT/D	5 (0,80)	14 (0,10)	1,25 (0,43–3,64)	
DISCINESIA				
WT/WT	147 (0,90)	45 (0,94)	1	0,43

WT/D	15 (0,10)	3 (0,06)	0,61 (0,17– 2,20)	
FLUTUAÇÃO MOTORA				
WT/WT	84 (0,90)	109 (0,92)	1	0,75
WT/D	9 (0,10)	10 (0,08)	0,86 (0,33– 2,20)	
ALUCINAÇÃO VISUAL				
WT/WT	162 (0,92)	31 (0,89)	1	0,59
WT/D	15 (0,08)	4 (0,11)	1,39 (0,43– 4,98)	
FADIGA				
WT/WT	49 (0,89)	41 (0,89)	1	0,99
WT/D	6 (0,11)	5 (0,11)	1 (0,28–3,5)	

NA = não aplicável; OR = odds ratio

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, investigou-se se a deleção de 32 pb no gene codificador de CCR5 (CCR5- Δ 32) estava associada com o risco ou progressão da doença de Parkinson. Embora o papel do receptor CCR5 nas doenças neurodegenerativas ainda não esteja claro, dois estudos prévios mostram que o CCR5 e seus ligantes atuam como agentes reguladores da aprendizagem e da cognição, pois ativam a micróglia auxiliando a migração transendotelial (ZHOU et al., 2016; BALISTRERI et al., 2007).

Dos 213 indivíduos com a doença de Parkinson genotipados, 8,9% (19/213) apresentaram a mutação CCR5- Δ 32. Estes resultados corroboram a literatura, que indica que a deleção de 32 pb no gene CCR5 está presente entre 2 e 10% da população geral, sendo mais comumente observada em populações caucasianas do norte da Europa (BALISTRERI et al., 2007; SALDANHA, 2008). A deleção CCR5- Δ 32 resulta numa mudança no quadro de leitura da proteína, produzindo uma proteína disfuncional de 215 aminoácidos, ao invés dos 352 aminoácidos da proteína funcional (MARTINSON et al., 1997). A proteína mutante é deficiente em domínios essenciais para interações com a proteína G e transdução de sinal, com consequências para a resposta imune e processos metabólicos subsequentes.

Os indivíduos homocigotos mutantes para CCR5- Δ 32 não produzem CCR5, e, assim, seus ligantes e outras quimiocinas não se ligam, enquanto indivíduos do tipo selvagem (WT) e os heterocigotos WT/D expressam níveis normais ou mínimos de CCR5, respectivamente (SAMSON et al., 1996; WINKLER et al., 2004).

Quando avaliada a relação do polimorfismo CCR5 Δ 32 com as características clínicas da doença — como tremores, discinesia, flutuação motora, alucinações visuais e fadiga — nenhuma associação significativa foi encontrada ($p > 0,05$ para todas as variáveis analisadas). Para o melhor dos nossos conhecimentos, este é o primeiro estudo a avaliar a associação das características clínicas de pacientes com a doença de Parkinson com o polimorfismo no gene CCR5. Contudo, estudos *in vitro* e modelos com animais utilizando antagonistas do receptor CCR5 foram capazes de reduzir a concentração de micróglia ativada e astrócitos, promovendo a atenuação da progressão da doença e dos seus sintomas clínicos (LIU et al., 2014).

Vale salientar que o presente estudo apresenta limitações, uma vez que os pacientes foram todos recrutados de um mesmo hospital e o tamanho da amostra foi relativamente pequeno, não podendo ser refutada a possibilidade de um viés de seleção. Além disso, a doença de Parkinson é uma doença complexa que pode ser afetada tanto por fatores genéticos quanto por fatores ambientais. Portanto, é importante continuar a investigar o papel do alelo CCR5 Δ 32 na patogênese da doença de Parkinson em outras populações, a fim de confirmar e estender estes resultados.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados indicam que a presença do genótipo CCR5 Δ 32 em pacientes com doença de Parkinson não apresentou associação significativa com a presença de tremores, discinesia, flutuação motora, alucinações visuais e fadiga. Além disso, também não foi encontrada associação deste polimorfismo com o início da doença, estágio da doença ou com o índice de progressão da mesma na população de estudo. Contudo, a interpretação dos resultados deve ser considerada com algumas limitações devido à baixa frequência do alelo CCR5 Δ 32 na população de estudo.

Desta forma, mais pesquisas com um número maior de pacientes e em diferentes populações são necessárias para investigar o papel desse alelo na patogênese da doença.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, N. J. et al. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science*, v. 362, n. 6411, p. 181-185, 2018.
- BALISTRERI, C. R. et al. CCR5 receptor: biologic and genetic implications in age-related diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1100, p. 162-172, 2007.
- BASOVA, L. et al. Dopamine is a transcription factor epigenético for CCR5 expression. *Journal of Neuroimmunology*, 2018.
- BERRIOS, G. E. *A history of mental symptoms*. Cambridge: Cambridge University Press, 2016.
- BONHAM, L. W. et al. CXCR4 involvement in neurodegenerative diseases. *Translational Psychiatry*, v. 8, n. 1, p. 73, 2018.
- BRODIN, P.; DAVIS, M. M. Human immune system variation. *Nature Reviews Immunology*, v. 17, n. 1, p. 21-29, 2017.
- CAMPENHAUSEN, S. von et al. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *European Neuropsychopharmacology*, v. 15, n. 4, p. 473-490, 2005.
- CHOI, D. Y.; LEE, M. K.; HONG, J. T. Lack of CCR5 modifies glial phenotypes and population of the nigral dopaminergic neurons, but not MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*, v. 49, p. 159-168, 2013.
- CULLEN, W. *First lines of the practice of physic*. Edinburgh: Bell & Bradfute, 1809.
- DA SILVA, T. P.; DE CARVALHO, C. R. A. Doença de Parkinson: o tratamento terapêutico ocupacional na perspectiva dos profissionais e dos idosos. *Cadernos Brasileiros de Terapia Ocupacional*, São Carlos, v. 27, n. 2, p. 331-344, 2019.
- DOS SANTOS PEREIRA, M. et al. Alpha-synuclein-induced neuroinflammation. *Experimental Neurology*, 2018.
- GARCIA-RUIZ, P. J. Genetics of Parkinson's disease. *International Review of Neurobiology*, v. 110, p. 19-32, 2014.

- GLASS, C. K. et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 918-934, 2010.
- GUALTIEROTTI, R. et al. Roles of microglial and monocyte chemokines and their receptors in regulating Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, v. 14, p. 1-12, 2017.
- HARMS, A. S. et al. Peripheral monocyte entry is required for alpha-synuclein induced inflammation and neurodegeneration in a model of Parkinson disease. *Experimental Neurology*, v. 300, p. 179-187, 2018.
- HIRSCH, E. C.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *The Lancet Neurology*, v. 8, n. 4, p. 382-397, 2009.
- HIRSCH, E. C. et al. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 991, p. 214-228, 2003.
- HUGHES, C. E.; BHATT, D. L. Defining the structures and properties of chemokines. *Nature Reviews Immunology*, 2018.
- JORDAN, J. et al. CCR5 and neuroprotection. *Journal of Neuroinflammation*, 2019.
- KEMPUJAR, D. et al. Neuroimmunology and neuroinflammation. *Expert Review of Neurotherapeutics*, v. 16, 2016.
- KHORRAM KHORSHID, H. R. et al. CCR5 expression in the brain. *Neuroscience Letters*, 2012.
- KLEINE-LOWINSKI, K. et al. Chemokine receptors in cancer. *Tumor Biology*, 2003.
- KRISTIANSEN, M. et al. Comparison of methods for detection of CCR5 Δ 32 deletion. *Journal of Virological Methods*, v. 97, n. 1-2, p. 77-82, 2001.
- KUFAREVA, I. et al. Structural basis of ligand selectivity for chemokine receptors. *Nature Chemical Biology*, 2017.
- LEE, A.; GILBERT, R. M. Epidemiology of Parkinson disease. *Neurologic Clinics*, v. 34, n. 4, p. 955-965, 2016.
- LEE, J. et al. Neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration. *Journal of Neuroinflammation*, 2019.

- LEGLER, D. F.; RANSOHOFF, R. M. Chemokine structure-function relationships. *Nature Reviews Immunology*, 2016.
- LI, X. et al. Astrocyte activation and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurochemical Research*, 2019.
- LIU, B. et al. CCR5 antagonism attenuates microglial activation in MPTP model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 2014.
- LIU, C. et al. Chemokines and their receptors in neurological diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2019.
- MARTINSON, J. J. et al. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nature Genetics*, v. 16, p. 100-103, 1997.
- MECCA, C. et al. Microglia and Alzheimer's disease. *BioMed Research International*, 2018.
- MONDAL, S. et al. CCR5 in the central nervous system. *Journal of Neuroimmunology*, 2019.
- MUKHTAR, M. Detection of CCR5 Δ 32 polymorphism by PCR. *Methods in Molecular Biology*, 2017.
- NAGATSU, T.; SAWADA, M. Molecular mechanism of the relation of monoamine oxidase B and its inhibitors to Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, v. 71, p. 53-65, 2006.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Global status report on noncommunicable diseases. Geneva: WHO, 2014.
- OTAEGUI, D. et al. CCR5 and multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, v. 185, p. 173-179, 2007.
- PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. *Einstein*, v. 13, n. 3, p. 469-473, 2015.
- PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy. London: Whittingham and Rowland, 1817.
- RAMAN, D. et al. Chemokines: a class of regulatory cytokines. *Advances in Clinical Chemistry*, 2011.
- RANSOHOFF, R. M. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience*, v. 19, n. 8, p. 987-991, 2016.

- RANSOHOFF, R. M. et al. The blood-brain barrier and CNS immune surveillance. *Nature Neuroscience*, 2016.
- ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. *Annual Review of Immunology*, v. 18, p. 217-242, 2000.
- SALDANHA, G. Molecular epidemiology of CCR5 Δ 32. *Infection, Genetics and Evolution*, 2008.
- SAMSON, M. et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR5 chemokine receptor gene. *Nature*, v. 382, p. 722-725, 1996.
- SINHA, P. et al. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, 2016.
- SPILLANTINI, M. G. et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, v. 388, p. 839-840, 1997.
- STONE, M. J. et al. Mechanisms of regulation of chemokine receptor signalling. *Biochemical Society Transactions*, 2017.
- TANSEY, M. G. et al. Neuroinflammation in Parkinson's disease: is there sufficient evidence for mechanism-based interventional therapy? *Frontiers in Bioscience*, v. 13, p. 709-717, 2007.
- WAKABAYASHI, K. et al. Lewy bodies in Parkinson's disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 72, 2013.
- WERNECK, A. L. S. Doença de Parkinson: etiopatogenia, clínica e terapêutica. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, Rio de Janeiro, v. 9, 2010.
- WINKLER, C. et al. CCR5 heterozygosity and HIV susceptibility. *AIDS*, 2004.
- ZHENG, H. et al. Chemokine receptors in cancer metastasis. *Journal of Clinical Investigation*, 2006.
- ZHOU, M. et al. CCR5 in learning and memory. *Science*, 2016.