

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS

Departamento de Genética

**CCR5 e variante CCR5Δ32: Funções, aplicações e impactos clínicos em condições
inflamatórias, doenças infecciosas e câncer**

Bruna Kulmann Leal

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do título de **Mestre
em Genética e Biologia Molecular**

Orientador: Dr. José Artur Bogo Chies

Coorientador: Dr. Joel Henrique Ellwanger

Porto Alegre, abril de 2021

INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Imunogenética e Imunologia do Departamento de Genética, Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A autora desta dissertação foi beneficiária de bolsa de mestrado e o orientador do trabalho contou com bolsa de produtividade em pesquisa, ambas fornecidas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Já o coorientador desta pesquisa contou com bolsa de pós-doutorado do Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Para além, recursos do Laboratório de Imunogenética e Imunologia e do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), ao qual a presente dissertação está vinculada, foram também utilizados para financiar o trabalho de mestrado. O projeto de pesquisa original vinculado a este trabalho foi realizado em conjunto com o Serviço de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HPCA), tendo esta instituição participado também como agência financiadora. Os vínculos institucionais dos pesquisadores envolvidos neste trabalho estão evidenciados no decorrer da dissertação.

Dedico esta dissertação a meus pais, que sempre se dedicaram e se esforçaram para eu ter a melhor educação possível e para que eu pudesse continuar na carreira científica com sucesso.

AGRADECIMENTOS

Realizar o trabalho aqui descrito no atual cenário mundial não foi exatamente fácil. No início de 2020, coincidentemente o final do meu primeiro ano de mestrado, observamos a pandemia da COVID-19 se alastrar e se consolidar no país. Logo, muito do que fora planejado para o projeto de pesquisa apresentado nesta dissertação não pode ser concretizado. Ainda assim, nos esforçamos para apresentar o melhor trabalho possível, e posso afirmar: os resultados aqui apresentados foram fruto de empenho conjunto e forte controle emocional por parte de todos os envolvidos. Terminar esse ciclo diante do contexto nacional é, antes de mais nada, um desafio a ser cumprido.

Assim, começo agradecendo meus queridos orientadores, José Artur Bogo Chies e Joel Henrique Ellwanger. Nós sabemos dos obstáculos que precisamos ultrapassar durante esse período adverso para concluir não só o presente trabalho, mas todos os projetos que nos propomos a realizar nos últimos meses. Por isso, muito obrigada a ambos que sempre estiveram presentes e foram a base para que eu pudesse apresentar um trabalho de ponta, mesmo com todas as dificuldades que apareceram no caminho. Aproveito para agradecer também a todos os meus colegas do Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética. A convivência é um pilar muito importante da experiência de laboratório, e sem vocês, meus dias teriam sido muito mais difíceis.

Quero agradecer também a minha família, especialmente aos meus pais que sempre contribuíram de forma decisiva para que eu chegasse até aqui. Sei que não foi fácil me proporcionar a educação que me foi garantida, e só posso agradecer imensamente pois, sem dúvidas, fez toda a diferença. Além de tudo, passar por esse momento juntos me deu forças para continuar; não sei se teria conseguido sozinha. Por isso, obrigada a todos vocês, minha mãe, meu pai, minhas irmãs. Ao restante da família, vocês também foram parte importante do meu sucesso até aqui. Sinto saudades de todos, em breve espero que possamos nos reunir.

Aos meus amigos, quero agradecer por todo apoio durante essa jornada. A amizade de todos foi essencial para que os dias se tornassem mais agradáveis. Novamente, saudades de todos e logo mais, se tudo der certo, poderemos comemorar nossas conquistas juntos. A

todos que amo, minha vida não seria a mesma sem vocês. Com toda a certeza, se estou aqui agora escrevendo esses agradecimentos, é por causa de vocês. Sozinha, eu não seria nada. Agradeço eternamente pelo amor de todos vocês.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS	2
AGRADECIMENTOS	4
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	7
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	11
1. CCR5 e a variante CCR5 Δ 32.....	11
2. CCR5 e câncer.....	13
3. CCR5 Δ 32 e supressão viral sustentada em pacientes infectados pelo HIV	14
4. Uma breve revisão sobre HLA e transplante de medula óssea	16
OBJETIVOS	18
1. Objetivo geral.....	18
2. Objetivos específicos.....	18
CAPÍTULO 1	19
CAPÍTULO 2	75
CAPÍTULO 3	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	102
REFERÊNCIAS	105
ANEXO - APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA	108

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AIDS: *Acquired Immunodeficiency Syndrome* / Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

CCR5: *C-C Chemokine Receptor 5* / Receptor C-C de Quimiocinas 5

CCR5 Δ 32: Polimorfismo que consiste na deleção de 32 pares de bases no gene *CCR5*

CD34: *Cluster of Differentiation 34* / Grupamento de Diferenciação 34

CD4: *Cluster of Differentiation 4* / Grupamento de Diferenciação 4

CD8: *Cluster of Differentiation 8* / Grupamento de Diferenciação 8

DNA: *Deoxyribonucleic Acid* / Ácido Desoxirribonucleico

HIV: *Human Immunodeficiency Virus* / Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA: *Human Leukocyte Antigen* / Antígeno Leucocitário Humano

MIP-1 α /CCL3: *Chemokine (C-C motif) Ligand 3* / Ligante de Quimiocina 3

MIP-1 β /CCL4: *Chemokine (C-C motif) Ligand 4* / Ligante de Quimiocina 4

NK: *Natural Killer Cell* / Células Matadoras Naturais

pb: Pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction* / Reação em Cadeia da Polimerase

RANTES/CCL5: *Chemokine (C-C motif) Ligand 5* / Ligante de Quimiocina 5

REDOME: Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea

Δ : Delta

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Representação esquemática do gene <i>CCR5</i> e a variante <i>CCR5</i> Δ 32	13
Figura 2. Perfil de expressão do receptor <i>CCR5</i> de acordo com os genótipos da variante Δ 32	15
Figura 3. Frequências do alelo <i>CCR5</i> Δ 32 ao redor do mundo	102

RESUMO

O CCR5 é um importante receptor celular do sistema imune, atuando principalmente no controle da migração de monócitos/macrófagos e linfócitos T. Além disso, possui um papel bem definido na infecção pelo HIV-1, sendo o principal correceptor utilizado pelo vírus para realizar sua penetração na célula hospedeira. A variante CCR5 Δ 32 (rs333) é um polimorfismo do gene CCR5 que consiste em uma deleção de 32 pb no éxon 3, acarretando a expressão de uma proteína truncada não-funcional. O alelo Δ 32 originou-se no continente Europeu e atualmente possui uma distribuição bastante heterogênea. No Brasil, verifica-se uma maior frequência da variante na região sul em razão da configuração predominantemente de origem Europeia da população. Diversos trabalhos avaliaram o papel da variante CCR5 Δ 32 em condições inflamatórias, doenças infecciosas e câncer, apresentando resultados controversos para vários dos desfechos investigados. Na presente dissertação, os estudos avaliando a frequência deste alelo de maneira ampla no Brasil são revisados (artigo apresentado no Capítulo 1). Quando tratamos especificamente de câncer, verificamos que o alelo Δ 32 atua de maneira diferente em tipos distintos de neoplasias. Além dos trabalhos brasileiros, percebe-se que a expressão de CCR5 pode estar associada com malignidades, como o surgimento de metástase e controle inflamatório do microambiente tumoral. Neste contexto, hipotetizamos sobre o papel da interação entre a molécula CD34, marcadora de células-tronco hematopoiéticas, com o CCR5 no desenvolvimento de câncer (artigo apresentado no Capítulo 2). Em seguida, discutimos o papel da variante CCR5 Δ 32 na infecção pelo HIV, trazendo a estratégia de remissão sustentada realizada pela primeira vez há doze anos e, mais recentemente, pela segunda vez, há dois anos, com base no transplante de células tronco com genótipo Δ 32/ Δ 32. Aqui, apresentamos um artigo original (Capítulo 3) avaliando a frequência do CCR5 Δ 32 em doadores voluntários de medula óssea do Rio Grande do Sul cadastrados no Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME), além de investigar uma possível associação da presença de alelos específicos de HLA com tal polimorfismo. Encontramos uma frequência alélica de 7,1%, e uma frequência do genótipo Δ 32/ Δ 32 de 0,76%. Esses números provavelmente são superestimados em relação à população brasileira como um todo, visto que apenas indivíduos da região sul foram incluídos no estudo. No entanto, o estudo revela um número substancial de doadores disponíveis em um contexto nacional que podem fornecer células com o genótipo Δ 32/ Δ 32 para novas tentativas de remissão sustentada da infecção pelo HIV. Por fim, não encontramos associações dos alelos de HLA com a variante, mas o locus *HLA-B* se mostrou um interessante objeto de estudo futuro.

Palavras-chave: Brasil; câncer; CCR5; CCR5 Δ 32; inflamação; HLA; HIV

ABSTRACT

CCR5 is an important immune system cell receptor, acting mainly on the migration control of monocytes/macrophages and T lymphocytes. Also, it has a well-defined role in HIV-1 infection, being the main coreceptor used by the virus to penetrate the host cell. The variant CCR5 Δ 32 (rs333) is a polymorphism of the *CCR5* gene, which consists of a 32-bp deletion in exon 3, leading to the expression of a non-functional truncated protein. The Δ 32 allele originated in the European continent and currently has a very heterogeneous distribution. In Brazil, there is a high frequency of the variant in the southern region, due to the predominantly European origin of the population. Several studies evaluated the role of the Δ 32 variant in inflammatory conditions, infectious diseases and cancer, with controversial results for several of the investigated outcomes. In the present work, studies evaluating the frequency of this allele in different outcomes in Brazil are reviewed (article included in Chapter 1). When we specifically focus on cancer, we find that the Δ 32 allele acts differently in different types of neoplasms. In addition, the expression of CCR5 may be associated with malignancies, such as the appearance of metastasis and in the inflammatory control of the tumor microenvironment. In this context, we hypothesized about the interaction between the CD34 molecule, a hematopoietic stem cell marker, with CCR5 in cancer development (article included in Chapter 2). Next, we discussed the role of the CCR5 Δ 32 variant in HIV-1 infection, bringing the strategy of sustained remission carried out for the first time twelve years ago and, more recently for the second time, two years ago, based on stem cell transplantation with Δ 32/ Δ 32 genotype. Here, we present an original study (Chapter 3) evaluating the CCR5 Δ 32 frequency in voluntary bone marrow donors from Rio Grande do Sul registered in *Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea* (REDOME), in addition to investigating a possible association of the presence of specific HLA alleles with such polymorphism. We found an allele frequency of 7.1%, and a frequency of the Δ 32/ Δ 32 genotype of 0.76%. These numbers are probably overestimated in relation to the Brazilian population as a whole, as only the southern region was included in the study. However, it suggests a substantial number of available donors in a national context that can supply cells with the Δ 32/ Δ 32 genotype for further attempts of sustained remission of HIV infection. Finally, we did not find associations between the HLA alleles with a variant, but the *HLA-B* locus is an interesting object for future studies.

Keywords: Brazil; cancer; CCR5; CCR5 Δ 32; inflammation; HLA; HIV

INTRODUÇÃO

O sistema imune e suas diversas moléculas orquestram uma miríade de processos, participando de respostas a patógenos e defesa contra danos e lesões celulares e teciduais. Por outro lado, o sistema imune pode, quando em desequilíbrio, ser o responsável pela geração de doenças. Dentre esse sistema complexo, as quimiocinas e seus receptores atuam como moléculas chave para a migração celular, função característica das células componentes do sistema imune, que precisam se locomover para os sítios de ação em que a resposta imunológica deve ocorrer em determinada situação (Zlotnik and Yoshie 2012; Sokol and Luster 2015; Ellwanger et al. 2020a).

Além disso, as moléculas quimiotáticas promovem uma comunicação entre sistema imune inato e adaptativo, sendo especialmente relevantes para o refinamento da resposta imune celular (Zlotnik and Yoshie 2012; Sokol and Luster 2015). As quimiocinas são moléculas que, ao interagirem com seus respectivos receptores, promovem a mobilidade da célula e a migração da mesma para os locais originais de suas produções, guiando o caminho por gradientes de concentração (Zlotnik and Yoshie 2012; Sokol and Luster 2015; Ellwanger et al. 2020a). Já os receptores de quimiocinas são receptores associados à proteína G com uma ampla variedade de especificidades, sendo alguns mais promíscuos enquanto outros se ligam apenas a quimiocinas específicas (Zlotnik and Yoshie 2012; Sokol and Luster 2015; Ellwanger et al. 2020a).

1. CCR5 e a variante CCR5Δ32

O Receptor CC de Quimiocinas 5 (CCR5) é um importante mediador da resposta imune adaptativa, sendo expresso principalmente por monócitos e macrófagos e células T CD4⁺ de perfil Th1, mas também pode ser encontrado em outros tipos celulares como células NK e T reguladoras (Zlotnik and Yoshie 2012; Sokol and Luster 2015; Ellwanger et al. 2020a). Seus principais ligantes são as quimiocinas CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) e CCL5 (RANTES), podendo ocorrer interações também com CCL8, CCL13 e CCL16 (Zlotnik and Yoshie 2012; Sokol and Luster 2015; Ellwanger et al. 2020a). O CCR5 consiste em um receptor associado à proteína G com sete domínios transmembrana de 352

aminoácidos codificado pelo gene *CCR5*, localizado no braço curto do cromossomo 3 (3p21.31) humano (Samson et al. 1996; Alkhatib 2009). Além de seu papel fisiológico, o *CCR5* é conhecido por ser um importante correceptor utilizado pelo HIV-1 para a penetração na célula hospedeira (Ellwanger et al. 2020a).

Dada a relevância desse receptor no processo infeccioso do HIV-1, fármacos antagonistas de *CCR5* foram desenvolvidos para inibir a ligação da partícula viral à molécula, assim como foram desenvolvidas tentativas de edição gênica para excisar o *CCR5*, com o objetivo de ampliar os protocolos terapêuticos contra a infecção (Zlotnik and Yoshie 2012; Ellwanger et al. 2019). Além dessas abordagens, um polimorfismo genético confere resistência ao HIV de maneira natural. A variante *CCR5* Δ 32 (rs333) consiste em uma deleção de 32 pares de bases na região codificante (exon 3) do gene *CCR5*, ocasionando a geração de um códon de parada prematuro. A deleção ocorre na região correspondente à formação do segundo *loop* extracelular da proteína, e com o códon de parada gerado pela variante, o terceiro *loop* extracelular e a região C-terminal do receptor não são formados. Dessa forma, há a produção de uma proteína truncada que não é levada a superfície celular, impedindo sua função como receptor de quimionas (Dean et al. 1996; Liu et al. 1996; Samson et al. 1996; Silva-Carvalho et al. 2016; Ellwanger et al. 2020a). A **Figura 1** demonstra a estrutura molecular simplificada do *CCR5* e da variante *CCR5* Δ 32.

O *CCR* Δ 32 possui frequências bastante diversas em diferentes populações humanas, sendo mais comum em países do norte da Europa, com frequências de 10-20%, e praticamente ausente em países africanos e asiáticos (Libert et al. 1998; Silva-Carvalho et al. 2016). Isso se deve a origem da variante, que parece ter ocorrido relativamente recentemente, em um único evento mutagênico em alguma população Europeia (Libert et al. 1998).

Devido a processos de colonização e a atual globalização, povos com grandes taxas de miscigenação também podem apresentar a variante em uma frequência considerável. No Brasil, a frequência média do alelo Δ 32 é de 4%, porém é bastante variável ao longo do território, podendo variar entre frequências tão baixas quanto menos de 1% a tão altas quanto 9%. Em geral, a frequência da variante é mais alta em populações com maiores

contribuições europeias na composição genética (Boldt et al. 2009; Farias et al. 2012; Silva-Carvalho et al. 2016; Solloch et al. 2017).

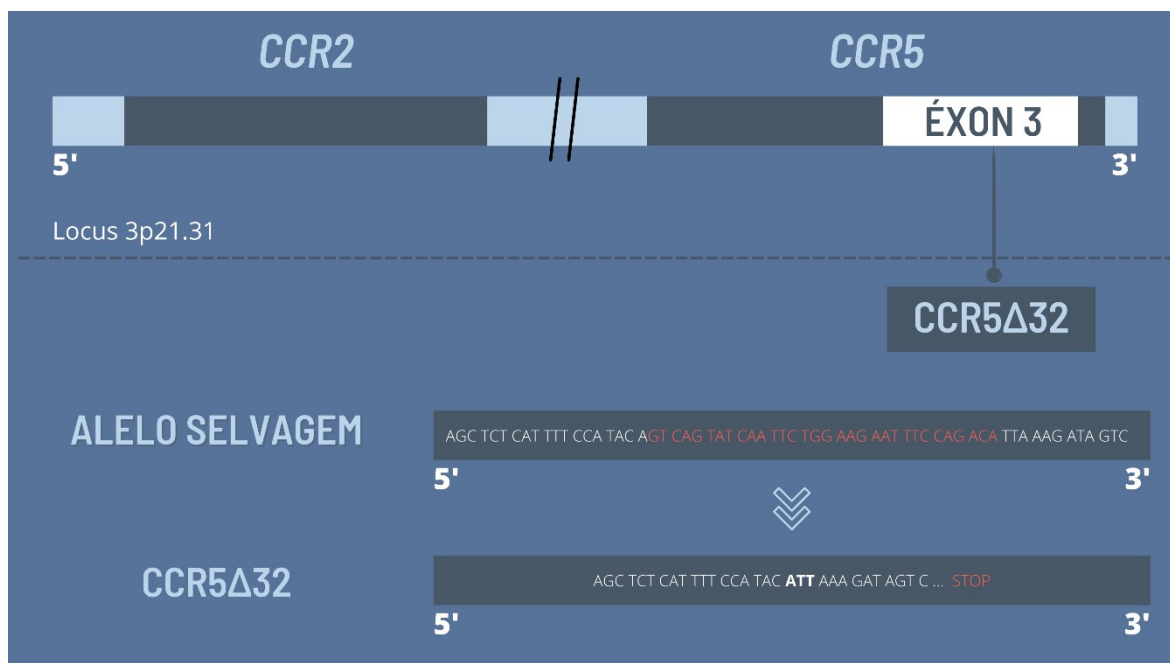


Figura 1. Representação esquemática do gene *CCR5* e a variante *CCR5Δ32*. No alelo selvagem, a região em vermelho destaca os nucleotídeos deletados, inexistentes no alelo $\Delta 32$.

Há uma quantidade considerável de trabalhos avaliando a frequência da variante *CCR5Δ32* no Brasil. No entanto, é importante ressaltar que boa parte desses estudos são realizados com o objetivo de avaliar a frequência do alelo em contextos clínicos específicos, e mesmo em alguns desses contextos, o papel do *CCR5Δ32* ainda não é bem estabelecido. Assim, o **Capítulo 1** dessa dissertação retoma conceitos importantes sobre a variante e faz uma ampla revisão nos trabalhos investigando a frequência do alelo $\Delta 32$ no Brasil.

2. *CCR5* e câncer

Conforme discutido anteriormente, as quimiocinas são moléculas-chave para a migração celular, inclusive em situações de câncer: essas proteínas e seus receptores atuam

controlando o tráfego de células do sistema imune no microambiente tumoral. O papel atribuído às quimiocinas e seus receptores no câncer se torna uma ‘faca de dois gumes’, podendo contribuir para respostas antitumorais e, quando produzidas por células malignas, para a manutenção do tumor (Aldinucci et al. 2008; Balkwill 2012; Che et al. 2015; Halama et al. 2016). O CCR5, sendo um receptor de quimiocinas fundamental para a migração leucocitária, é um fator notável para o estabelecimento de processos inflamatórios. Dentre as atuações já levantadas do CCR5 na tumorigênese estão a migração de células malignas e geração de metástase, assim como o controle da inflamação no microambiente tumoral a partir de células regulatórias CCR5+ (Kulmann-Leal et al. 2020).

Interessantemente, Enrich et al. (2017) observaram um repertório menor de células CD34+ em indivíduos homocigotos para a variante CCR5 Δ 32. A molécula CD34 é um marcador biológico de células-tronco hematopoiéticas e está associada a processos angiogênicos, podendo ser encontrada em células tumorais. Visto que tanto CCR5 como CD34 podem ser fatores pró-tumorais, e que pode potencialmente haver uma conexão funcional entre ambas as moléculas, a presente dissertação aborda no **Capítulo 2** a hipótese de que as moléculas CCR5 e CD34, juntas, podem atuar na proliferação de células tumorais e no estabelecimento de câncer (Kulmann-Leal et al. 2020).

3. CCR5 Δ 32 e supressão viral sustentada em pacientes infectados pelo HIV

A respeito do papel da variante CCR5 Δ 32 na infecção pelo HIV-1, observa-se que indivíduos que possuem o alelo em homocigose apresentam uma alta resistência a infecção, pois, apesar de o CCR5 não ser o único correceptor possível para a ligação da proteína viral gp41, a maioria das cepas de HIV-1 o tem como preferência. Indivíduos heterocigotos para a variante, no entanto, não possuem a mesma resistência. Porém, verifica-se nesses últimos uma progressão mais lenta a AIDS quando comparados a indivíduos homocigotos para o alelo selvagem (sem deleção) (Huang et al. 1996; Hutchinson 2001; Ellwanger et al. 2020b). Essas consequências se dão pelos perfis de expressão ocasionados pelos genótipos, conforme demonstrados na **Figura 2**.

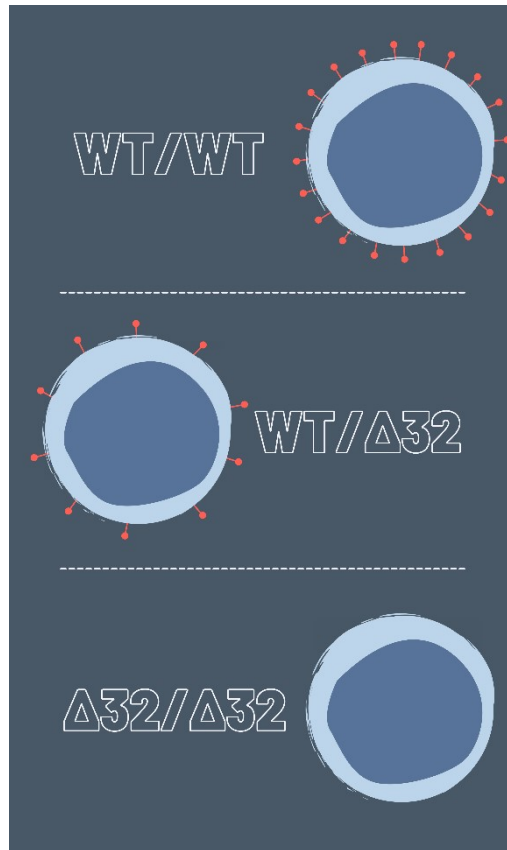


Figura 2. Perfil de expressão do receptor CCR5 (em vermelho) de acordo com os genótipos da variante CCR5 Δ 32. Indivíduos homocigotos para o alelo selvagem (WT/WT, sem deleção) expressam uma quantidade normal do receptor em suas superfícies celulares. Indivíduos heterocigotos (WT/ Δ 32, portando uma cópia do alelo com deleção) expressam aproximadamente metade da quantidade que indivíduos WT/WT produzem. Indivíduos homocigotos para a variante (Δ 32/ Δ 32, portando duas cópias do alelo com deleção) não expressam CCR5 nas membranas celulares.

O conhecimento a respeito da resistência gerada pela variante CCR5 Δ 32 serviu como base para uma estratégia inovadora que resultou na remissão sustentada da infecção pelo HIV, sem a necessidade de uso contínuo de medicamentos antirretrovirais. Em 2009, o grupo de Hütter et al. (2009) publicou o trabalho que trouxe à tona a discussão sobre cura esterilizante da infecção pelo HIV, divulgando o caso do conhecido ‘Paciente de Berlim’. Timothy Ray Brown, um indivíduo com sorologia positiva para HIV, havia desenvolvido uma leucemia mieloide aguda e, como tratamento para tal, passaria por um transplante de medula óssea. A equipe médica, então, buscou como doador um indivíduo com genótipo

$\Delta 32/\Delta 32$. Após o transplante, Timothy teve sua terapia antirretroviral interrompida e foi acompanhado por um extenso período. Após alguns meses, o Paciente de Berlim passou a apresentar carga viral indetectável, o que foi mantido até a data de seu falecimento, em 2020 (Hütter et al. 2009; Hütter and Thiel 2011; Brown 2015; Hope et al. 2020).

Em 2019, o segundo caso de remissão sustentada da infecção pelo HIV pós-transplante com células-tronco hematopoiéticas $\Delta 32/\Delta 32$ foi publicado. Seguindo um protocolo muito similar ao de Hütter et al. (2009), Adam Castillejo, um indivíduo HIV+ que havia desenvolvido linfoma de Hodgkin, ficou conhecido como o ‘Paciente de Londres’, em referência ao primeiro caso de cura esterilizante. Até então, os relatos acerca da carga viral de Adam demonstram a mesma remissão sustentada observada em Timothy (Gupta et al. 2019; Gupta et al. 2020).

Dada a relevância da revolucionária terapia demonstrada por Hütter et al. (2009), Enrich et al. (2017) e Solloch et al. (2017) realizaram triagens em bancos europeus de células-tronco hematopoiéticas para verificar a frequência do alelo $\Delta 32$ em potenciais doadores de medula óssea. A partir da observação de que é possível encontrar um número razoável de indivíduos dispostos a doar medula óssea apresentando homozigose para a variante CCR5 $\Delta 32$, o **Capítulo 3** desta dissertação apresenta um artigo original avaliando a frequência do alelo $\Delta 32$ em Brasileiros cadastrados no Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea (REDOME), além de investigar possíveis associações CCR5 $\Delta 32$ com alelos de Antígeno Leucocitário Humano (HLA). Saber se o alelo $\Delta 32$ está associado (em termos de maior frequência) a alelos HLA específicos ajudaria a prever quais indivíduos poderiam mais facilmente encontrar um doador compatível tanto para CCR5 $\Delta 32$ quanto para HLA.

4. Uma breve revisão sobre HLA e transplante de medula óssea

O transplante de medula óssea é um tratamento sugerido para distúrbios envolvendo os chamados elementos figurados do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas), que são formados a partir de células-tronco hematopoiéticas, geradas na medula óssea. O procedimento consiste na substituição desse tecido do paciente por uma medula saudável, obtida de um doador compatível. Essa compatibilidade, por sua vez, é dada principalmente

pelo chamado Sistema de Antígeno Leucocitário Humano, ou HLA. As diversas moléculas de HLA constituem o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) em humanos, sendo divididas em genes de classe I e genes de classe II (Bjorkman et al. 1987; Thomas 1999; Fernandes et al. 2003).

Os genes clássicos de classe I, *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*, são expressos por praticamente todas as células do corpo e possuem uma quantidade exorbitante de polimorfismos, especialmente o *HLA-B*. Já os genes de classe II, *HLA-DR*, *HLA-DQ* e *HLA-DP*, são expressos predominantemente por células apresentadoras de antígeno, e atuam diretamente nas respostas imunes celulares (Fernandes et al. 2003). Para que um transplante tenha sucesso e não desencadeie a chamada Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro, o tecido doado precisa possuir um elevado grau de similaridade de moléculas HLA em relação ao paciente a receber o transplante. Em geral, três loci principais de HLA são analisados nesse contexto: *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DR* (Morishima et al. 2002).

Como já comentado, a estratégia utilizada por Hütter et al. (2009) e Gupta et al. (2019) requer uma significativa compatibilidade tecidual entre doador e receptor. No **Capítulo 3** desta dissertação, é avaliada uma possível associação entre a presença de alelos específicos dos loci *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DR* e a variante *CCR5 Δ 32*, para ampliar o conhecimento acerca da seleção de doadores com genótipo Δ 32/ Δ 32 para a realização de transplante de medula óssea em indivíduos HIV+.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Investigar a molécula CCR5 de forma múltipla, focando no papel da proteína e da variante genética CCR5 Δ 32 em doenças inflamatórias e câncer, na distribuição do alelo Δ 32 no território brasileiro e na identificação de possíveis doadores de células-tronco hematopoiéticas para novas tentativas de remissão sustentada da infecção pelo HIV.

2. Objetivos específicos

- Revisar os trabalhos que investigaram a variante CCR5 Δ 32 no Brasil;
- Investigar o impacto da miscigenação sobre a frequência da variante CCR5 Δ 32 no Brasil;
- Construir uma hipótese sobre a correlação funcional entre CCR5 e CD34, discutindo seu impacto no desenvolvimento de câncer;
- Avaliar a frequência da variante CCR5 Δ 32 em indivíduos do Rio Grande do Sul registrados no REDOME;
- Identificar a frequência de indivíduos homocigotos para a variante CCR5 Δ 32 que estão registrados como potenciais doadores de medula óssea;
- Investigar a possível associação entre alelos específicos de HLA e a variante CCR5 Δ 32.

CAPÍTULO 1

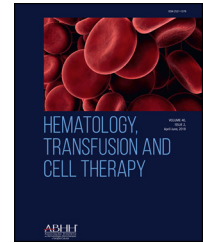
O presente capítulo apresenta um artigo de revisão que contempla os dois primeiros objetivos específicos desta dissertação, a ser submetido ao periódico *Gene*:

KULMANN-LEAL, Bruna; ELLWANGER, Joel Henrique; CHIES, José Artur Bogo. **CCR5 Δ 32 in Brazil: Impacts of a European genetic variant on a highly admixed population.** 2021. *Artigo em preparação para submissão.*

CAPÍTULO 2

O presente capítulo traz um artigo de hipótese que contempla o terceiro objetivo específico desta dissertação, publicado no periódico *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*:

KULMANN-LEAL, Bruna; ELLWANGER, Joel Henrique; CHIES, José Artur Bogo. **A functional interaction between the CCR5 and CD34 molecules expressed in hematopoietic cells can support (or even promote) the development of cancer.** *Hematol., Transfus. Cell Ther.*, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 70-76, Mar. 2020.



Special article

A functional interaction between the CCR5 and CD34 molecules expressed in hematopoietic cells can support (or even promote) the development of cancer

Bruna Kulmann-Leal , Joel Henrique Ellwanger , José Artur Bogo Chies *

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 April 2019

Accepted 17 October 2019

Available online 29 November 2019

Keywords:

CC chemokine receptor 5

CCR5 Δ 32

CD34

Cancer

Angiogenesis

Tumorigenesis

Inflammation

ABSTRACT

Inflammation and angiogenesis are linked to the development of cancer since both can support the establishment of a tumor-prone microenvironment. The CCR5 is a major regulatory molecule involved in inflammation. The CD34 molecule is commonly described as a hematopoietic stem cell marker, and CD34⁺ cells are involved in the regulation of distinct physiological processes, including angiogenesis. CCR5 participates in the development of various types of cancer, and recently, a reduced CCR5 expression was associated with low CD34⁺ cell counts in human cord blood. A naturally occurring genetic variant of the CCR5 gene, the so-called CCR5 Δ 32 polymorphism, consists of a 32 base-pair deletion in the DNA, interfering in the CCR5 protein levels on the cell surface. When in homozygosis, this variant leads to a total absence of CCR5 expression on the cell surface. In heterozygous individuals, CCR5 surface levels are reduced. Based on these key findings, we hypothesize that a functional interaction can connect CCR5 and CD34 molecules (giving rise to a “CCR5-CD34 axis”). According to this, a CCR5-CD34 interaction can potentially support the development of different types of cancer. Consequently, the lack of CCR5 in association with reduced CD34⁺ cell counts could indicate a protective factor against the development of cancer. It is required to characterize in detail the functional relationship between CCR5 and CD34 proteins, as well as the real influence of both molecules on the susceptibility and development of cancer at population level. If our hypothesis is confirmed, the CCR5-CD34 axis may be a potential target in the development of anti-cancer therapies.

© 2019 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author at: Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética (Prédio 43323, Laboratório 212), Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale, Porto Alegre RS, Brazil.

E-mail address: jabchies@terra.com.br (J.A. Chies).

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2019.10.001>

2531-1379/© 2019 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Background

CD34⁺ cells – stem cells which could turn bad

The CD34 molecule is a commonly targeted antigenic determinant used as a characteristic marker to isolate and analyze hematopoietic stem cells.¹⁻⁹ This protein is expressed by all hematopoietic stem cells and its expression is lost during the cell differentiation. Therefore, mature hematopoietic cells are usually CD34 negative.¹ On the other hand, this molecule is also present in a variety of mature cell types, as mesenchymal cells, muscle satellite cells, corneal keratocytes, interstitial cells, epithelial progenitors, vascular endothelial progenitors, and activated endothelial cells.¹⁰ Of note, CD34 expression has been already correlated to vasculogenic and angiogenic processes, the mesenchymal CD34⁺ stem cells being closely associated to vascularization.^{1,4-6,8,9,11} Importantly, both vasculogenic and angiogenic processes are essential to the development of cancer.¹²⁻¹⁷ Additionally, there are numerous studies describing CD34 expression in tumor cells,^{2,5,6,9,18} although the loss of this molecule has been associated with an invasive malignant phenotype.^{8,19} In this context, the CD34 molecule can be viewed in neoplastic cells as a dedifferentiation marker. Also, CD34 could be expressed by endothelial cells and endothelial progenitors as a potential tumor vascularization marker.

CCR5: a chemokine receptor with multiple inflammatory functions

Chemokines are fundamental regulators of the development, differentiation, and migration of leukocytes.²⁰⁻²⁴ In addition, chemokines participate in the angiogenic process.^{21,25} The CC Chemokine Receptor 5 (CCR5) is a well-known example of such molecules, being especially involved in leukocyte migration.²⁶ Furthermore, CCR5 is well-known due to its classic role as a co-receptor molecule used by the HIV type I viruses.^{21,25,27-31} In addition, CCR5 acts in Th1 immune responses and the lack of signaling through this molecule leads to a shift in the Th2 responses.^{20,21} Several chemokines were described as efficient agonists of this receptor, such as RANTES (CCL5), MIP-1 α (CCL3) and MIP-1 β (CCL4). On the other hand, some chemokines interact less efficiently with CCR5^{20-22,25,27,32} or are classified as CCR5 antagonists, which is the case of CCL7.^{25,29} Of note, the impact of CCR5 on the development of cancer is an emerging topic, with several studies suggesting that CCR5 plays an important role in the establishment of the tumor microenvironment and progression of different types of cancer. Notably, the CCR5 molecule has been related to the migration and spread of tumor cells, and therefore, to metastasis. Moreover, the presence of the receptor in neoplasms has been associated with the migration of regulatory cells and generation of an immunosuppressor tumor-prone environment. Detailed examples and other effects of CCR5 on tumorigenesis are shown in [Table 1](#).^{22-24,33-44}

As mentioned above, the CCR5 protein has a regulatory effect on inflammatory cells,^{26,27} thus it must have an enhancing function in the migration of pivotal cells for tumorigenesis, explaining at least partially its connections with the develop-

ment of cancer. Importantly, the CCR5 expression was already observed in some regulatory T (Treg) cell subsets.⁴⁵⁻⁵⁰ In certain circumstances and types of cancer, Treg cells were linked with a better prognosis.⁵¹ Nevertheless, we are facing a two-edged sword, since Treg cells can also be subverted by tumor cells in order to generate a tolerogenic environment, allowing the proliferation and establishment of neoplasms.⁵²⁻⁵⁵ Thus, we can suppose that the absence of CCR5 in Treg cells may be a protective factor in the context of tumorigenesis.

Inflammation and the development of cancer

The role of the immune system in the development of cancer is a field of extensive debate. Even though inflammatory cells could eliminate tumor cells, inducing their death, they are also important components of the tumor microenvironment, sometimes favoring tumor growth and proliferation, also promoting neoangiogenesis.³⁶⁻³⁸ In this sense, some immune cell-derived factors, when in disbalance, can promote tumor progression. Adding to the complexity of the interactions happening in the tumor, there is a wide variety of immune cells in a neoplastic environment, including lymphocytes, macrophages, neutrophils and dendritic cells, which can produce cytokines and other mediators that enhance the tumor development.⁵⁶ The immune surveillance and the individual responses to cancer therapy are also affected by different inflammatory patterns.⁵⁷

CCR5 Δ 32 and the CD34⁺ stem cell repertoire in the cord blood – a puzzling observation

Recently, a study performed by Enrich et al.⁵⁸ raised intriguing results. A cohort of Spanish cord blood donors was genotyped for the CCR5 Δ 32 polymorphism (rs333), a genetic variant which consists of a 32 base-pair deletion in the open reading frame of the CCR5 gene. This deletion causes a premature stop-codon, which leads to the formation of a truncated protein that is not expressed on the cell surface.^{30,31} Heterozygous and homozygous individuals for CCR5 Δ 32 show respectively reduced CCR5 expression and no expression of the CCR5 molecule on the cell surface.^{59,60} As previously mentioned, CCR5 is an HIV-I co-receptor and this genetic variant became widely known due to its association, when in homozygous, to resistance against HIV infection.^{61,62} The main objective of Enrich et al.⁵⁸ was to identify the CCR5 Δ 32 homozygous cord blood units, which could be used as donor cells to be transplanted to HIV+ individuals. The idea was that the CCR5 Δ 32 homozygous cord blood units would repopulate the host with a set of cells which would not allow HIV infection, avoiding the maintenance of the virus infection, eventually leading to viral clearance. A similar approach using bone marrow CCR5 Δ 32 homozygous cells has been successfully applied in one patient, who remains with sustained suppression of the HIV infection.⁶³⁻⁶⁵ Nevertheless, among the results of Enrich et al.,⁵⁸ one was surprising and unprecedented: a smaller amount of CD34⁺ cells was found in the samples from the CCR5 Δ 32 homozygous donors, as compared to both heterozygous and CCR5 wild-type homozygous. This situation represents a drawback to the main objective of the authors since a) fewer cells would be available from these donors and b)

Table 1 – Roles of CCR5 in tumorigenesis.

Type of tumor/cell line	CCR5 role in tumorigenesis/key findings	References
Reed Sternberg (RS) primary cells and Hodgkin Lymphoma (HL)-derived cell line	Presence of CCL5/CCR5 axis is related to tumor proliferation and microenvironment formation.	Aldinucci et al. ⁴³
Human breast cancer cell line	CCR5 activation by CCL5 leads to cancer proliferation in a mTOR (mammalian Target of Rapamycin) dependent manner.	Murooka et al. ⁴¹
Cervical cancer cells	Greater expression of CCR5 was found in cancer tissues. With downregulation of the CCR5 gene, tumor proliferation and cell invasion were diminished.	Che et al. ⁴⁴
Metastasis of colon rectal cancer in liver	CCR5 was expressed by metastatic tumor cells, lymphocytes, and myeloid cells. The probable interaction between CCR5 and its ligand CCL5 produced by T lymphocytes surrounding the tumor microenvironment promotes cell invasion and metastasis.	Halama et al. ³⁶
Metastasis of mammary carcinoma in lungs	Regulatory cells expressing high levels of CCR5 accumulate in metastatic mammary carcinomas in mice, suggesting an immunosuppressor role of CCR5, which could favor tumor development.	Halvorsen et al. ⁴⁰
Melanoma in mice	CCR5 expression by myeloid-derived suppressor cells leads to migration to primary tumors and metastatic tissues and therefore to tumor progression.	Umansky et al. ⁴²

potentially cord blood units from those CCR5 Δ 32 homozygous donors would present a lower reconstitution potential of the host leukocyte repertoires. In this same study,⁵⁸ Enrich et al. suggested that CCR5 and its agonist MIP-1 α (CCL3) play a critical role in the hematopoietic stem cell function. Specifically, MIP-1 α possibly regulates cytokine-induced stem-cell proliferation and the lack of CCR5 in Δ 32/ Δ 32 individuals might disrupt the MIP-1 α signaling pathway and explain the lower CD34⁺ cell counts.^{20,58,66–68} From this unexpected result, a new point emerged: a connection between CCR5 and CD34⁺ cells.

Linking CD34⁺ cells, the CCR5⁺ repertoire and cancer - the hypothesis

Considering that CD34⁺ cells were already associated with tumor development, and taking into account that the absence of CCR5⁺ cells (which happens in homozygous individuals of the CCR5 Δ 32 variant) is linked with a lower proportion of CD34⁺ stem cells, it is possible to infer that a functional interaction between CCR5⁺ and CD34⁺ cells exists and that this interaction can give support to cell proliferation and expansion and perhaps, to the establishment/development of different types of cancer. Consequently, the reduced expression of CCR5, in association with low CD34⁺ cell counts, would protect against the establishment of a tumor microenvironment and the development of cancer (Fig. 1). Additionally, data from previous studies show that the CCR5 agonist MIP-1 α has a direct effect on CD34⁺ cells,^{32,58,67,68} suggesting a functional connection between CCR5 and CD34. Thereafter, this functional correlation between CCR5 and the CD34⁺ cells will be referred to as the “CCR5-CD34 axis”. Importantly, our hypothesis mainly addresses the role of CCR5 in the migration of inflammatory cells to the tumor environment (CCR5 as a mediator of inflammation). However, as previously mentioned, CCR5 and its ligands play an important role in Treg cell recruitment and migration of tumor cells. These different roles of CCR5 in tumorigenesis needed to be considered in our

hypothesis. Taken together, an association between CCR5 and CD34 may support tumorigenesis.

Consequences of the hypothesis

The unravelling of the mechanisms of tumorigenesis is crucial for the development of new drugs and effective treatments against different types of cancer. Here we hypothesize on the existence of a not yet described interaction between two important molecules of the immune system that may act together as tumorigenesis promoters. Potentially, the CCR5-CD34 axis could be a new target for cancer treatments, pharmacologically, or as part of gene therapy strategies. However, prior to this, the interactions between CCR5 and CD34 need to be characterized at both cellular and functional levels, and their real importance in the tumor biology needs to be understood in detail.

In general, the lack of CCR5 observed in homozygous individuals of the CCR5 Δ 32 variant is considered not to be associated with any severe essential physiological alterations. Although it is generally accepted that homozygous individuals of this variant have no severe immunological or clinical deficiencies,^{30,69} exacerbated inflammatory responses have already been reported in association with the CCR5 Δ 32 variant.⁷⁰ Interestingly, a recent report has linked CCR5 absence with defective bone development.⁷¹ Thus, it is crucial to consider that CCR5 mediates different immune functions and it is possible that its absence promotes changes of difficult detection, but with medical significance in a specific environment or context. For example, homozygous individuals of CCR5 Δ 32 are more susceptible to develop symptomatic West Nile virus infection.^{72,73} Nevertheless, CCR5 Δ 32 is a pleiotropic variant, promoting different outcomes in different situations.⁷⁴ Of note, especially considering the recent alleged report of CCR5 editing in humans, the pros and cons of the absence of CCR5 were addressed in a recent publication by our group.⁷⁵ If our hypothesis is confirmed, the

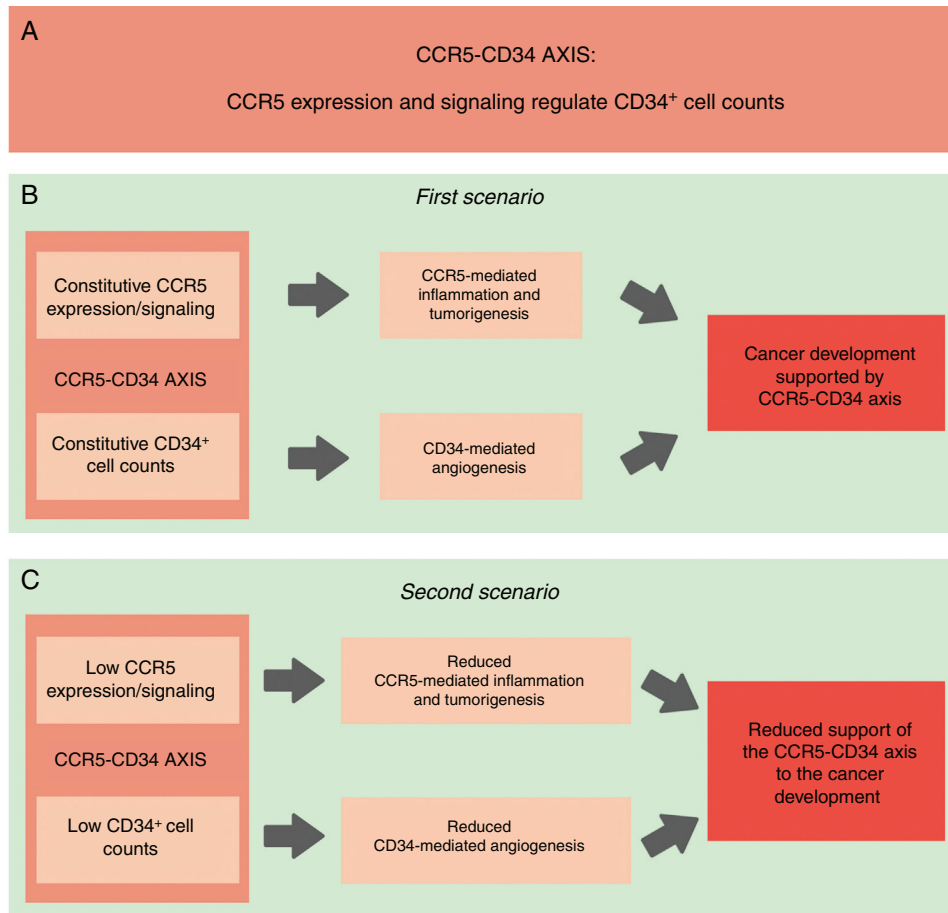


Fig. 1 – Schematic representation of our hypothesis. (A) CCR5-CD34 axis: functional interactions between CCR5 and CD34. (B) CCR5-CD34 axis supports the development of different types of cancer. Constitutive: normal/expected levels of CCR5 and CD34⁺ cells. (C) Reduced CCR5 expression in association with lower CD34⁺ cell counts would protect against the establishment of the tumor microenvironment and the development of cancer.

physiological significance of the absence of CCR5 needs to be reviewed. Although the chemokine-ligand system is robust and redundant,⁷⁶ which ensures its functioning in the absence of some specific chemokine or chemokine receptor, alterations in such a balanced system may have a significant impact on other diseases (in a favorable or unfavorable way). Looking at the hypothesis described here, the lack of CCR5 could be considered a protective factor against the development of cancer.

Testing our hypothesis

We suggest the following initiatives to test our hypothesis:

- First, it is necessary to investigate the CD34⁺ cell counts in individuals with different CCR5 Δ 32 genotypes in different populations with the aim of confirming the correlation between the CCR5 expression and CD34⁺ cell counts.
- Second, functional studies must be performed to evaluate the potential interactions between CCR5 and CD34⁺ cells, helping to understand the biological significance of the CCR5-CD34 axis and identify in which contexts such interactions occur.

- Third, it is necessary to evaluate the influence of the lack of CCR5 and the reduced CD34⁺ cell counts (separately and in association) on the development of cancer at a populational level, as well as in in vitro strategies.
- Fourth, it would be interesting to evaluate tumor growth in CCR5 and CD34 knockout animals and controls, aiming to compare the tumor progression between the groups.
- Finally, we suggest investigating the frequency of CCR5 Δ 32 and the cancer incidence at the populational level (in different geographic regions), in order to verify the correlation between these two data sets.

Conclusion and perspectives

Each cancer type comprises specific cellular and molecular environments. However, migration of inflammatory cells to the tumor site and angiogenesis are processes found in different types of solid tumors. Thus, if the influence of the CCR5-CD34 axis on the development of cancer is confirmed, it is possible that both molecules become targets for the development of new therapeutics against tumors. In addition, pharmacological strategies focusing on modulating both

molecules together may be quite promising. Currently, the use of CCR5 blockers is already being suggested for the treatment of different pathologies, besides HIV infection, including cancer.^{23,24,36–38,77} The above-mentioned scenario shows that our hypothesis deserves to be investigated, once (I) it will contribute to the understanding of the factors that support the establishment of the tumor microenvironment and modify the susceptibility to the development of cancer and (II) it has the potential to reveal important implications for cancer treatment.

Funding

BKL receives a scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil). JHE received a doctoral scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil). Currently, JHE receives a postdoctoral fellowship from CAPES (Brazil). JABC receives a research fellowship from CNPq (Brazil).

Meeting of ethical standards

We declare that this study was developed according to all rules and meeting all ethical standards.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964–7.
- Blume R, Rempel E, Manta L, Saeed BR, Wang W, Raffel S, et al. The molecular signature of AML with increased ALDH activity suggests a stem cell origin. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(9):2201–10.
- Civin CI, Gore SD. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother*. 1993;2(2):137–44.
- Cohen KS, Cheng S, Larson MG, Cupples LA, McCabe EL, Wang YA, et al. Circulating CD34+ progenitor cell frequency is associated with clinical and genetic factors. *Blood*. 2013;121(8):e50–6.
- Cui S, Hano H, Sakata A, Harada T, Liu T, Takai S, et al. Enhanced CD34 expression of sinusoid-like vascular endothelial cells in hepatocellular carcinoma. *Pathol Int*. 1996;46(10):751–6.
- Cummings TJ, Burchette JL, McLendon RE. CD34 and dural fibroblasts: the relationship to solitary fibrous tumor and meningioma. *Acta Neuropathol*. 2001;102(4):349–54.
- Dao MA, Nolte JA. CD34: to select or not to select? That is the question. *Leukemia*. 2000;14(5):773–6.
- Chauhan H, Abraham A, Phillips JR, Pringle JH, Walker RA, Jones JL. There is more than one kind of myofibroblast: analysis of CD34 expression in benign, in situ, and invasive breast lesions. *J Clin Pathol*. 2003;56(4):271–6.
- Breza TS, Magro CM. CD34 expression in primary cutaneous malignant melanoma: apropos of a case and review of the aberrant melanoma phenotype. *J Cutan Pathol*. 2005;32(10):685–9.
- Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*. 2014;32(6):1380–9.
- Lin C-S, Ning H, Lin G, Lue TF. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy*. 2012;14(10):1159–63.
- Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*. 2003;22(42):6549–56.
- Hoff PM, Machado KK. Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer. *Cancer Treat Rev*. 2012;38(7):825–33.
- Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag*. 2006;2(3):213–9.
- Arjomandnejad M, Muhammadnejad A, Haddadi M, Sherkat-Khameneh N, Rismanchi S, Amanpour S, et al. HeLa cell line xenograft tumor as a suitable cervical cancer model: growth kinetic characterization and immunohistochemistry array. *Arch Iran Med*. 2014;17(4):273–7.
- Gao J, Li Z-h, Tang W, Wu Q-n, Liu G-h, Zheng W-b. Chemokine C-C motif ligand 18 expression correlates with tumor malignancy in breast cancer. *Pathologie Biologie*. 2015;63(4):199–203.
- Radu TG, Ciurea ME, Mogoantă SŞ, Busuioc CJ, Grosu F, Ţenovici M, et al. Papillary thyroid cancer stroma - histological and immunohistochemical study. *Rom J Morphol Embryol*. 2016;57 2 Suppl:801–9.
- Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol*. 2006;23(2):70–83.
- Miettinen MM, Antonescu CR, Fletcher CDM, Kim A, Lazar AJ, Quezado MM, et al. Histopathologic evaluation of atypical neurofibromatous tumors and their transformation into malignant peripheral nerve sheath tumor in patients with neurofibromatosis 1—a consensus overview. *Hum Pathol*. 2017;67:1–10.
- Abdi R, Smith RN, Makhlof L, Najafian N, Luster AD, Auchincloss H Jr, et al. The role of CC chemokine receptor 5 (CCR5) in islet allograft rejection. *Diabetes*. 2002;51(8):2489–95.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25(11):2739–49.
- de Oliveira CE, Oda JM, Losi Guembarovski R, de Oliveira KB, Ariza CB, Neto JS, et al. CC chemokine receptor 5: the interface of host immunity and cancer. *Dis Markers*. 2014;2014:126954.
- Velasco-Velázquez M, Xolalpa W, Pestell RG. The potential to target CCL5/CCR5 in breast cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2014;18(11):1265–75.
- Singh SK, Mishra MK, Eltoum IA, Bae S, Lillard JW Jr, Singh R. CCR5/CCL5 axis interaction promotes migratory and invasiveness of pancreatic cancer cells. *Sci Rep*. 2018;8(1):1323.
- Alkhatib G. The biology of CCR5 and CXCR4. *Curr Opin HIV AIDS*. 2009;4(2):96–103.
- Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:659–702.
- Lederman MM, Penn-Nicholson A, Cho M, Mosier D. Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment. *JAMA*. 2006;296(7):815–26.
- Moore JP, Kitchen SG, Pugach P, Zack JA. The CCR5 and CXCR4 coreceptors-central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004;20(1):111–26.

- [29]. Jones KL, Maguire JJ, Davenport AP. Chemokine receptor CCR5: from AIDS to atherosclerosis. *Br J Pharmacol*. 2011;162(7):1453-69.
- [30]. Barmania F, Pepper MS. C-C chemokine receptor type five (CCR5): an emerging target for the control of HIV infection. *Appl Transl Genom*. 2013;2:3-16.
- [31]. Scurci I, Martins E, Hartley O. CCR5: established paradigms and new frontiers for a 'celebrity' chemokine receptor. *Cytokine*. 2018;109:81-93.
- [32]. de Wynter EA, Durig J, Cross MA, Heyworth CM, Testa NG. Differential response of CD34+ cells isolated from cord blood and bone marrow to MIP-1 α and the expression of MIP-1 α receptors on these immature cells. *Stem Cells*. 1998;16(5):349-56.
- [33]. Mañes S, Mira E, Colomer R, Montero S, Real LM, Gómez-Moutón C, et al. CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner. *J Exp Med*. 2003;198(9):1381-9.
- [34]. Vaday GG, Peehl DM, Kadam PA, Lawrence DM. Expression of CCL5 (RANTES) and CCR5 in prostate cancer. *Prostate*. 2006;66(2):124-34.
- [35]. Wang SW, Wu HH, Liu SC, Wang PC, Ou WC, Chou WY, et al. CCL5 and CCR5 interaction promotes cell motility in human osteosarcoma. *PLoS One*. 2012;7(4):e35101.
- [36]. Halama N, Zoernig I, Berthel A, Kahlert C, Klupp F, Suarez-Carmona M, et al. Tumoral immune cell exploitation in colorectal cancer metastases can be targeted effectively by anti-CCR5 therapy in cancer patients. *Cancer Cell*. 2016;29(4):587-601.
- [37]. Gao D, Cazares LH, Fish EN. CCL5-CCR5 interactions modulate metabolic events during tumor onset to promote tumorigenesis. *BMC Cancer*. 2017;17(1):834.
- [38]. Aldinucci D, Casagrande N. Inhibition of the CCL5/CCR5 axis against the progression of gastric cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5):1477.
- [39]. Jiao X, Velasco-Velázquez MA, Wang M, Li Z, Rui H, Peck AR, et al. CCR5 governs DNA damage repair and breast cancer stem cell expansion. *Cancer Res*. 2018;78(7):1657-71.
- [40]. Halvorsen EC, Hamilton MJ, Young A, Wadsworth BJ, LePard NE, Lee HN, et al. Maraviroc decreases CC-mediated migration of CCR5(+) regulatory T cells and reduces metastatic tumor growth in the lungs. *Oncoimmunology*. 2016;5(6):e1150398, <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2016.1150398>. Published 2016 Mar 10.
- [41]. Murooka TT, Rahbar R, Fish EN. CCL5 promotes proliferation of MCF-7 cells through mTOR-dependent mRNA translation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;387(2):381-6.
- [42]. Umansky V, Blattner C, Gebhardt C, Utikal J. CCR5 in recruitment and activation of myeloid-derived suppressor cells in melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66(8):1015-23.
- [43]. Aldinucci D, Lorenzon D, Cattaruzza L, Pinto A, Gloghini A, Carbone A, et al. Expression of CCR5 receptors on Reed-Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. *Int J Cancer*. 2008;122(4):769-76, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.23119>.
- [44]. Che LF, Shao SF, Wang LX. Downregulation of CCR5 inhibits the proliferation and invasion of cervical cancer cells and is regulated by microRNA-107. *Exp Ther Med*. 2016;11(2):503-9.
- [45]. Wysocki CA, Jiang Q, Panoskaltsis-Mortari A, Taylor PA, McKinnon KP, Su L, et al. Critical role for CCR5 in the function of donor CD4+CD25+ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2005;106(9):3300-7.
- [46]. Yurchenko E, Tritt M, Hay V, Shevach EM, Belkaid Y, Piccirillo CA. CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4+ regulatory T cells to sites of *Leishmania major* infection favors pathogen persistence. *J Exp Med*. 2006;203(11):2451-60.
- [47]. Soler DC, Sugiyama H, Young AB, Massari JV, McCormick TS, Cooper KD. Psoriasis patients exhibit impairment of the high potency CCR5+ T regulatory cell subset. *Clin Immunol*. 2013;149(1):111-8.
- [48]. Tan MC, Goedegebuure PS, Belt BA, Flaherty B, Sankpal N, Gillanders WE, et al. Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. *J Immunol*. 2009;182(3):1746-55.
- [49]. Ward ST, Li KK, Hepburn E, Weston CJ, Curbishley SM, Reynolds GM, et al. The effects of CCR5 inhibition on regulatory T-cell recruitment to colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015;112(2):319-28.
- [50]. de Oliveira CE, Gasparoto TH, Pinheiro CR, Amôr NG, Nogueira MR, Kaneno R, et al. CCR5-dependent homing of t regulatory cells to the tumor microenvironment contributes to skin squamous cell carcinoma development. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(12):2871-80.
- [51]. Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC. Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res*. 2010;107:57-117.
- [52]. Golgher D, Jones E, Powrie F, Elliott T, Gallimore A. Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur J Immunol*. 2002;32(11):3267-75.
- [53]. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(4):295-307.
- [54]. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*. 2007;13(3):108-16.
- [55]. Facciabene A, Motz GT, Coukos G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res*. 2012;72(9):2162-71.
- [56]. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.
- [57]. Grivnenikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
- [58]. Enrich E, Vidal F, Sánchez-Gordo F, Gómez-Zumaquero JM, Balas A, Rudilla F, et al. Analysis of the Spanish CCR5- Δ 32 inventory of cord blood units: lower cell counts in homozygous donors. *Bone Marrow Transplant*. 2018;53(6):741-8.
- [59]. Wu L, Paxton WA, Kassam N, Ruffing N, Rottman JB, Sullivan N, et al. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *J Exp Med*. 1997;185(9):1681-91.
- [60]. Venkatesan S, Petrovic A, Van Ryk DI, Locati M, Weissman D, Murphy PM. Reduced cell surface expression of CCR5 in CCR5 Δ 32 heterozygotes is mediated by gene dosage, rather than by receptor sequestration. *J Biol Chem*. 2002;277(3):2287-301.
- [61]. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 1996;86(3):367-77.
- [62]. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 1996;382(6593):722-5.
- [63]. Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müssig A, Allers K, et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2009;360(7):692-8.
- [64]. Allers K, Hütter G, Hofmann J, Lodenkemper C, Rieger K, Thiel E, et al. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 Δ 32/ Δ 32 stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(10):2791-9.

- [65]. Brown TR. Timothy Ray Brown's continuing activism toward curing HIV. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2018;34(1):9-11.
- [66]. Clements JM, Craig S, Gearing AJ, Hunter MG, Heyworth CM, Dexter TM, et al. Biological and structural properties of MIP-1 α expressed in yeast. *Cytokine*. 1992;4(1):76-82.
- [67]. Mayani H, Little MT, Dragowska W, Thornbury G, Lansdorp PM. Differential effects of the hematopoietic inhibitors MIP-1 α , TGF- β , and TNF- α on cytokine-induced proliferation of subpopulations of CD34+ cells purified from cord blood and fetal liver. *Exp Hematol*. 1995;23(5):422-7.
- [68]. Capmany G, Querol S, Cancelas JA, García J. Short-term, serum-free, static culture of cord blood-derived CD34+ cells: effects of FLT3-L and MIP-1 α on in vitro expansion of hematopoietic progenitor cells. *Haematologica*. 1999;84(8):675-82.
- [69]. Nguyễn GT, Carrington M, Beeler JA, Dean M, Aledort LM, Blatt PM, et al. Phenotypic expressions of CCR5- Δ 32/ Δ 32 homozygosity. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1999;22(1):75-82.
- [70]. Vargas AE, Cechim G, Correa JF, Gomes PA, Macedo GS, de Medeiros RM, et al. Pros and cons of a missing chemokine receptor - Comments on "Is the European spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5- Δ 32 allele formed by a breakdown of the pathocenosis due to the historical Roman expansion?" by Eric Faure and Manuela Royer-Carenzi (2008). *Infect Genet Evol*. 2009;9(4):387-9.
- [71]. Xie Y, Zhan S, Ge W, Tang P. The potential risks of C-C chemokine receptor 5-edited babies in bone development. *Bone Res*. 2019;7:4, <http://dx.doi.org/10.1038/s41413-019-0044-0>. Published 2019 Jan 29.
- [72]. Glass WG, McDermott DH, Lim JK, Lekhong S, Yu SF, Frank WA, et al. CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection. *J Exp Med*. 2006;203(1):35-40.
- [73]. Lim JK, McDermott DH, Lisco A, Foster GA, Krysztof D, Follmann D, et al. CCR5 deficiency is a risk factor for early clinical manifestations of West Nile virus infection but not for viral transmission. *J Infect Dis*. 2010;201(2):178-85.
- [74]. Li T, Shen X. Pleiotropy complicates human gene editing: CCR5 Δ 32 and beyond. *Front Genet*. 2019;10.
- [75]. Ellwanger JH, Kaminski VL, Chies JA. CCR5 gene editing - Revisiting pros and cons of CCR5 absence. *Infect Genet Evol*. 2019;68:218-20.
- [76]. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today*. 1999;20(6):254-7.
- [77]. Vangelista L, Vento S. The expanding therapeutic perspective of CCR5 blockade. *Front Immunol*. 2018;8:1981.

CAPÍTULO 3

O presente capítulo apresenta um artigo de dados originais que contempla o quarto, o quinto e o sexto objetivos específicos desta dissertação, a ser submetido no periódico *Human Immunology*:

KULMANN-LEAL, Bruna; ELLWANGER, Joel Henrique; AREND, Ana Cristina; JOBIM, Luiz Fernando Job; JOBIM, Mariana; MICHITA, Rafael Tomoya; CHIES, José Artur Bogo. **Genotyping of the CCR5Δ32 variant in Brazilians from REDOME as an initial support strategy for sustained viral suppression in HIV-infected individuals.** 2021. *Artigo em preparação para submissão.*

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo desta dissertação, diversos aspectos acerca do gene e da molécula CCR5 e da variante CCR5 Δ 32 foram abordados nos **Capítulos 1 e 2**. A **Figura 3** apresenta as frequências do alelo Δ 32 em diversas populações mundiais, com base em dados compilados por Solloch et al. (2017). Para fins de comparação, foi acrescentada na Figura 3 a frequência da variante CCR5 Δ 32 encontrada nos resultados do **Capítulo 3** da presente dissertação. Percebe-se que a frequência encontrada na amostra aqui estudada é mais alta que a frequência geral observada na população brasileira, e isso pode ser explicado pela configuração da população do Rio Grande do Sul. Considerando que a variante CCR5 Δ 32 é de origem Europeia, é coerente ter sido observada uma frequência aumentada em uma amostra da região sul em comparação com a frequência média apresentada por Solloch et al. (2017).

Esta dissertação também explorou os possíveis papéis da variante CCR5 Δ 32 em diferentes infecções ao revisar os trabalhos publicados sobre o tema no Brasil. A partir dos dados analisados, além da já descrita influência deste polimorfismo na infecção pelo HIV-1, foram evidentes possíveis atuações do CCR5 Δ 32 na toxoplasmose e coinfeção por HIV/HBV (**Capítulo 1**).

Além disso, o papel da variante em condições inflamatórias também foi explorado, ressaltando sua importância na susceptibilidade e desfecho clínico da esclerose múltipla e risco de desenvolvimento de periodontite, pré-eclâmpsia e artrite reumatoide. Ademais, a influência do alelo Δ 32 na artrite juvenil idiopática foi revisada, ficando evidente a influência da variante sobre a progressão e desfecho clínico piorados em portadores do alelo. Outros contextos também abordados se mostraram complexos e com resultados conflitantes (**Capítulo 1**).

Este trabalho também explorou o possível papel do CCR5 no desenvolvimento de câncer. Revisando trabalhos brasileiros, verificou-se que a variante CCR5 Δ 32 atua de maneira diversa dependendo do tipo de câncer investigado. Na população brasileira, não foi possível constatar um papel homogêneo do alelo no desenvolvimento tumoral (**Capítulo 1**). No entanto, ao revisar uma bibliografia internacional, sugerimos esse

importante receptor como um promotor tumoral e instigamos a investigação do eixo CCR5-CD34 para melhor entendimento da interação funcional entre as moléculas e a possível elaboração de terapias tendo tais alvos (**Capítulo 2**).

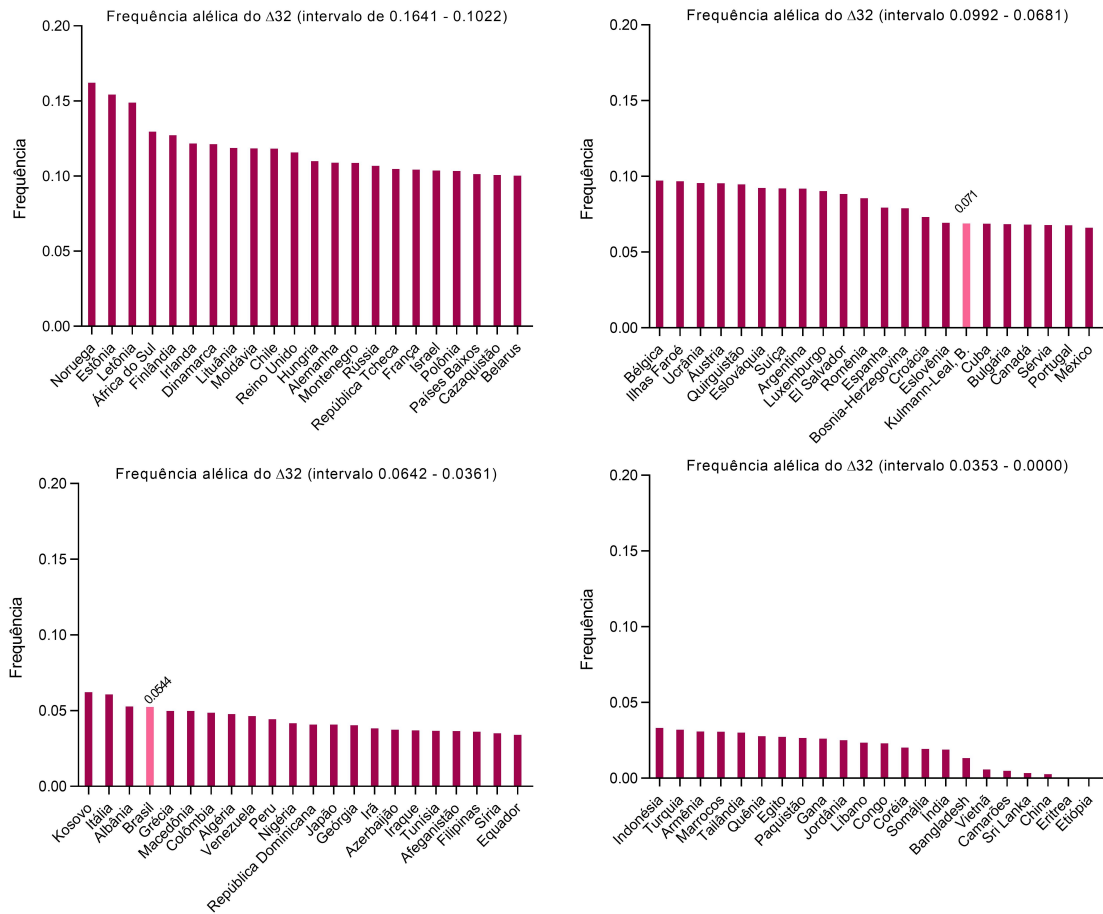


Figura 3. Frequências do alelo CCR5 Δ 32 ao redor do mundo. Figura da autora desta dissertação, com base em dados descritos por Solloch et al. (2017). Destacadas em rosa, a frequência de 0,071 no sul do Brasil (descrita por este trabalho no **Capítulo 3**) e a frequência média de 0,0544 do alelo na população brasileira em geral (com base em Solloch et al. 2017).

Por fim, esta dissertação avaliou a disponibilidade de doadores de medula óssea devidamente registrados no REDOME que possuem o genótipo Δ 32/ Δ 32, obtendo uma frequência de 0.76%. Com base nesta frequência, nosso trabalho estimou que pelo menos cerca de 17.500 indivíduos brasileiros estejam aptos a serem doadores para uma possível estratégia de obtenção de remissão sustentada da infecção pelo HIV. Por fim, não foi

encontrada uma associação robusta entre alelos específicos de HLA e a variante $\Delta 32$ (valores de p perderam a significância após correção por múltiplas comparações). Porém, é possível sugerir que o locus *HLA-B* e seus diferentes alelos possam apresentar uma associação com o CCR5 $\Delta 32$ em avaliações envolvendo um maior número amostral (**Capítulo 3**).

A presente dissertação perpassou por diversos contextos envolvendo o CCR5 e introduziu novos dados a respeito da disponibilidade de doadores voluntários passíveis de participar de transplante de medula óssea para indivíduos HIV+. Como perspectivas, pretende-se (i) ampliar o número de indivíduos do REDOME genotipados para o alelo $\Delta 32$, (ii) realizar análises adicionais acerca do locus *HLA-B* e CCR5 $\Delta 32$, e (iii) continuar revisando aspectos interessantes a respeito deste receptor de grande importância para o sistema imune e diferentes contextos clínicos.

REFERÊNCIAS

- Aldinucci D, Lorenzon D, Cattaruzza L, Pinto A, Gloghini A, Carbone A and Colombatti A (2008) Expression of CCR5 receptors on Reed–Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: Involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. *International Journal of Cancer* 122:769–776. doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.23119>
- Alkhatib G (2009) The biology of CCR5 and CXCR4. *Current Opinion in HIV and AIDS* 4:96–103. doi: [10.1097/COH.0b013e328324bbec](https://doi.org/10.1097/COH.0b013e328324bbec)
- Balkwill FR (2012) The chemokine system and cancer. *The Journal of Pathology* 226:148–157. doi: <https://doi.org/10.1002/path.3029>
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL and Wiley DC (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506–512. doi: [10.1038/329506a0](https://doi.org/10.1038/329506a0)
- Boldt ABW, Culpi L, Tsuneto LT, Souza IR, Kun JFJ and Petzl-Erler ML (2009) Analysis of the CCR5 gene coding region diversity in five South American populations reveals two new non-synonymous alleles in Amerindians and high CCR5*D32 frequency in Euro-Brazilians. *Genetics and Molecular Biology* 32:12–19. doi: [10.1590/S1415-47572009005000011](https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000011)
- Brown TR (2015) I Am the Berlin Patient: A Personal Reflection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 31:2–3. doi: [10.1089/aid.2014.0224](https://doi.org/10.1089/aid.2014.0224)
- Che L, Shao S and Wang L (2015) Downregulation of CCR5 inhibits the proliferation and invasion of cervical cancer cells and is regulated by microRNA-107. *Exp Ther Med* 11:503–509. doi: [10.3892/etm.2015.2911](https://doi.org/10.3892/etm.2015.2911)
- Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E et al. (1996) Genetic Restriction of HIV-1 Infection and Progression to AIDS by a Deletion Allele of the CCR5 Structural Gene. *Science* 273:1856–1862. doi: [10.1126/science.273.5283.1856](https://doi.org/10.1126/science.273.5283.1856)
- Ellwanger JH, Kaminski VL and Chies JAB (2019) CCR5 gene editing - Revisiting pros and cons of CCR5 absence. *Infection, Genetics and Evolution*. 68:218-220. doi: [10.1016/j.meegid.2018.12.027](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.12.027)
- Ellwanger JH, Kaminski VL and Chies JA (2020a) What we say and what we mean when we say redundancy and robustness of the chemokine system – how CCR5 challenges these concepts. *Immunology & Cell Biology* 98:22–27. doi: <https://doi.org/10.1111/imcb.12291>
- Ellwanger JH, Kulmann-Leal B, Kaminski VL, Rodrigues AG, Bragatte MAS, Chies JAB (2020b). Beyond HIV infection: Neglected and varied impacts of CCR5 and CCR5Δ32 on viral diseases. *Virus Research*. 286:198040. doi: [10.1016/j.virusres.2020.198040](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198040)
- Enrich E, Vidal F, Sánchez-Gordo F, Gómez-Zumaquero JM, Balas A, Rudilla F, Barea L, Castro A, Larrea L, Perez-Vaquero MA et al. (2018) Analysis of the Spanish CCR5 -Δ32

inventory of cord blood units: lower cell counts in homozygous donors. *Bone Marrow Transplantation* 53:741–748. doi: 10.1038/s41409-018-0114-8

Farias JD de, Santos MG, França AK de, Delani D, Tada MS, Casseb AA, Simões AL and Engracia V (2012) Distribution of the CCR5 Δ 32 allele (gene variant CCR5) in Rondônia, Western Amazonian region, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 35:27–31. doi: 10.1590/S1415-47572012005000003

Fernandes APM, Maciel LMZ, Foss MC and Donadi EA (2003) Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes endócrinas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 47:601–611. doi: 10.1590/S0004-27302003000500015

Gupta RK, Abdul-Jawad S, McCoy LE, Mok HP, Peppas D, Salgado M, Martinez-Picado J, Nijhuis M, Wensing AMJ, Lee H et al. (2019) HIV-1 remission following CCR5 Δ 32/ Δ 32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature* 568:244–248. doi: 10.1038/s41586-019-1027-4

Gupta RK, Peppas D, Hill AL, Gálvez C, Salgado M, Pace M, McCoy LE, Griffith SA, Thornhill J, Alrubayyi A et al. (2020) Evidence for HIV-1 cure after CCR5 Δ 32/ Δ 32 allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation 30 months post analytical treatment interruption: a case report. *The Lancet HIV* 7:e340–e347. doi: 10.1016/S2352-3018(20)30069-2

Halama N, Zoernig I, Berthel A, Kahlert C, Klupp F, Suarez-Carmona M, Suetterlin T, Brand K, Krauss J, Lasitschka F et al. (2016) Tumoral Immune Cell Exploitation in Colorectal Cancer Metastases Can Be Targeted Effectively by Anti-CCR5 Therapy in Cancer Patients. *Cancer Cell* 29:587–601. doi: 10.1016/j.ccell.2016.03.005

Hope TJ, Klatt NR, Sacha JB and Cannon PM (2020) Timothy Ray Brown: The Serendipitous Hero of HIV Cure Research. *AIDS Research and Human Retroviruses* 36:883–885. doi: 10.1089/aid.2020.0253

Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, Kang S, Ceradini D, Jin Z, Yazdanbakhsh K et al. (1996) The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature Medicine* 2:1240–1243. doi: 10.1038/nm1196-1240

Hutchinson JF (2001) The Biology and Evolution of HIV. *Annual Review of Anthropology* 30:85–108. doi: 10.1146/annurev.anthro.30.1.85

Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müßig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kücherer C, Blau O et al. (2009) Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. <http://dx.doi.org/101056/NEJMoa0802905>. doi: 10.1056/NEJMoa0802905

Hütter G and Thiel E (2011) Allogeneic transplantation of CCR5-deficient progenitor cells in a patient with HIV infection: an update after 3 years and the search for patient no. 2. *AIDS* 25:273–274. doi: 10.1097/QAD.0b013e328340fe28

Kulmann-Leal B, Ellwanger JH and Chies JAB (2020) A functional interaction between the CCR5 and CD34 molecules expressed in hematopoietic cells can support (or even

promote) the development of cancer. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy* 42:70–76. doi: 10.1016/j.htct.2019.10.001

Libert F, Cochaux P, Beckman G, Samson M, Aksenova M, Cao A, Czeizel A, Claustres M, de la Rúa C, Ferrari M et al. (1998) The Δ ccr5 Mutation Conferring Protection Against HIV-1 in Caucasian Populations Has a Single and Recent Origin in Northeastern Europe. *Human Molecular Genetics* 7:399–406. doi: 10.1093/hmg/7.3.399

Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA and Landau NR (1996) Homozygous Defect in HIV-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiply-Exposed Individuals to HIV-1 Infection. *Cell* 86:367–377. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80110-5

Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, Juji T, Akaza T, Yamamoto K, Ishikawa Y, Kato S, Sao H, Sakamaki H et al. (2002) The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. *Blood* 99:4200–4206. doi: 10.1182/blood.V99.11.4200

Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber C-M, Saragosti S, Lapoumériou C, Cognaux J, Forceille C et al. (1996) Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382:722–725. doi: 10.1038/382722a0

Silva-Carvalho WHV, de Moura RR, Coelho AVC, Crovella S and Guimarães RL (2016) Frequency of the CCR5- Δ 32 allele in Brazilian populations: A systematic literature review and meta-analysis. *Infection, Genetics and Evolution* 43:101–107. doi: 10.1016/j.meegid.2016.05.024

Sokol CL and Luster AD (2015) The Chemokine System in Innate Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a016303. doi: 10.1101/cshperspect.a016303

Solloch UV, Lang K, Lange V, Böhme I, Schmidt AH and Sauter J (2017) Frequencies of gene variant CCR5- Δ 32 in 87 countries based on next-generation sequencing of 1.3 million individuals sampled from 3 national DKMS donor centers. *Human Immunology* 78:710–717. doi: 10.1016/j.humimm.2017.10.001

Thomas ED (1999) Bone marrow transplantation: a review. *Semin Hematol* 36:95–103.

Zlotnik A and Yoshie O (2012) The Chemokine Superfamily Revisited. *Immunity* 36:705–716. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.008

ANEXO - APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA

O trabalho apresentado no **Capítulo 3** desta dissertação teve aprovação no Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob o número: CAAE 20460719.6.0000.5327.