

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS APLICADAS À  
FARMÁCIA

CHRISTIANE MARIA AYO

Associação dos genes KIR e seus ligantes HLA com o desenvolvimento da  
cardiopatia chagásica crônica em uma população da região Norte/Noroeste do  
Paraná

Maringá

2012

CHRISTIANE MARIA AYO

Associação dos genes KIR e seus ligantes HLA com o desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica em uma população da região Norte/Noroeste do Paraná

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria Sell

Co-orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Machado de Oliveira Dalalio

Maringá

2012

# FOLHA DE APROVAÇÃO

CHRISTIANE MARIA AYO

Associação dos genes KIR e seus ligantes HLA com o desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica em uma população da região Norte/Noroeste do Paraná

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia pela comissão julgadora composta pelos membros:

## COMISSÃO JULGADORA

Profª Drª Ana Maria Sell  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Ricardo Alberto Moliterno  
Universidade Estadual de Maringá

Profª Drª Silvana Marques de Araújo  
Universidade Estadual de Maringá

Profª Drª Cinara de Cássia Brandão de Mattos  
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Profª Drª Elza Araújo Torres  
Universidade Estadual Paulista

Aprovada em: 23 de dezembro de 2012

Local de defesa: Bloco 126 , *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

## DEDICATÓRIA(S)

Dedico este trabalho a todos os pacientes Chagásicos pelo altruísmo, simplicidade e espírito de cooperação que tornaram possível a execução desta pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pela vida, inspiração, e, por ter me dado forças para conseguir superar os momentos difíceis, que foram muitos, no decorrer desses anos de mestrado.

Aos meus pais Osvanir e Cidinha por proporcionarem minha formação intelectual e moral; pelos esforços irrestritos para que até aqui, eu chegasse. Agradeço por tanto amor e por depositarem em mim a confiança de que sou capaz.

À minha irmã Jac, pelo apoio e amizade. Por todas as vezes que me confortou (até mesmo pelo telefone) nos momentos complicados nesses anos que estou longe de casa.

Ao meu namorado Renan, companheiro para todas as horas, que muitas vezes escutou conceitos sobre este trabalho, sem mesmo entender ao certo o que eu estava falando, pela ajuda imprescindível com a elaboração de fórmulas no Excel, por ser paciente nesse período estressante e aguentar conviver comigo. Se não fosse a mão dele para me amparar tudo seria muito mais difícil.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Maria Sell, não só pela orientação, mas pela oportunidade, pela confiança e pelos ensinamentos. À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Marcia Machado de Oliveira Dalalio, pela co-orientação e ajuda nas buscas aos pacientes. Aos demais professores do programa por todo conhecimento compartilhado.

Aos técnicos do Laboratório de Imunogenética da UEM pelo auxílio durante os trabalhos no laboratório.

Às minhas “companheiras” de mestrado: Flavia Zaghi que fez minhas noites e meus finais de semanas de laboratório serem menos solitários por ser presença constante nessas horas e estar sempre pronta à ajudar; Emília Sippert pela parceria nos trabalhos, coletas e estudos, sem falar das “caminhadas reflexivas” sobre nossos projetos; Luciana Jarduli por compartilhar conhecimentos sobre o afamado KIR; e finalmente minha “sócia de projeto” Pâmela Reis que me ensinou muito nesses dois anos de convivência e lutou incansavelmente junto comigo para que fosse possível a execução e conclusão deste trabalho. Pâm, muito obrigada pela dedicação, e pela parceria! Acima de tudo meninas, agradeço pela amizade!

Muitas são as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram de forma essencial para a realização deste trabalho, por isto, a todos a quem não me referi, o meu muito obrigada.

## EPÍGRAFE

“Não quero para mim a terrível limitação de viver apenas o que é passível de fazer sentido. Eu não. Quero uma verdade inventada.”

(Clarice Lispector)

## Associação dos genes KIR e seus ligantes HLA com o desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica em uma população da região Norte/Noroeste do Paraná

### RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, ocorre em toda a América Latina e afeta milhões de pessoas. A doença é classificada em fases aguda e crônica, mas as manifestações clínicas variam de uma área endêmica para outra e esta variação pode ser atribuída a fatores genéticos. Genes KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptor*) codificam moléculas de ativação e inibição das funções das células NK (*natural killer*) e têm como ligantes moléculas HLA (antígeno leucocitário humano) de classe I. As moléculas KIR e HLA são altamente polimórficas e as combinações específicas KIR-HLA podem regular a imunidade mediada por células NK contra patógenos infecciosos. Participaram desta pesquisa 124 pacientes sorologicamente diagnosticados com doença de Chagas (57 homens e 67 mulheres, com idade média de 60,2 anos  $\pm$ 9,9), atendidos pelo Hospital Universitário de Londrina e pelo Laboratório de Doença de Chagas da Universidade Estadual de Maringá, e 163 indivíduos saudáveis, cônjuge dos pacientes ou doadores de sangue do Hemocentro Regional de Maringá (94 homens e 69 mulheres, com idade média 49,3 anos  $\pm$ 6,1). O objetivo deste trabalho foi avaliar a associação KIR-HLA com a cardiopatia chagásica crônica. A genotipagem dos genes KIR e dos grupos alélicos HLA, foi realizada utilizando a técnica de PCR-SSOP reversa. As frequências gênicas observadas foram determinadas por contagem direta e a análise estatística foi realizada pelo teste exato de Fisher ou qui-quadrados com correção de Yates. Os pares KIR2DL2-C1/C2 (16,1% vs 29,4%  $P=0,012$ ; OR=0,46; IC=0,24–0,85) e KIR3DL2-A3/11 (20,6% vs 31,9%;  $P=0,035$ ; OR=0,53; IC=0,29–0,96) foram menos frequentes em pacientes. KIR ativador e seus ligantes, como a combinação KIR2DS2+/2DL2-/C1+ foi mais frequente em pacientes chagásicos (11,3% vs 4,3%;  $P=0,042$ ; OR=2,83; IC=1,02–1,55) e aqueles com comprometimento cardíaco (17,1% vs 4,3%;  $P=0,001$ ; OR=4,58; IC=1,26–16,3), quando comparado aos controles. A combinação KIR2DS2+/2DL2-/KIR2DL3+/C1+ também foi positivamente associada à doença de Chagas (10,5% vs 6,7%;  $P=0,039$ ; OR=3,06; IC=1,13–8,30) e à cardiopatia chagásica crônica (14,6% vs 3,7%;  $P=0,021$ ; OR=4,48; IC=1,36–14,73). Assim, as células NK parecem contribuir para as lesões teciduais na cardiopatia chagásica crônica.

**Palavras-chave:** Receptores KIR. Antígenos HLA. Doença de Chagas. Associação genética.

## Association of KIR genes and their HLA ligands with the development of chronic Chagas disease in a population in the North/Northwest of Paraná

### **ABSTRACT**

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, occurs throughout Latin America and affects millions of people. The disease is classified in its acute and chronic phase but the clinical manifestations vary from one endemic area to another and this variation can be attributed to genetic factors. KIR genes (killer cell immunoglobulin-like receptor) encode the molecules that activate and inhibit the function of molecules of NK cells (natural killer) and have as ligands HLA (human leukocyte antigen) class I. Both KIR and HLA molecules are highly polymorphic and the specific KIR-HLA allelic combinations may regulate NK cell-mediated immunity against infectious pathogens. The purpose of this study was to investigate the influence of KIR genes and their HLA ligands in the development of chronic Chagas heart disease. The participants in this research include 124 patients serologically diagnosed with Chagas disease (57 men and 67 women, with a mean age of 60,2 years  $\pm$ 9,9) who were seen at the University Hospital of Londrina and the Chagas Disease Lab of the State University of Maringá. We also had 163 healthy individuals, spouses of patients or blood donors of the Regional Blood Center of Maringa (94 men and 69 women, with a mean age of 49,3 years  $\pm$ 6,1). Genotyping of KIR genes and allelic groups of HLA was performed using the PCR-SSOP. The observed gene frequencies were determined by direct counting and statistical analysis was performed using the Fisher exact test and Chi Squares with Yates correction. The pair KIR2DL2-C1/C2 (16.1% vs 29.4%  $P=0.012$ ,  $OR=0.46$ ,  $CI=0.24-0.85$ ) and KIR3DL2-A3/11 (20.6% vs 31.9%,  $P=0.035$ ,  $OR=0.53$ ,  $CI=0.29-0.96$ ) were less frequent in patients. KIR activator and its ligands, such as the combination KIR2DS2+/2DL2-/C1+ was more frequent in patients (11.3% vs 4.3%,  $P=0.042$ ,  $OR=2.83$ ,  $CI=1.02-1.55$ ) and in patients with cardiac involvement (17.1% vs 4.3%,  $P=0.001$ ,  $OR=4.58$ ,  $CI=1.26-16.3$ ) compared to controls. The combination KIR2DS2+/2DL2-/KIR2DL3+/C1+ was also positively associated with Chagas disease (10.5% vs 6.7%,  $P=0.039$ ,  $OR=3.06$ ,  $CI=1.13-8.30$ ) and chronic chagasic cardiopathy (14.6% vs 3.7%,  $P=0.021$ ,  $OR=4.48$ ,  $CI=1.36-14.73$ ). Thus, NK cells contribute to tissue lesion in chronic chagasic cardiopathy.

**Keywords:** KIR Receptors. HLA Antigens. Chagas Disease. Genetic association.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Sinal de romanã .....	13
Figura 2. Rota de migração da América Latina e Central e estimativa do número total de indivíduos infectados em países não endêmicos .....	15
Figura 3. Controle do <i>T. infestans</i> no Brasil.....	17
Figura 4. Distribuição geográfica da doença de Chagas .....	18
Figura 5. Estados brasileiros com relato de surtos da doença de Chagas aguda por meio da transmissão limentar. ....	20
Figura 6. Estágios evolutivos de <i>T. cruzi</i> .....	22
Figura 7. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .....	22
Figura 8. Caracterização das fases aguda e crônica da doença de Chagas .....	24
Figura 9. Estrutura Molecular dos receptores KIR.....	30
Figura 10. Complexo de Receptores Leucocitários e os genes <i>KIR</i> . ....	31

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas: Human Immunology  
Disponível em: <http://www.elsevier.com/journals/human-immunology/0198-8859/guide-for-authors>

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>12</b>
<b>DOENÇA DE CHAGAS.....</b>	<b>12</b>
Aspectos gerais .....	12
Origem e descoberta da doença .....	12
Epidemiologia.....	14
Formas de transmissão .....	16
Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .....	21
Manifestações clínicas e diagnóstico.....	23
Tratamento.....	24
Resposta imunológica na doença de Chagas .....	25
<b>FATORES GENÉTICOS E SUA INFLUÊNCIA NA DOENÇA DE CHAGAS.....</b>	<b>28</b>
<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>34</b>
<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>34</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>44</b>
Artigo .....	45
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>66</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>67</b>

# CAPÍTULO I

## DOENÇA DE CHAGAS

### Aspectos gerais

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas é uma antropozoonose de larga distribuição no continente americano, especialmente na América Latina, e foi descrita pela primeira vez em 1909 por Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, médico e cientista brasileiro [1]. A doença é endêmica, tem como agente etiológico o protozoário uniflagelado *Trypanosoma cruzi* e é transmitida ao homem, principalmente, através de um inseto vetor hematófago pertencente à subfamília Triatominae, conhecido no Brasil como bicho barbeiro [2]. A doença é caracterizada por fases aguda e crônica, porém seu curso de evolução pode ser influenciado tanto pela variabilidade genética e biológica do parasito quanto do hospedeiro, gerando manifestações clínicas distintas na qual o indivíduo pode desenvolver as formas indeterminada, cardíaca e/ou digestiva [3,4]. Devido aos índices de prevalência, incidência e taxa de mortalidade, a doença é considerada como um dos principais problemas de saúde pública em vários países da América do Sul e Central [5].

### Origem e descoberta da doença de Chagas

A presença do *T. cruzi* na natureza é bastante antiga, somando cerca de 100 milhões de anos. A história da evolução dos tripanossomos surge, primitivamente, em invertebrados aquáticos, circulando posteriormente pelo tubo digestivo de vertebrados como peixes, anfíbios e répteis. Mais tarde, insetos predadores desenvolveram a hematofagia possibilitando a transmissão do parasito a distintos hospedeiros que lhes serviam como fonte de alimento. O grupo *cruzi* inicialmente adaptou-se a hemípteros hematófagos e mamíferos marsupiais de médio e pequeno porte configurando o ciclo enzoótico silvestre no Continente Americano. Posteriormente o ciclo expandiu-se para outros mamíferos devido ao comportamento eclético dos triatomíneos [6,7].

O ciclo silvestre historicamente significou a origem do que se veio a chamar doença de Chagas, porém o ciclo doméstico só veio a se estabelecer muito mais tarde. A expansão da doença se deve ao assentamento e concentração de populações humanas, em épocas pré-colombianas [8], contudo a história natural da doença de Chagas endêmica constituiu-se como

uma zoonose, conforme o homem foi se aproximando dos nichos naturais dos vetores invertebrados há 200-300 anos, como resultado do desmatamento provocado pela expansão da agricultura e agropecuária [9]. Porém existem indícios de que a infecção humana pelo *T. cruzi* ocorre há pelo menos nove mil anos AC em populações de países andinos: em múmias recuperadas, referentes a essa época e região, foi possível identificar resquícios moleculares do *T. cruzi*. [10]. As cerâmicas peruanas datadas dos séculos XIII a XVI revelam possíveis representações da doença de Chagas, incluindo uma cabeça com edema ocular unilateral, idêntico ao sinal de Romana que muitas vezes caracteriza o quadro de infecção aguda [11] (Figura 1).



Figura 1: Sinal de Romana. A. Foto de uma cerâmica Inca pré-colombiana, com um edema ocular unilateral idêntico ao sinal de Romana, depositada no museu de Lima. Extraído de Prata; Dias; Coura [12]. B. Criança apresentando o sinal de Romana. Extraído de Rey [13].

Levando em conta a distribuição das principais espécies de vetores transmissores da doença de Chagas implicadas no ciclo doméstico, é bastante provável que o *T. infestans* tenha sido o responsável fundamental pela tripanossomíase no Cone Sul. Sua vinda para o Brasil ocorreu em épocas coloniais e do Império Brasileiro, alcançando São Paulo e Minas Gerais somente com a explosão do mercado do café. Os colonizadores portugueses que chegaram ao Brasil durante os séculos XVI e XVII reportaram enfermidades regionais localmente apelidadas como *mal do bicho*, *mal de engasgo* e *caseira*, possivelmente referindo-se a problemas esofágicos e intestinais causados pelo *T. cruzi* [10,14,15].

Charles Darwin observou o comportamento do inseto transmissor triatomíneo durante sua passagem pela Argentina e escreveu em seu diário “The Voyage of the Beagle” ter sido picado pelo mesmo ao visitar o Chile em 1835. A presença de sintomas gástricos e sua morte final por problemas cardíacos em 1882 sugerem ser devidos à doença de Chagas [16].

Mas a doença foi descrita pela primeira vez em fins de 1907, quando Carlos Chagas viajou para Lassance, interior de Minas Gerais. No povoado, observando a infinidade de insetos hematófagos alojados nas paredes de pau-a-pique das moradias, decidiu examiná-los. Encontrou neles um novo parasito, que chamou de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz, seu amigo e mentor. Verificou que o parasito era patogênico para animais de laboratório e descobriu sua presença em animais domésticos. Chagas descreveu o tripanossomo, o inseto transmissor aos homens e a síndrome que caracterizava uma nova doença parasitária tropical, que, desde então passou a ser reiteradamente destacada [17].

## **Epidemiologia**

A doença de Chagas caracterizava-se como uma doença negligenciada de populações pobres e rurais; porém a progressiva urbanização da população rural, principalmente desde o ano de 1940, fez da doença um problema urbano de importância médica e social. Sua propagação da América Latina para países não endêmicos é um novo desafio para todo o mundo, pois este introduziu novos riscos, tais como a possibilidade de transmissão de *T. cruzi* através da transfusão sanguínea. O parasito causador da doença de Chagas pode viajar com os movimentos das populações de países endêmicos para não-endêmicos como a América do Norte, regiões do Pacífico Ocidental (principalmente Japão e Austrália) e Europa. Estima-se que há na atualidade mais de 300.000 indivíduos infectados com o *T. cruzi* nos Estados Unidos, mais de 5.500 no Canadá, mais de 80.000 na Europa e na região do Pacífico ocidental, mais de 3.000 no Japão e mais de 1.500 na Austrália [18,19] (Figura 2).

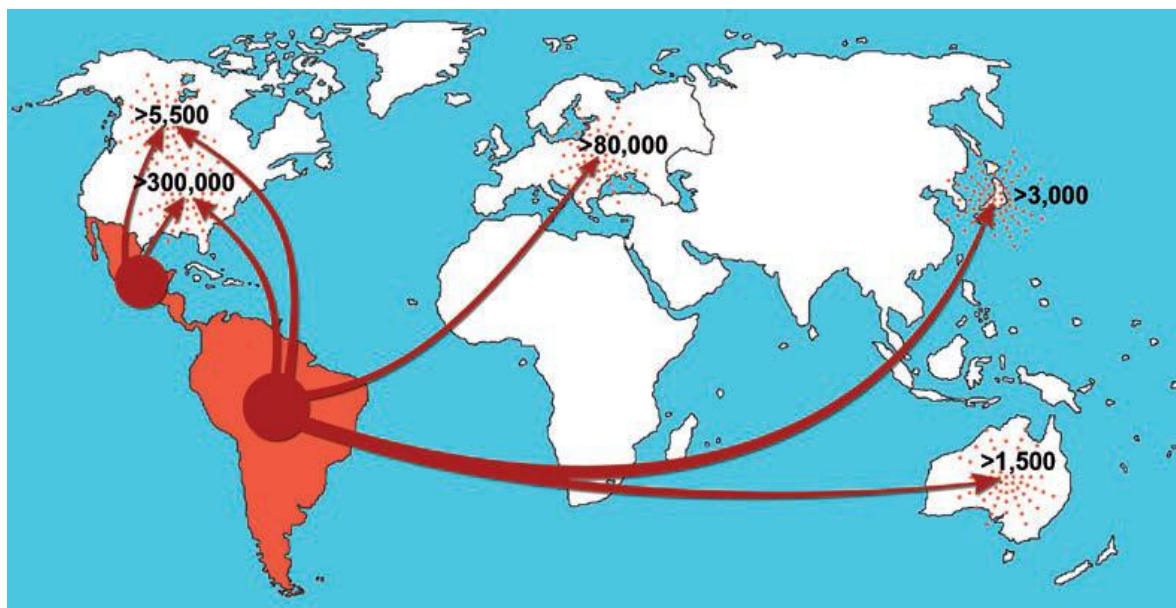


Figura 2: Rota de migração da América Latina e Central e estimativa do número total de indivíduos infectados em países não endêmicos. Extraído de Coura; Vinãs [20].

Na década de 90, a doença de Chagas foi considerada pelo Banco Mundial como a doença parasitária mais séria na América Latina. Neste período o número de indivíduos infectados era de 16-18 milhões [21] e levava a uma perda anual de 2,7 milhões de pessoas por incapacidade a cada ano, sendo o parasito de maior carga da doença em nosso continente e o terceiro em uma escala global, depois da malária e esquistossomose [22].

A prevalência, a incidência e a taxa de mortalidade associadas à doença de Chagas apresentaram consideráveis variações nas últimas décadas devido, principalmente, ao impacto de programas de controle, migrações de populações rurais e urbanas, além de mudanças sócio-econômicas [23]. Mas, ainda que as estimativas de prevalência da infecção estejam progressivamente diminuindo, a doença não deixou de existir; enquanto persistirem o agente causal, os transmissores vetoriais alternativos e os reservatórios animais domésticos e silvestres, em associação com as condições sócio-epidemiológicas capazes de permitir a infecção humana, ela sempre estará latente. Embora o governo brasileiro tenha reduzido a quase zero os novos casos da doença de Chagas por meio da transmissão vetorial [24], no período de 2000 a 2010 foram registrados 1.036 casos e surtos de doença de Chagas aguda. Os anos de 2007 e 2009 apresentaram os maiores números de casos e a forma oral de transmissão foi a predominante em todo o período [25].

No Brasil, estima-se que existam 2.500.000 indivíduos infectados pelo *T. cruzi* [26]. No mundo todo, mais de 10 milhões de pessoas estão infectadas [27], e cerca de 100 milhões de pessoas estão sob o risco da doença no Continente Americano, com uma incidência total estimada de 800.000 novos casos por ano [23]. No ano de 2008 a doença de Chagas matou mais de 10.000 pessoas [27]. Um dos principais problemas relacionados a doença é cardiopatia chagásica, que ocorre com maior frequência em pessoas com idades entre 20-59 anos, época mais produtiva de suas vidas, e, em áreas endêmicas, representa a principal causa de incapacidade e mortalidade.

Além dos fatores médicos, sociais e econômicos, a propagação da doença de Chagas representa um problema político. Muitos países desenvolvidos dependem de imigrantes para fazer parte da força de trabalho, mas ainda não estão preparados para os desafios que a doença traz. Existe a necessidade de instituir uma infraestrutura adequada: organizar ambulatórios para cuidar desses pacientes, formar pessoal habilitado para diagnosticar e tratar a doença de Chagas, preparar os bancos de sangue onde circulam milhares de doadores e realizarem triagens de doadores e receptores de transplantes de órgãos. Essas são algumas das medidas cabíveis necessárias para a prevenção da doença em países livres dos vetores naturais, pois a doença de Chagas tornou-se mais do que simplesmente uma doença zoonótica que afeta principalmente os pobres e rurais na América Latina: é uma preocupação mundial que pode ter consequências graves para a saúde humana em longo prazo, e se não for levada a sério, poderá se tornar uma grande ameaça à saúde global [9,28].

### **Formas de transmissão**

Os mecanismos de transmissão da infecção de Chagas podem ser divididos em mecanismos principais e mecanismos secundários: os mecanismos principais incluem a transmissão por meio de vetores (triatomíneos), por transfusão sanguínea, alimentos contaminados e transmissão congênita; enquanto que a transmissão pelos mecanismos secundários pode ocorrer por meios de acidentes de laboratório, transplantes de órgãos, transmissão sexual, feridas em contato com o esperma ou fluido menstrual contaminado e, hipoteticamente, a inoculação deliberada criminal ou contaminação de alimentos com o parasita [9].

No mecanismo vetorial, o *T. cruzi* é transmitido para o homem e outros mamíferos através do contato com as excretas contaminadas dos triatomíneos, sendo esse o principal mecanismo de importância epidemiológica. Focos de infestação doméstica significativa ainda



podem ser encontrados, especialmente em áreas da Bolívia, que tem a maior taxa de prevalência da infecção humana, e em outros países latino-americanos que não têm a transmissão vetorial controlada [29,30]. Os vetores da doença de Chagas são insetos hematófagos da ordem *Hemiptera*, família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae* [31]. Entre as mais de 130 espécies encontradas como potenciais vetores do *T. cruzi*, no Brasil foram descritas 52 espécies das quais cinco têm importância para infecção humana por sua capacidade de invasão e procriação dentro das casas: *T. infestans*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida*. As outras espécies são selvagens e mantêm um ciclo natural apenas com mamíferos silvestres. *T. infestans*, que é a única espécie estritamente caseira, foi eliminada no Brasil (Figura 3), Chile e Uruguai, e sua erradicação ou controle em outros países da América do Sul está em andamento [14,32]. Mais de 100 reservatórios silvestres de *T. cruzi* têm sido descritos entre os marsupiais, xenartros, morcegos carnívoros, logomorfos, roedores e primatas não humanos. Entre os reservatórios domésticos é importante destacar: cães, gatos, ratos e cobaias. Outros animais, como porcos, caprinos e galinhas, também podem ser infectados [32-34]. A Figura 4 representa a distribuição geográfica da infecção chagásica, incluindo seus reservatórios e seus vetores.

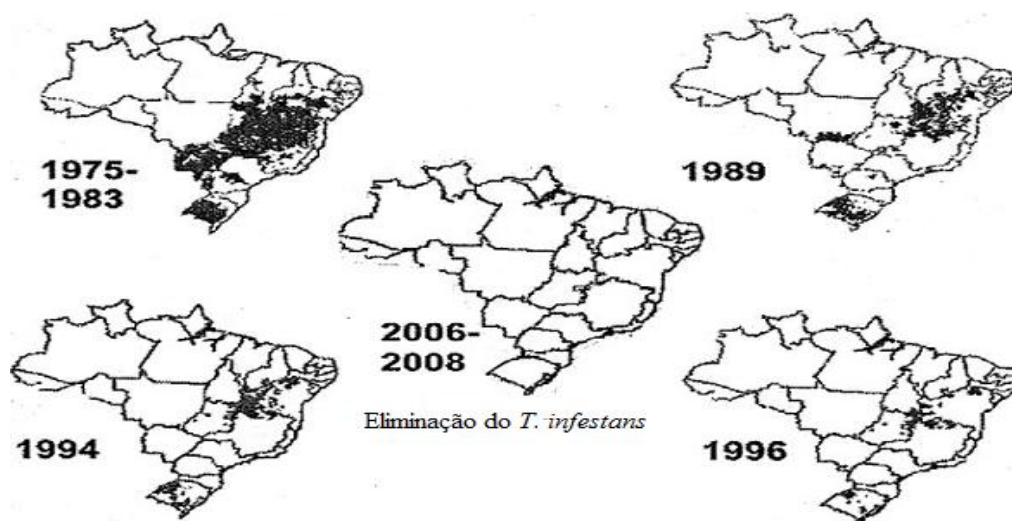


Figura 3: Controle do *T. infestans* no Brasil no período de 1975-2008. Adaptado de Coura; Dias [28].



Figura 4: Distribuição geográfica da doença de Chagas. Adaptado de Coura; Dias [28].

A infecção transfusional constitui o segundo mecanismo de maior importância epidemiológica na transmissão da doença de Chagas [35]. Admitida inicialmente por Mazza et al. [36] em 1936, a transmissão transfusional do *T. cruzi* foi formalmente mencionada como um possível e importante problema de Saúde Pública nas Américas. Em 1949 foram encontrados os primeiros doadores de sangue infectados pelo parasita e, em 1952 foram descritos casos de doença de Chagas transfusional na região de São Paulo (Brasil) [37,38]. No ano de 1960, a Organização Mundial da Saúde (WHO) estimou 7 milhões de casos por ano devido a transfusões de sangue na América Latina. Na década de 60, estimativas apontaram que mais de 6.000 e 10.000 casos da doença de Chagas, a cada ano, foram decorrentes de transfusão de sangue infectado nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, respectivamente. Tais achados ajudaram a mudar a política e a prática: desde então os bancos de sangue passaram a implementar procedimentos para prevenir a transmissão da doença de Chagas por transfusão no Brasil e em outros países latino-americanos [18,19], embora sangue infectado continue sendo um grande problema em países como a Bolívia, onde, em cidades como Santa Cruz de la Sierra e Cochabamba, até metade dos doadores de sangue podem estar infectadas com o *T. cruzi* [30].

A transmissão congênita da infecção chagásica é transplacentária e parece depender de fatores ligados ao parasito e ao hospedeiro. Ocorre quando os tripomastigotas presentes no espaço interviloso penetram na placenta corial através do epitélio trofoblástico e parasitam as células de Hofbauer (macrófagos da placenta), onde se transformam em amastigotas que se multiplicam por divisão binária. Posteriormente, há transformação intracelular destas em formas tripomastigotas, que são liberadas após ruptura da célula. Os tripomastigotas podem então penetrar em outros macrófagos ou atingir a luz dos vasos fetais da placenta, alcançando posteriormente o feto [39]. A taxa de infecção congênita em recém-nascidos vivos de mães chagásicas varia de 1,6% a 10,5% e é certamente maior se forem considerados os abortos e os natimortos [40].

A transmissão oral da doença de Chagas pode acontecer em várias situações. O ciclo silvestre caracteriza-se como uma forma usual de circulação do *T. cruzi* na natureza e ocorre principalmente quando animais ingerem triatomíneos infectados ou quando predadores caçam espécies de animais que servem como reservatórios [35]. A transmissão oral da doença de Chagas em humanos está especialmente associada à contaminação do leite materno (via congênita) e de sucos de frutas e verduras contaminados por vetores silvestres [41]. Muitas vezes, os insetos vetores são triturados no momento da preparação do alimento ou então há contaminação por dejetos dos reservatórios ou dos próprios vetores [42]. Entretanto, a contaminação oral também pode ocorrer pelo manuseio ou consumo de carcaça crua, mal cozida ou apenas defumada de mamíferos silvestres obtidos em atividades de caça [43], pela ingestão de sangue de tatus e gambás usados como remédio na medicina tradicional da Amazônia colombiana ou até mesmo por hábitos primitivos de ingestão de triatomíneos [44].

Do ponto de vista epidemiológico, surtos da doença aguda por via alimentar vêm sendo observados desde o século passado. Porém, no Brasil, o destaque à importância da via oral para a transmissão da doença de Chagas aconteceu somente na década de 1960, quando Shaw et al. [45] anteviram a possibilidade da transmissão oral da doença de Chagas na cidade de Belém (PA). Desde então, muitos são os registros de micro epidemias da doença de Chagas por transmissão alimentar em diversos estados brasileiros [46], envolvendo principalmente o caldo de cana e o açaí [47]. Nos mais de 1000 novos casos e surtos da doença de Chagas aguda registrados entre os anos de 2000 e 2010 a forma oral de transmissão foi predominante em todo esse período [25]. A Figura 5 representa as regiões brasileiras envolvidas em episódios de doenças de Chagas pela transmissão oral.

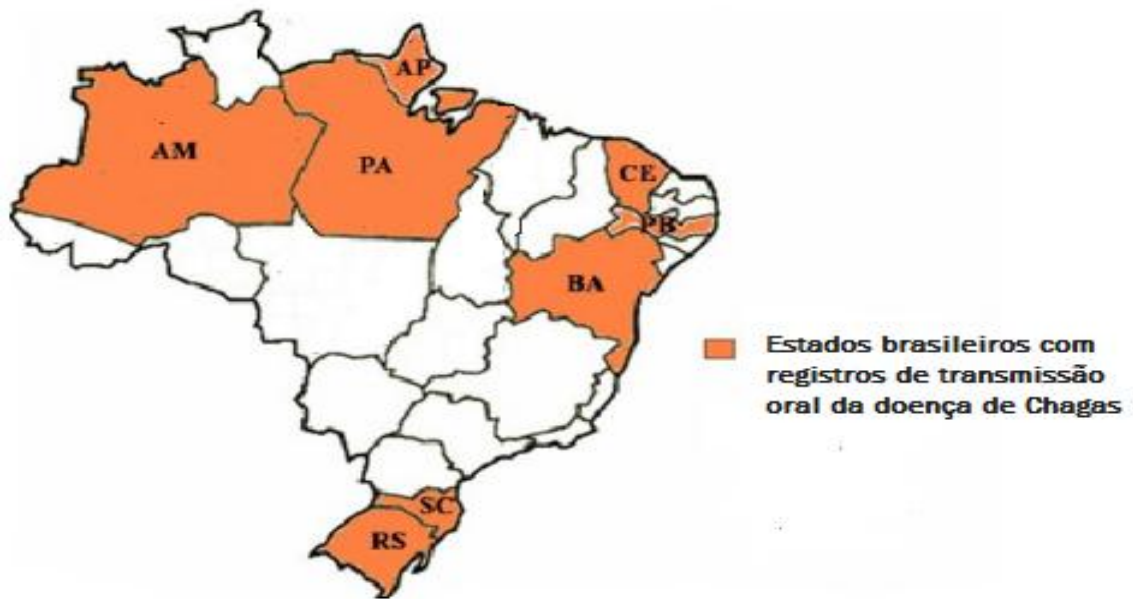


Figura 5: Estados brasileiros com relatos de surtos da doença de Chagas aguda por meio da transmissão alimentar. Adaptado de Pereira et al. [48].

Com o aumento do número de transplantes nas duas últimas décadas, essa via de transmissão tem adquirido relevância. A maior experiência é em transplante renal, que apresenta índice de transmissão de 35%. Mas a transmissão também é documentada em transplantes hepáticos, cardíacos e de medula óssea. Este mecanismo de transmissão pode desencadear fase aguda grave, pois o indivíduo que recebe um órgão transplantado infectado toma drogas imunossupressoras e, conseqüentemente, torna-se menos resistente à infecção [35,49]. O ideal é realizar o tratamento profilático com benzonidazol, quando já se sabe que o doador é portador da infecção chagásica. Em países de alta prevalência, realiza-se sorologia para doença de Chagas em todos os candidatos a doadores, mas em países onde a prevalência é baixa, essa prática não é universal, fazendo com que o diagnóstico seja mais tardio. Devido à prevalência relativamente alta de sorologia positiva para a doença na América Latina e ao pequeno número de doações de órgãos, o dilema de transplantes com sorologia positiva pode ocorrer e a decisão será guiada pela urgência do quadro do receptor [49].

Outras formas de transmissão excepcionais podem ocorrer. Acidentes de laboratório entre pesquisadores e técnicos que trabalham com o parasito pode ocorrer por meio de sangue de animais e de pessoas infectadas, meios de cultura ou vetor, sendo indispensável trabalhar com todas as condições de segurança. A transmissão pelo coito nunca foi comprovada na

espécie humana: há apenas relato de encontro de tripomastígotas em sangue de menstruação de mulheres chagásicas. A presença de tripomastigotas foi encontrada em espermatozoides de cobaias infectadas experimentalmente e, foi ainda, demonstrada a infecção após depositar o *T. cruzi* em vagina de ratas. Também pode ocorrer a transmissão por outros vetores que não triatomíneos [35].

### **Ciclo de vida do *T. cruzi***

Na natureza, o *T. cruzi* mantém ciclos domésticos, silvestres e peridomiciliares. O ciclo doméstico é mantido por meio de triatomíneos domésticos que transmitem a infecção de animais domésticos para os seres humanos. O ciclo silvestre é enzoótico e mantido por triatomíneos e animais selvagens, enquanto o ciclo peridomiciliar mantém a infecção entre animais domésticos em áreas circunvizinhas de habitações humanas por meio da ação de triatomíneos peridomiciliares e, ocasionalmente, através de intercâmbios com o ciclo silvestre [50].

O *T. cruzi* apresenta um complexo ciclo de vida que envolve várias fases de desenvolvimento. Ele inicia-se quando o barbeiro, ao se alimentar do sangue do hospedeiro vertebrado, elimina, em suas fezes e urina, o parasito em sua forma tripomastigota metacíclico. Através de mucosas ou por ferimentos na pele, estes infectam as células do hospedeiro, como por exemplo, fibroblastos, macrófagos e células epiteliais. No interior destas, o parasito ganha forma arredondada (amastigotas), multiplicando-se por divisão binária. Quando as células estão repletas de parasitos, eles novamente mudam para a forma tripomastigotas, mas agora sanguícola, e, com a ruptura da célula hospedeira, disseminam-se pela corrente sanguínea, sendo capazes de infectar novos tecidos e órgãos. Se o indivíduo ou animal infectado é picado pelo barbeiro, os parasitos em seu sangue podem ser transmitidos ao inseto. No intestino deste, mudam mais uma vez para forma epimastigotas, multiplicam-se e tornam-se, novamente, formas infectantes, que são eliminadas junto com as fezes e a urina do inseto fechando-se, assim, o ciclo [51-53] (Figuras 6 e 7).

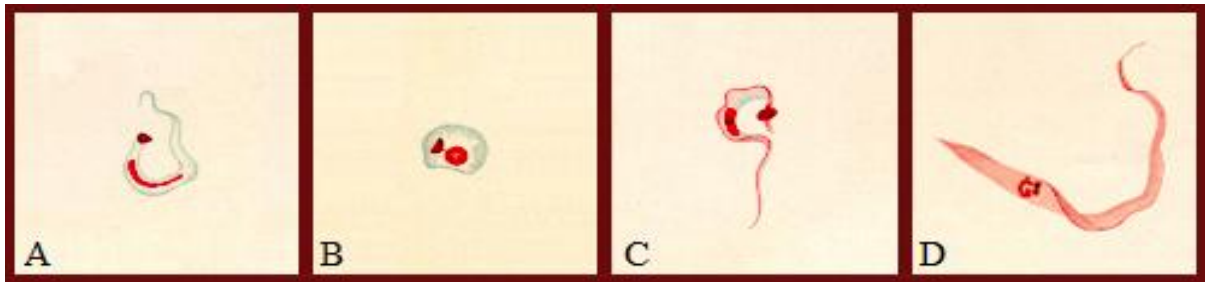


Figura 6: Estágios evolutivos do *T. cruzi*. A. tripomastigota metacíclico; B. amastigota; C. Tripomastigota sanguícola; D. epimastigota. Adaptado de Chagas [1].

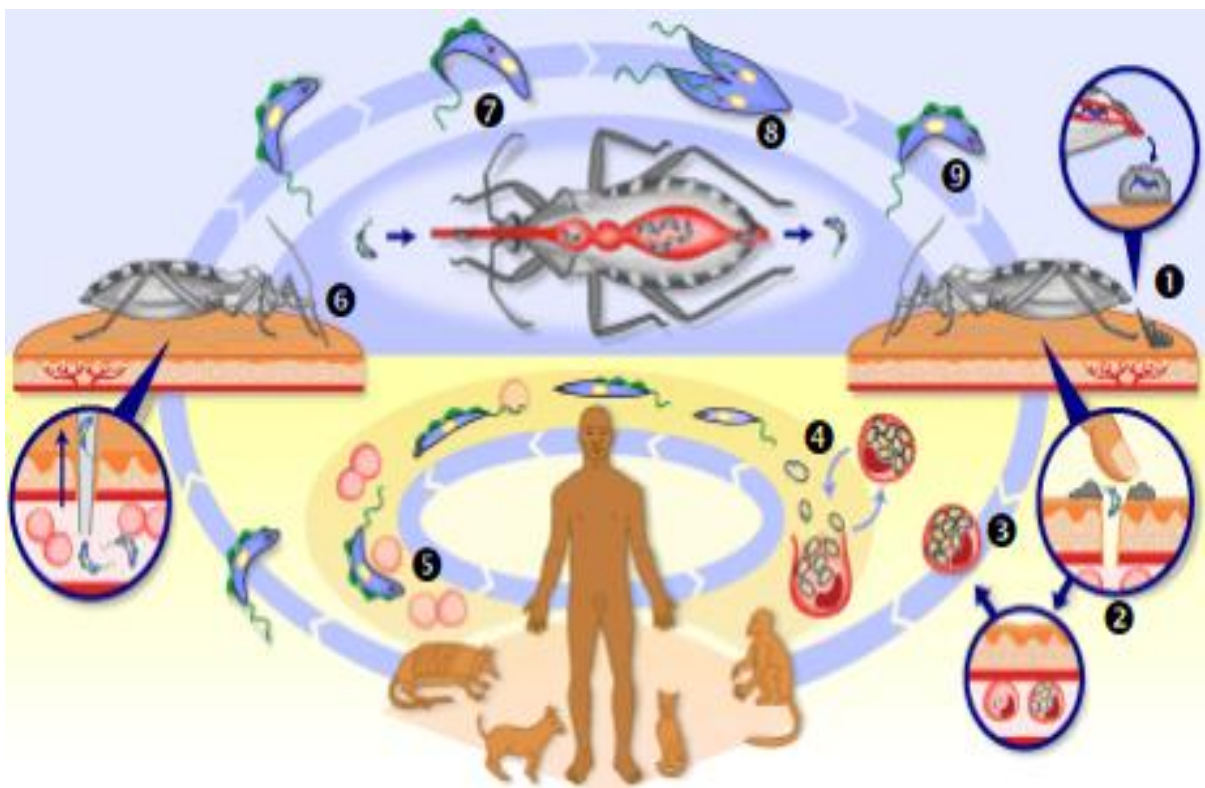


Figura 7: Ciclo de vida do *T. cruzi*. 1. Eliminação das formas tripomastigotas metacíclicas através das excretas do bicho barbeiro, 2. Infecção das células do hospedeiro, 3. Diferenciação para a forma amastigota e divisão binária, 4. Diferenciação em tripomastigotas sanguícolas, ruptura das células e disseminação pela corrente sanguínea, 5. Tripomastigotas infectam novas células dando origem a um ciclo particular no hospedeiro mamífero, 6. Tripomastigotas sendo sugados durante alimentação do bicho barbeiro, 7. Mudança de forma para epimastigota na porção anterior do intestino, 8. Divisão binária na porção posterior do intestino, 9. Diferenciação em tripomastigotas metacíclicas. Adaptado de WHO [54].

## **Manifestações clínicas e diagnóstico**

A doença de Chagas pode apresentar diversos tipos de manifestações clínicas, que geralmente se correlacionam com a fase da infecção. O desenvolvimento da doença ocorre por fases aguda e crônica, e, tanto a variabilidade genética e biológica do parasito quanto do hospedeiro podem influenciar o curso de evolução da doença [3,4].

O início da infecção ou fase aguda é caracterizado pela alta parasitemia ou formas circulantes tripomastigotas no sangue e dura cerca de dois a quatro meses [2]. Nesse período a mortalidade varia de 5% a 10% devido a episódios de miocardite e meningocéfalite em crianças [55,56]. Em adultos, na maioria dos casos, parece ser assintomática ou mesmo levar a apresentação de sintomas não específicos comumente encontrados em outras doenças, como febre, cansaço, letargia e linfocitose, que dificultam o diagnóstico da doença. Os sinais clínicos mais relacionados com a infecção são reação inflamatória local com formação de forte edema na região de entrada do parasito (chagoma de inoculação ou sinal de Romana), febre, esplenomegalia e arritmia cardíaca [57]. A presença de parasitos circulantes pode ser detectada por xanodiagnóstico, hemocultura [58] e pela caracterização molecular do parasita no sangue pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) [59].

Durante a fase aguda, a maioria dos indivíduos infectados desenvolve uma resposta imune humoral e celular responsável pela diminuição dos parasitos no sangue com ausência de sintomas. Após esse período os pacientes progridem para uma fase crônica indeterminada que acomete a maioria dos indivíduos (50 a 60%) e podem permanecer assim por toda vida [55,58]. Aproximadamente um terço de todos os indivíduos com a forma indeterminada desenvolverá manifestações clínicas da doença de Chagas crônica com lesões irreversíveis em alguns órgãos [60]. Cerca de 20% a 30% desenvolvem, após 10 a 20 anos de infecção, miocardiopatia de gravidade variável; finalmente, 8% a 10% apresentam a forma digestiva, caracterizada por dilatações do esôfago e/ou cólon (megaesôfago e megacólon, respectivamente). Os demais pacientes apresentam associação das manifestações cardíaca e digestiva, conhecida como forma mista ou cardiodigestiva. As alterações da fase crônica podem ser evidenciadas por diagnóstico clínico utilizando eletrocardiograma, raio X e ultrasonografia [58,61]. Outra forma de diagnóstico da doença, independente da fase, é a avaliação pelo exame sorológico para a detecção de anticorpos, específicos ao parasito das classes IgM (fase aguda) e IgG (fase indeterminada e crônica) [62] (Figura 8).

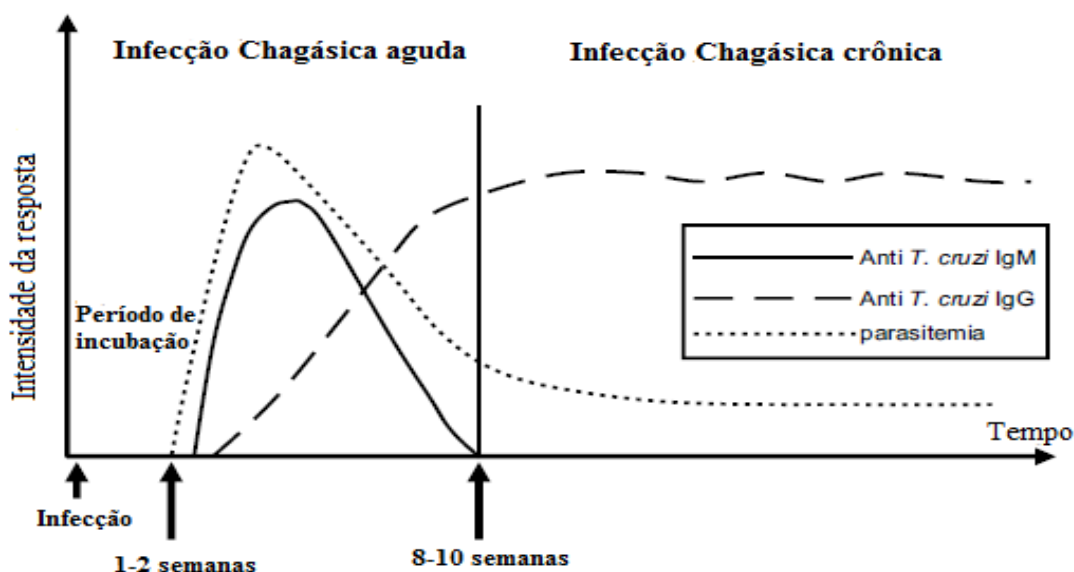


Figura 8: Caracterização das fases aguda e crônica da doença de Chagas. Adaptado de Rassi; Rassi; Rezende [34].

A forma crônica cardíaca, pela sua gravidade e frequência, é uma das formas mais bem estudadas da doença de Chagas. Esta forma leva à insuficiência cardíaca, transtornos do ritmo e da condução, fenômenos tromboembólicos e morte súbita. Pacientes portadores desta forma clínica apresentam miocardite usualmente intensa e difusa, sendo acompanhada de cardiomegalia, lesões vasculares e fibrose [63-65].

Pacientes portadores da forma digestiva apresentam sintomas decorrentes de comprometimento de órgãos deste sistema, principalmente do esôfago (megaesôfago) e do cólon (megacólon). Acredita-se que um dos fatores mais importantes no desenvolvimento do mega chagásico seja um processo degenerativo, principalmente de gânglios nervosos do sistema nervoso entérico, que aparentemente tem seu início na fase aguda, persistindo até a fase crônica [66-68]. As principais manifestações clínicas encontradas na forma digestiva são a disfagia, odinofagia (dor à deglutição dos alimentos), regurgitações, epigastria, dispepsia, hipertrofia das parótidas, discinesia esofágica, alterações morfológicas e desordem motora do arco duodenal, alterações do trânsito intestinal, meteorismo (acúmulo de gases no abdomen) e constipação intestinal [69].

## Tratamento



A doença de Chagas ainda é uma doença incurável em humanos, pois a resposta imune consegue apenas controlar a quantidade de parasitos, sendo incapaz de eliminá-lo. As únicas opções existentes há mais de 40 anos são as drogas Nifurtimox e Benzonidazol [70,71]. Estes são especialmente eficazes na cura da infecção na fase inicial, aguda, pois parecem ser menos ativos nos estágios mais avançados da doença. A taxa de cura é de 80% desde que os pacientes terminem um ciclo completo de 60 dias na dose correta [72]. Mas ainda não são ideais, uma vez que são tóxicas e podem induzir resistência no parasito e determinadas cepas apresentam alta refratariedade ao tratamento [71].

O Nifurtimox, produzido pelo Laboratório Bayer, foi lançado em 1972 com o nome comercial de Lampit® e utilizado para o tratamento da doença de Chagas [73]. Considerado tóxico ao homem, teve sua comercialização cancelada em diversos países, inclusive no Brasil [74]. O Benzonidazol, foi produzido pelo Laboratório Roche no período de 1978 a 2003 e comercializado sob o nome de Rochagan®, contudo, a patente foi cedida para o laboratório público Lafepe, que atualmente é o único laboratório que detém a tecnologia de fabricação do Benzonidazol [75].

### **Resposta Imunológica na doença de Chagas**

Como ocorre em várias parasitoses, a infecção pelo *T. cruzi* ativa várias vias do sistema imune, levando ao aparecimento de respostas celulares e humorais específicas contra o parasito [76]. Como consequência, o parasito passa a ser combatido continuamente e sua multiplicação nos tecidos do hospedeiro é reduzida. No entanto, o parasito persiste assim como a resposta imunológica [73] o que contribui para o aparecimento das manifestações crônicas [77], ou seja, esta atividade imunológica resulta no aparecimento de lesões teciduais que levam à alterações fisiológicas funcionais, musculares e nervosas, características da doença de Chagas [73].

O *T. cruzi* apresenta nos hospedeiros vertebrados dois estágios do seu ciclo de vida que são biologicamente e morfológicamente distintos, e com isso ativarão moléculas e populações celulares distintas do sistema imune. O contato com as formas tripomastigotas do *T. cruzi* durante as fases iniciais da doença, principalmente com macrófagos, inicia as interações moleculares que mobilizam a resposta imune inata do hospedeiro: tipicamente ocorre a secreção de citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e

interleucina 12 (IL-12) pelos macrófagos. Estas citocinas ativam as células *Natural Killer* (NK) a produzirem interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) que atua diretamente sobre os macrófagos, ativando-os para a atividade antimicrobiana. O papel do TNF- $\alpha$  na resposta inata do hospedeiro é complexo, levando a efeitos deletérios como protetores [78]. Em associação ao TNF- $\alpha$ , o IFN produzido pelas células NK estimuladas, leva a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos com atividade tóxica sobre o *T. cruzi*. Por outro lado, as citocinas regulatórias IL-4, IL-10 e fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) inibem a produção de NO e a atividade tripanocida de macrófagos infectados ativados [79], sendo responsáveis pela desativação e pelo controle dos efeitos inflamatórios letais das citocinas tipo 1 produzidas durante a infecção [80].

Modelos experimentais demonstraram que antígenos derivados do *T. cruzi* são capazes de ativar as células NK antes do desenvolvimento da imunidade mediada por células T [81], entretanto, a ativação descontrolada de NK e macrófagos pode levar à lesão tecidual e neste contexto, o perfil de citocinas produzidas por estas células exercem função regulatória importante. Segundo Vitelli-Avelar et al. [82], um perfil misto de produção de citocinas foi observado em células NK estimuladas por *T. cruzi in vitro*: altos níveis de IFN- $\gamma$ +, TNF- $\alpha$ +, e IL-4+ favorecem a geração de mecanismos inflamatórios protetores. O intenso processo inflamatório durante a infecção inicial pode não ser determinante apenas na imunopatologia associada à fase tardia, mas é essencial em confinar o agente etiológico no sítio intracelular (limitando a infecção e sintomas) e prevenindo o dano tecidual [83].

Quando os tripomastigotas infiltram nas células do hospedeiro vertebrado se diferenciam em amastigotas. Nessa forma intracelular, as células T reconhecem a célula infectada através dos epítomos do parasito ancorados no complexo principal de histocompatibilidade (MHC), e se diferenciam e controlam a replicação do parasita por destruição da célula infectada [84].

Apesar de ser considerado, por décadas, que a resposta imune adaptativa é o mais importante mecanismo protetor durante a infecção crônica, estudos recentes tem sugerido a importância da resposta inata como um mecanismo de regulação para controlar a morbidade durante a doença crônica [85]. Embora seja observado o aumento da concentração de NK circulantes na doença de Chagas crônica, a permanência de subpopulações de CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> e CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> é particularmente alta em pacientes com a forma

indeterminada da doença, sugerindo um possível papel protetor desta subpopulação celular, ou seja, da capacidade em controlar a morbidade durante a infecção chagásica, pois células NK CD56<sup>dim</sup> tem maior atividade citotóxica e contribuem com o controle do parasitismo [82,85].

O controle do parasitismo caracteriza a forma assintomática ou indeterminada e os mecanismos imunorregulatórios são importantes na manutenção desta forma clínica. Pacientes assintomáticos exibem células Treg (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup>) e NKT (CD3<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>), células regulatórias, associadas com o aumento na circulação de células NK citotóxicas. Monócitos também exibem função importante na regulação e imunopatogênese da doença: os pacientes assintomáticos exibem características imunomodulatórias caracterizada pela baixa expressão de HLA-DR e alta expressão de IL-10 [82,85]. De acordo com Vitelli-Avelar et al. [82], a grande participação de células regulatórias macrófagos-like (CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>) e de células NK, independente da presença de linfócitos regulatórios (células NKT e CD4<sup>+</sup> CD25<sup>HIGH</sup>), favorecem o estabelecimento e a manutenção da forma clínica indeterminada.

As formas clínicas mais agressivas, como a forma cardíaca, são caracterizadas pelo aumento da subpopulação de células CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>. A maior expressão de células T CD8<sup>+</sup> ativadas e a frequência basal de células NK, NKT e CD4<sup>+</sup> CD25<sup>HIGH</sup> podem levar à fase crônica, associada com os eventos de comprometimento cardíaco. Os monócitos de pacientes com comprometimento cardíaco induzem resposta inflamatória relacionada à expressão de TNF- $\alpha$  [82,85].

Neste contexto, é provável que a resposta imune inata atue de duas formas durante os estágios iniciais da infecção pelo *T. cruzi*. Enquanto seus mecanismos efetores atuam na redução e controle da replicação do parasita nos tecidos, outros mecanismos propiciam a geração de resposta imune adquirida menos patológica, especialmente durante a fase crônica da infecção [85].

No decorrer da fase crônica da infecção chagásica, as subpopulações de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) apresentam importância quanto à capacidade de controlar a infecção pelo *T. cruzi*. Estudos utilizando células mononucleares de sangue periférico constataram uma predominância de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em pacientes com a forma clínica indeterminada [87]. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> por sua capacidade em produzir elevados níveis de IFN- $\gamma$  auxilia na destruição das formas intracelulares do parasito, durante a fase crônica da doença [86].

Pacientes com sintomas cardíacos exibem fenótipos predominantemente de células T CD8+ ativadas, o que sugere uma possível participação dessas células em mecanismos imunopatológicos [87]. Esta hipótese é reforçada por estudos realizados por técnicas de imunohistoquímica em tecidos cardíacos, nos quais as lesões inflamatórias eram principalmente caracterizadas por linfócitos T CD8+. Em adição, observou-se expressão aumentada de moléculas MHC de classe I nas células do miocárdio de pacientes com cardiopatia crônica, reforçando que elas podem representar alvos de linfócitos para a citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8+ [88].

De fato, estudos têm demonstrado que as diferentes manifestações clínicas estão associadas com uma distinta e complexa interação parasita/hospedeiro envolvendo diretamente o sistema imune. Ainda, é bem aceito que a ausência de patologia na doença de Chagas está associada com a habilidade do indivíduo em controlar a resposta imune desencadeada no controle do parasitismo, e assim contribuir no controle dos inflamatórios característicos da doença [81].

## **FATORES GENÉTICOS E SUA INFLUÊNCIA NA DOENÇA DE CHAGAS**

O avanço no conhecimento sobre infecção-doença tem mudado o conceito das doenças infecciosas e os marcadores genéticos tem tido um importante papel nesta área, tendo em vista que a expressão clínica das infecções é extremamente variável. Assim um grande avanço é esperado no conhecimento sobre a função de genes na resistência ou na suscetibilidade a doenças [89].

Evidências sugerem que a suscetibilidade a doenças infecciosas ocorre em uma pequena porcentagem, variando de 0,1% a 10%, da população exposta aos agentes infecciosos. Desta forma, a progressão de uma infecção, assim como o desenvolvimento de diferentes formas clínicas e diferentes graus de gravidade, podem estar relacionados com as características genéticas do patógeno e do hospedeiro. No caso da infecção pelo *T. cruzi*, o espectro de expressão da doença de Chagas varia entre pacientes assintomáticos até os cardiopatas, com falha cardíaca grave, ou com a forma digestiva, com formação de megacólon e megaesôfago, trazendo fortes evidências da influência de fatores genéticos no curso evolutivo da doença [90].

Recentemente, os polimorfismos dos genes de resposta imune KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) estão sendo abundantemente estudados no intuito de esclarecer sua possível participação na ocorrência ou gravidade de doenças. Os genes KIR codificam os receptores KIR (receptores do tipo imunoglobulina “*killer*”) que estão envolvidos na resposta imunológica mediada por células *natural killer* (NK). As células NK são uma subpopulação de linfócitos granulosa que exercem função crucial na resposta imune inata, especialmente contra células infectadas, transformadas ou alogênicas, pela sua capacidade de lise celular sem sensibilização prévia e também pela produção de citocinas e quimiocinas que mediam a resposta inflamatória [91].

As células NK reconhecem as moléculas HLA de classe I, presentes nas células-alvo, por intermédio de uma família de receptores de superfície, envolvida na sua atividade citolítica, ou seja, receptores KIR [92,93]. As células NK possuem vários tipos de receptores, entre os quais estão os receptores KIR, que são glicoproteínas pertencentes à superfamília das imunoglobulinas, os quais são encontrados também em algumas subpopulações de células T [94].

O mecanismo pelo qual a célula NK age é conhecido como teoria do *missing self*, ou seja, as NK reconhecem a ausência ou diminuição da expressão de moléculas HLA na superfície das células infectadas, tumorais ou alogênicas, fazendo com que a sua ação seja efetiva sobre as células-alvo [95]. Por outro lado, as células normais do organismo, que apresentam níveis normais de moléculas HLA em sua superfície, são reconhecidas pelas NK, que geram um sinal inibidor, prevenindo assim, a destruição dessas células [93]. Ainda é aceito que as células NK podem ser ativadas e se tornarem citotóxicas também pela expressão exagerada de ligantes para receptores de ativação na superfície da célula-alvo [95].

Os genes KIR são denominados 2D quando codificam proteínas com dois domínios extracelulares e 3D quando codificam proteínas com três domínios. As letras L e S (do inglês *Long* e *Short*) referem-se ao tamanho da cauda citoplasmática, longa ou curta, respectivamente [96]. Receptores KIR de inibição apresentam cauda citoplasmática longa contendo um ou dois motivos de inibição denominados ITIMs (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*) que transmitem sinais inibidores. Receptores KIR de ativação apresentam cauda citoplasmática curta, ausência de ITIMs e um aminoácido carregado positivamente na região transmembrana que pode ser lisina ou arginina, as quais permitem a associação dos receptores KIR com a molécula acessória DAP-12, que contém motivos de ativação ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) responsáveis pelos sinais

de ativação [97]. Em contrapartida, o receptor KIR2DL4 é uma exceção, pois possui ITIM em sua cauda citoplasmática e o aminoácido arginina na região transmembrana, a qual transmite sinais de ativação às células NK via ITAM [98] (Figura 9).

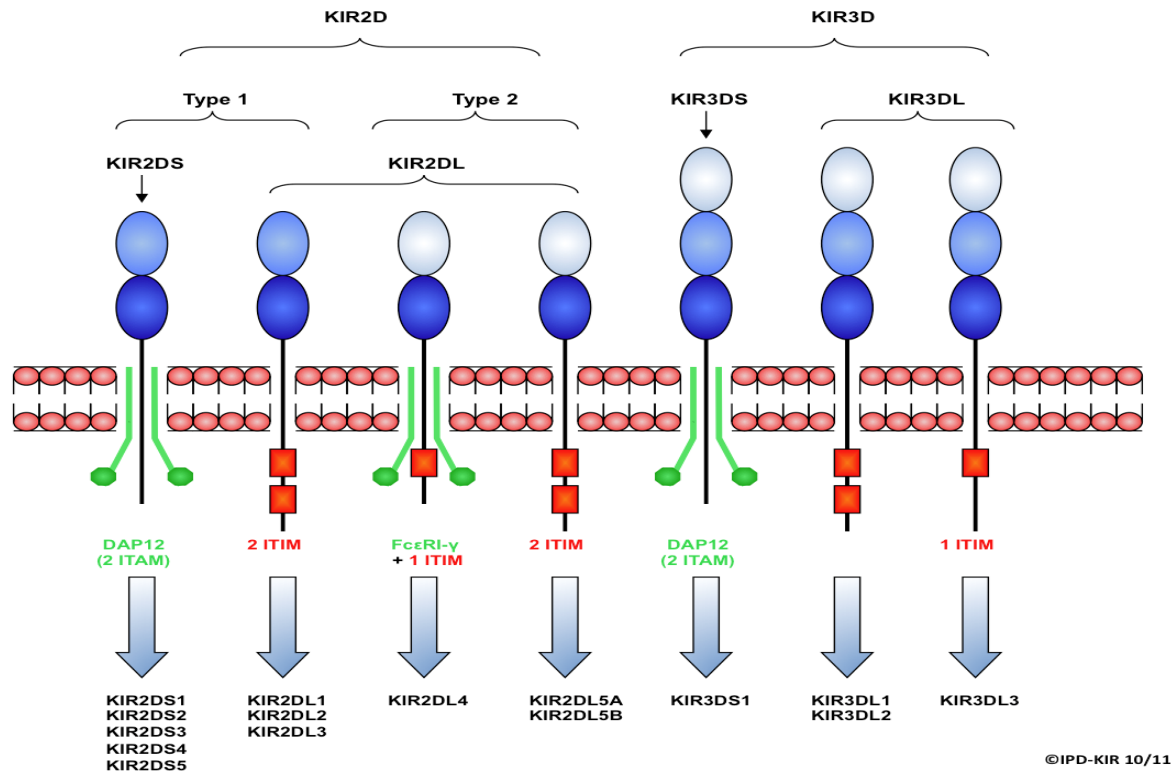


Figura 9: Estrutura molecular dos receptores KIR: Domínios extracelulares (azul), região transmembrana, molécula acessória DAP-12 (verde) e cauda citoplasmática com presença de ITIMs (vermelho). Extraído de IPD-KIR [99].

O grupo de genes KIR compreende uma região de aproximadamente 150Kb localizada no braço longo do cromossomo 19 humano (19q13.4), em um complexo gênico de 1Mb denominado Complexo de Receptores Leucocitários (LRC - *Leukocyte Receptor Complex*) (Figura 12). Atualmente, 15 genes KIR: *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR3DS1*, e dois pseudogenes: *KIR2DP1* e *KIR3DP1* foram identificados. Até abril de 2011 foram descritos 614 alelos distribuídos nos diferentes locos [99], evidenciando o extenso polimorfismo desses genes.

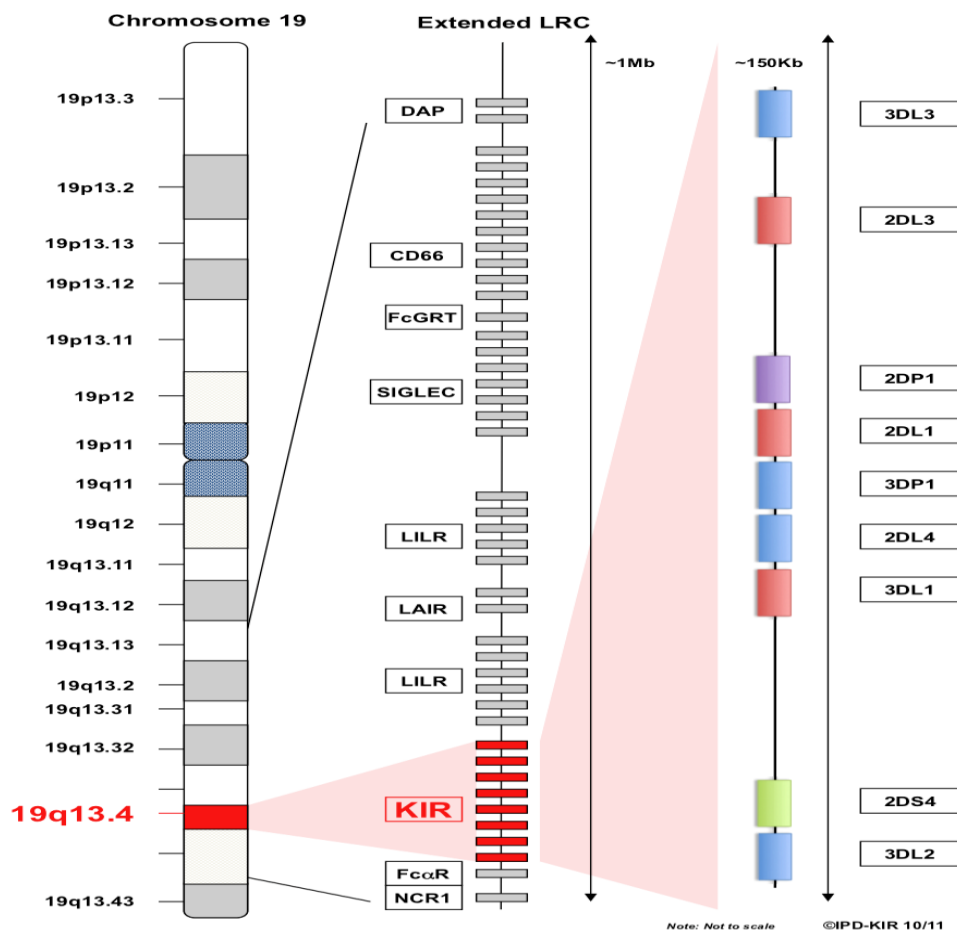


Figura 10: Complexo de Receptores Leucocitários e os genes KIR. Extraído de IPD-KIR [99].

Os genes KIR estão organizados em nove exons que codificam os diferentes domínios funcionais da proteína. Os exons 1 e 2 codificam o peptídeo sinal, enquanto que os exons 3, 4 e 5 codificam os domínios extracelulares semelhantes à imunoglobulina, D0, D1 e D2, respectivamente, que são responsáveis pelo reconhecimento dos ligantes. O exon 6 codifica o segmento que une D2 a região transmembrana, que por sua vez é codificada pelo exon 7. Os exons 8 e 9 codificam o domínio citoplasmático da molécula, responsável pela transdução intracelular de sinais [92].

Na espécie humana, os genes KIR formam dois tipos de haplótipos que são designados haplótipo A e haplótipo B. O haplótipo A é representado por sete genes, dos quais apenas *KIR2DS4* codifica um receptor ativador. Este gene possui um alelo não funcional que ocorre em frequências elevadas em todas as populações estudadas. Dessa forma, o haplótipo A tem um papel predominantemente inibidor da ação das células NK [100]. Este haplótipo não varia

em conteúdo de genes, mas têm grande variação no nível alélico. Por outro lado, o haplótipo B é formado por um número variável de genes, mas possui polimorfismo alélico moderado [92]. Entre os genes que compõe o haplotipo B estão presentes outros genes KIR ativadores, além de *KIR2DS4*. Com exceção de *KIR2DL4*, que é expresso por todas as NK, os demais genes KIR são expressos em diferentes combinações. Essa expressão diferencial entre as células NK de um mesmo indivíduo ocorre pela ação de mecanismos epigenéticos que regulam a expressão dos diferentes genes KIR [101].

As células NK podem expressar receptores KIR para os quais o ligante HLA não está presente e podem ainda, serem expressos em indivíduos com expressão muito baixa de HLA de classe I [102,103]. A maioria dos receptores KIR tem como ligante as moléculas HLA-C. KIR2DL1 e KIR2DS1 se ligam a moléculas HLA-C do grupo 2 (HLA-C2), que incluem HLA-C\*02, C\*04, C\*05, C\*06, C\*15 e C\*17. KIR2DL2, KIR2DL3 e KIR2DS2 se ligam a moléculas HLA-C do grupo 1 (HLA-C1): HLA-C\*01, C\*03, C\*07, C\*08, C\*12, C\*13, C\*14 e C\*16. Vale destacar que as moléculas HLA-C1 e HLA-C2 distinguem-se por um dimorfismo na posição 80 do domínio  $\alpha 1$ . KIR3DL1 interage com HLA-B do grupo de Bw4, e incluem HLA-B\*13, B\*27, B\*44, B\*51, B\*52, B\*53, B\*57 e B\*58. KIR3DL2 interage com HLA-A3 e HLA-A11. KIR2DL4 se liga ao HLA-G, uma molécula HLA de classe I não-clássica, com pouco polimorfismo [93]. Ainda permanecem indefinidos os ligantes para KIR2DL5, KIR2DS3, KIR2DS5 e KIR3DL3 [104].

Algumas análises demonstraram que a presença ou ausência de certos genes KIR, bem como diferentes combinações de KIR e ligantes HLA, podem estar envolvidos no curso clínico de uma série de doenças, principalmente as infecciosas causadas por vírus, as autoimunes e tumorais [105-106]. Em relação a doenças infecciosas, Martin et al. [108] mostraram que a interação entre KIR3DS1 e os ligantes do grupo HLA-Bw4 leva a uma progressão mais lenta da AIDS em pacientes soropositivos. A presença de KIR3DL1 em combinação com alelos de HLA-B\*57 confere um efeito protetor contra a progressão da doença no estudo feito por López-Vazquez et al. [109], evidenciando que o polimorfismo HLA influencia na interação KIR-ligante e conseqüentemente na evolução da infecção. Gaudieri et al. [110] verificaram que pacientes portadores do gene *KIR2DS2* apresentam uma acelerada progressão da infecção pelo vírus HIV em relação aos demais devido a um declínio mais rápido na contagem de células T CD4. Indivíduos homocigotos para a presença de KIR2DL3 e ligantes HLA-C1 possuem uma expressiva vantagem no combate ao vírus da



hepatite C [111]. Em tuberculose, o gene *KIR2DL3* foi encontrado significativamente elevado em pacientes, indicando que a inibição das células NK promovidas por esse receptor pode facilitar o desenvolvimento da infecção bacteriana [112], enquanto que na hanseníase, o aumento da frequência dos genes *KIR2DS2* e *KIR2DS3* em pacientes com a forma clínica tuberculóide, que é a forma branda da doença, indica maior ação das NK no combate ao microorganismo [113]. Associações envolvendo HLA grupo C, ligantes de KIR, foram observadas com a progressão para cirrose em pacientes infectados com o genótipo 1 do vírus HCV por Maragon et al. [114]. Correlações positivas com o desenvolvimento de malária foram demonstradas para os genótipos *KIR3DL1/S1* e alelos do gene *KIR2DS4* [115] e para *KIR2DL2* e *KIR2DS2* [116].

Em relação às doenças autoimunes, Yen et al. [117] observaram que a combinação entre *KIR2DS2* e HLA-C1 está associada à vasculite reumatóide, que ocorre como complicação da artrite reumatóide. De forma semelhante, o diabetes tipo 1 foi associado ao aumento do número de genes KIR ativatórios, particularmente com a presença *KIR2DS2* e HLA-C1, e a ausência de pares inibidores KIR/HLA [118]. Os genes *KIR2DS1* e *2DS2* estão associados a uma maior suscetibilidade à artrite psoriática caso haja ausência de ligantes HLA-Cw para os receptores inibidores *KIR2DL1* e/ou *2DL2/2DL3* [108]. Recentemente, foi demonstrado que indivíduos portadores do gene *KIR2DL1* e HLA-Cw2 possuem um menor risco para o desenvolvimento de esclerose múltipla [119] e diabetes tipo 1 [120].

Além das patologias citadas, os genes KIR também podem influenciar no desenvolvimento de outras enfermidades como certas neoplasias [121,122], doença do enxerto contra hospedeiro decorrente de transplante [123], desenvolvimento da pré-eclâmpsia [124], aborto espontâneo recorrente, além de muitas outras doenças [94].

Mesmo que a proteção contra patógenos tais como o *T. cruzi* seja criticamente dependente da função de células NK, não é de nosso conhecimento qualquer estudo envolvendo os genes KIR e seus ligantes com a suscetibilidade ou resistência à doença de Chagas. Uma vez que as funções inibidoras e ativadoras das células NK, determinadas tanto pela expressão diminuída ou ausente de moléculas HLA quanto por distúrbio do equilíbrio mediado por receptores existentes em sua superfície, podem contribuir para as lesões teciduais observadas na doença de Chagas, propomos o estudo de genes KIR e seus ligantes HLA de classe I na doença de Chagas e nas suas manifestações cardíacas.

## **JUSTIFICATIVAS**

As diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas estão associadas com uma distinta e complexa interação parasita/hospedeiro envolvendo diretamente o sistema imune [81]. Desta forma a identificação de fatores genéticos ligados ao hospedeiro pode contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na imunopatogênese da doença de Chagas [89]. Nesse contexto, destacam-se os fatores envolvidos na regulação gênica da resposta imunitária específica, o que inclui os polimorfismos nos genes codificadores de moléculas KIR e HLA.

Assim, a caracterização genética dos polimorfismos de KIR e de seus ligantes HLA de classe I em uma população que desenvolveu a doença de Chagas e a sua comparação com um grupo de indivíduos saudáveis permitirá investigar a influência destes genes na resistência ou suscetibilidade à doença e/ou nas suas formas clínicas.

## **OBJETIVO GERAL**

Investigar a influência de genes de resposta imunitária KIR e seus ligantes HLA na resistência ou na suscetibilidade à doença de Chagas e em sua forma cardíaca numa população da região Sul do Brasil.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Identificar os genes KIR e os grupos alélicos de HLA-A, HLA-B e HLA-C (ligantes de KIR) em indivíduos na fase crônica da doença de Chagas e aqueles com comprometimento cardíaco e em indivíduos controles, todos provenientes da região Sul do Brasil.
- 2- Estimar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas para os genes KIR.
- 3- Avaliar, estatisticamente, uma associação entre estes genes KIR e a forma clínica cardíaca da doença de Chagas.

## REFERÊNCIAS

- [1] Chagas, C. Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. Agente etiológico de uma nova entidade mórbida para o homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1909;1:159-218.
- [2] Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98:577-591.
- [3] Macedo AM, Pena SDJ. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. Parasitol Today 1998; 14:119-124.
- [4] Andrade LO, Machado CRS, Chiari E, et al. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. Mol Biochem Parasitol 1999;100:163-172.
- [5] WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em 26 out. 2011.
- [6] Hoare C. The trypanosomes of mammals. J smal Anim Pract 1972;13: 671-672.
- [7] Schofield CJ. Overview: evolution of the *Triatominae*. In: Schofield CJ, Ponce C, editores. Proceedings of the Second International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae. México, INDRE, 1998.
- [8] Rothhammer F, Allison MJ, Núñez L, Standen V, Arriaza B. Chagas disease in pre-Columbian South America. Am J Phys Anthropol 1985; 68:495-498.
- [9] Coura JR. Chagas disease: what is known and wath is needed - a background article. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007;102:113-122.
- [10] Aufderheide AC, Salo W, Madden M, et al. A 9,000- year record of Chagas disease. Proc Natl Acad. Sci USA 2004;101:2034-2039.
- [11] Carlier Y, Dias JCP, Luquetti AO, et al. Trypanosomiase américaine ou maladie de Chagas. In: Encyclopedie Médico Chirurgicale. Paris, Elsevier, 2002.
- [12] Prata, A., Dias, J. C., Coura, J. R. Os primórdios da doença. Rev Bras Soc Med Trop 2011; Suppl II: 6-11.
- [13] Rey L. Bases da Parasitologia Médica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002.
- [14] Forattini OP. Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliarity in Brazil. Rev Saude Pública 1980;14:265-299.
- [15] Silva LJ. A evolução da doença de Chagas no Estado de São Paulo. São Paulo, Hucitec, 1999.

- [16] Bean WB. The illness of Charles Darwin. *Am J Med* 1978;65:72-574.
- [17] Koberle F. 50 Years of Chagas' disease. *Munch Med Wochenschr* 1957; 99:1193-1198.
- [18] Schmunis, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102:75-85.
- [19] Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* 2009;115:14-21.
- [20] Coura JR, Vinãs PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 2010; 465:S6-S7.
- [21] Dias JC P, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America- a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:603-612.
- [22] Urbina JA. Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. *J Mol Med* 1997; 77: 332-338.
- [23] Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol* 2006; 100:663-677.
- [24] Junqueira Junior LF. Ecos da XXII reunião anual de pesquisa aplicada em doença de Chagas e X reunião anual de pesquisa aplicada em leishmanioses. *Rev Bras Soc Med Trop* 2006;39:565-566.
- [25] MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano nacional da saúde-PNS 2012-2015. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano\\_nacional\\_saude\\_2012\\_2015.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_nacional_saude_2012_2015.pdf)>. Acesso em: 30 out. 2012.
- [26] Neto VA. Centenário da doença de Chagas. *Rev Saúde Pública* 2009; 43:381-382.
- [27] WHO. Report of Scientific group in Chagas disease. Disponível em: <<http://cdiaec.uniandes.edu.co/SWG%20FINAL%20buenos%20aires.pdf>>. Acesso em 17 mar. 2011.
- [28] Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its Discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:31-40.
- [29] Jannin J, Salvatella R, editores. Quantitative estimates of Chagas disease in the Americas. OPS/HDM/CD/425-06. Washington, Pan American Health Organization, 2006.
- [30] Schmunis GA, Rodriguez G, Coenen J, et al. Prevention of blood-borne diseases in Bolivia, 1993-2002. *Am J Trop Med Hyg* 2008;79:803-8.
- [31] Galvão CA. Sistemática dos triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), de De Geer ao DNA. *Entomol Vect* 2003;10:511-530.

- [32] Coura JR. Doença de Chagas. In: Coura JR, editor. Síntese das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.
- [33] Barretto MP. Reservatórios de *Trypanosoma cruzi* nas Américas. Rev Bras Malariol Doenças Trop 1964;16:527-552.
- [34] Rassi AJr, Rassi A, Rezende JM. American trypanosomiasis (Chagas disease) Infect Dis Clin North Am 2012;26:275-91.
- [35] Neves DP, Melo AL, Genaro O, editors. Parasitologia humana. São Paulo, Atheneu, 2005.
- [36] Mazza S, Montaña A, Benitez C, et al. Transmisión del *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. MEPRA 1936; 28:41-46.
- [37] Freitas JLP, Amato-Neto V, Sonntag R, et al. First tests on the accidental transmission of Chagas disease to man by blood transfusion Rev Paul Med 195;40:36-40.
- [38] Pellegrino J. Transmissão da doença de Chagas pela transfusão de sangue. Primeiras comprovações sorológicas em doadores e em candidatos a doadores de sangue. Revista Brasileira de Medicina 1949; 6: 297-301.
- [39] Born D, Achá RES, Ferraz M, et al. Pregnancy and Chagas' disease. J Am Coll Cardiol 1998;31:421.
- [40] Bittencourt AL, Barbosa HS, Santos I, et al. Incidência de transmissão congênita da doença de Chagas em partos a termo. Res Inst Med Trop São Paulo 1994;16:197-199.
- [41] Camandaroba, EL, Pinheiro Lima CM, Andrade SG. Oral transmission of Chagas' disease: Importance of *Trypanosoma cruzi* biotome in the intragastric experimental infection. Rev Inst Med Trop São Paulo 2002; 44: 97-103.
- [42] Ribeiro RD, Rissato e Garcia TA, Bonomo WC. Contribuição para o estudo dos mecanismos de transmissão do agente etiológico da doença de Chagas. Rev Saude Publica 1987; 21:51-54.
- [43] Forattini OP, Silva EOR, Barata JMS, et al. Nota sobre caso autóctone de tripanossomíase americana no litoral sul do Estado de São Paulo, Brasil. Rev de Saúde Pública 1980;14:143-149.
- [44] Dias JCP. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. Rev Soc Bras Med Trop 2006;39:370-375.
- [45] Shaw J, Lainson R, Fraiha H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. Rev Saude Publica 1969; 3:153-157.

- [46] PANAFTOSA. Consulta técnica em epidemiologia, prevenção e manejo da transmissão da doença de Chagas como doença transmitida por alimentos. Rev Bras Soc Med Trop 2006; 39: 512-514.
- [47] MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas Aguda por transmissão oral. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota\\_chagas2609.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas2609.pdf)>. Acesso em: 15 fev.2012
- [48] Pereira KS, Schmidt FL, Barbosa-Labello R, et al. Transmission of Chagas' disease (American trypanosomiasis) by foods. Advances in Food and Nutrition Research 2010; 59:63-85.
- [49] FIOCRUZ. Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=173>>. Acesso em 15 fev.2012.
- [50] Deane MP, Lenzi HL, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984;79: 513-515.
- [51] Andrade ZA. Anatomia patológica da doença de Chagas. Rev Goiana Med 1958;4:103-119.
- [52] Neves DP, Melo AL, Genaro O, editors. Parasitologia Humana. São Paulo, Atheneu, 2003.
- [53] Souza W, Carvalho TMU, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. Int J Biochem Cell Biol 2010; 2010:1-18
- [54] WHO. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2011.
- [55] Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet 2001; 1:92-100.
- [56] Dutra WO, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. Curr Opin Infec Dis 2008;21:287-292.
- [57] Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, et al. The trypanosomiasis. Lancet 2003;362:1469-480.
- [58] Brener Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1987;82:205-213.
- [59] Guhl F, Jaramillo C, Carranza, J, et al. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T rangeli*. Arch Med Res 2002;33:362-370.
- [60] Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in Chagas disease - a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101:463-491.

- [61] Dias E, Laranja FS, Miranda A, et al. Chagas' disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation* 1956; 14:1035-1060.
- [62] Umezawa ES, Luquetti AO, Levitus GP, et al Serodiagnosis of chronic and acute Chagas disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: result of a collaborative study in six Latin American countries. *J Clin Microbiol* 2004; 42:449-452.
- [63] Rezende JM, Rassi A. Involvement of the esophagus in Chagas' disease; megaesophagus & cardiopathy. *Hospital (Rio J)* 1958;53:1-15.
- [64] Marin Neto JA, Gallo L, Jr Manco JC, et al. Mechanisms of tachycardia on standing: studies in normal individuals and in chronic Chagas' heart patients. *Cardiovasc Res* 1980; 14:541-550.
- [65] Rassi AJr, Rassi A, Little WC. Chagas' Heart Disease. *Clin Cardiol* 2000; 23:883-889.
- [66] Andrade SG, Andrade ZA. Chagas' disease and neuron changes in Auerbach's plexus. (Experimental study in mice). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1966;8;219-224.
- [67] Andrade ZA, Andrade SG. Immunochemical study of experimental Chagas' disease. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1969;11:44-47.
- [68] Koberle F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 1968; 6:63-116.
- [69] Rezende JM. Forma digestiva da moléstia de Chagas. *Rev Goiana Med Goiânia* 1959;5:193-227.
- [70] Urbira, JÁ, Concepcion JL, Range S, et al. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 2002; 125: 35-45.
- [71] Cerecetto H, Gonzales M. Chemotherapy of Chagas disease: Status and new developments. *Curr Trop Med Chem* 2002;2:1187-1213.
- [72] Décourt LV, Sosa EA, Mady C. Forma indeterminada: conceito e aspectos fisiopatológicos. In: Cançado JR, Chuster M, editores. *Cardiopatia chagásica*. Belo Horizonte, Fundação Carlos Chagas, 1985.
- [73] Brener Z, Andrade ZA, Barral-neto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000.
- [74] Luquetti AO. Etiological treatment for Chagas disease. *Parasitol Today* 1997; 13:127-128.
- [75] LAFEPE. Disponível em: <<http://www.lafepe.pe.gov.br/LAFEPE/noticiario/09082007.html>>. Acesso em: 29 dez. 2012

- [76] Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* 2002; 3:1041-1047.
- [77] Bustamante JM, Novarese M, Rivarola HW, et al. Reinfections and *Trypanosoma cruzi* strains can determine the prognosis of the chronic chagasic cardiopathy in mice. *Parasitol Res* 2007;100:1407-1410.
- [78] Tarleton, RL. *Trypanosoma cruzi*- induced suppression of IL-12 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. *J Immunol* 1988;140:2769-2773.
- [79] Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, et al. The microbicidal activity of interferon- $\gamma$  treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ . *Euro J Immunol* 1992;22:2501.
- [80] Revelli F, Gomes L, Wietzerbim J, et al. Levels of tumor necrosis factor alpha, gamma interferon and interleukins 4, 6 and 10 as determined in mice infected with virulent or attenuated strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 1999; 85:147-150.
- [81] Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;114:103-110.
- [82] Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Massara RL, et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells balancing activated CD8<sup>+</sup> T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol* 2006; 145:81-92.
- [83] Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, et al. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:246-251.
- [84] Tarleton, RL. Regulation for immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol* 1991; 73:106-109.
- [85] Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JCP, et al. Chagasic Patients with Indeterminate Clinical Form of the Disease have High Frequencies of Circulating CD3<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> Natural Killer T Cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> Regulatory T Lymphocytes. *Scand J Immuno* 2005; 62:297-308.
- [86] Tarleton RL, Grusky MJ, Postan M, et al. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int. Immunol* 1996; 8:13-22.
- [87] Cuna WR, Cuna CR. Characterization of T cell clones from chagasic patients: predominance of CD8 surface phenotype in clones from patients with pathology. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995, 90:503-6.



- [88] Reis DD, Jones EM, Tostes S, et al. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49:192-200.
- [89] Schriefer A, Carvalho EM. Biomarcadores em medicina. *Gazeta Médica da Bahia* 2008; 78: 47-51
- [90] FIOCRUZ. Polimorfismos genéticos e suscetibilidade a cardiopatia Chagásica. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=96>. Acesso em 10 out. 2012.
- [91] Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro, Elsevier, 2005.
- [92] Vilches C, Parham P. KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptative immunity. *Ann Rev Immunol* 2002; 20:217-251.
- [93] Boyton RS, Altmann DM. Natural killer cells, killer Immunoglobulin-like receptors and human antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol* 2007;149:1-8.
- [94] Rajagopalan S, Long EO. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *JEM* 2005; 201:1025-1029.
- [95] Ljunggren HG, Karre K. In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11:237-244
- [96] Parham P. Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. *Molecular Immunology* 2005;42:459-462.
- [97] Bashirova AA, Martin MO, McVicar DW, et al. The Killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: turnig the genome for defense. *Annu Vev Genomics Hum Genet*, 2006;7:277-300.
- [98] Kikuchi-Maki A, Catina TL, Campbell KS. Cutting Edge: KIR2DL4 transduce signals into human NK cells through association with the Fc receptor  $\gamma$  protein. *J Immunol* 2005; 174:3859-3863.
- [99] IPD-KIR. Disponível em:< <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/stats.html>>. Acesso em: 6 out. 2012.
- [100] Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 2005; 3:201–214.
- [101] Gardiner C M. Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cells: the how, where and why. *Int J Immunogenet* 2007;35:1-8.
- [102] Gumperz JE, Valiante NM, Parham P, et al. Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human

histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibility complex haplotype. *J Exp Med.* 1996;183:1817-1827

[103] Young NT, Rust NA, Dallman MJ, et al. Independent contributions of HLA epitopes and killer inhibitory receptor expression to the functional alloreactive specificity of natural killer cells. *Hum Immunol* 1998; 59:700-71

[104] Carrington M, Norman P. The KIR gene cluster. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10135/pdf/TOC.pdf>>. Acesso em: 6 abr. 2011.

[105] Khakoo SI, Carrington M. KIR and disease: a model system or system of models? *Immunol Rev* 2006;214:186-201.

[106] Jiao YL, Ma CY, Wang LC, et al. Polymorphisms of KIRs gene and HLA-C alleles in patients with ankylosing spondylitis: possible association with susceptibility to the disease. *J Clin Immunol* 2008;28:343-349.

[107] Levinson RD, Du Z, Luo L, et al. KIR and HLA gene combinations in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Hum Immunol* 2008; 69:349-353.

[108] Martin MP, Gao X, Lee JH, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Gen* 2002; 31:429-434.

[109] López-Vazquez A, Rodrigo L, Martínez-Borra M, et al. Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with Hepatitis C Virus infection. *J. Infect Dis* 2005; 192:162-165.

[110] Guadieri S, DeSantis D, McKinnon E, et al. Killer immunoglobulin-like receptors and HLA act both independently and synergistically to modify HIV disease progression. *Genes Immun* 2005;6:683-690.

[111] Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004; 305:872-874.

[112] Méndez A, Granda H, Meenagh A, et al. Study of KIR genes in tuberculosis patients. *Tissue Antigens* 2006; 68:386-389.

[113] Franceschi DAS, Mazini OS, Rudnick CCC, et al. Association between killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genotypes and leprosy in Brazil. *Tissue Antigens* 2008; 72:478-482.

[114] Marangon AV, Silva GF, de Moraes CF, et al. KIR genes and their human leukocyte antigen ligands in the progression to cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hum Immunol* 2011; 72:1074-1078.

[115] Taniguchi M, Kawabata M. KIR3DL1/S1 genotypes and KIR2DS4 allelic variants in

the AB KIR genotypes are associated with Plasmodium-positive individuals in malaria infection. *Immunogenetics* 2009; 61:717-730.

[116] Yindom LM, Forbes R, Aka P, et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptors and malaria caused by Plasmodium falciparum in The Gambia. *Tissue Antigens* 2012; 79:104-113.

[117] Yen JH, Moore BE, Nakajima, T, et al. Major Histocompatibility Complex class I recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 2001; 193:1159-1168.

[118] Van der Slik AR, Koelman BP, Verduijn W, et al. KIR in type I diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cells receptor in patients *versus* HLA-matched control subjects. *Diabetes* 2003; 52:2639-2642.

[119] Lorentzen AR, Karlsen TH, Olsson M, et al. Killer Immunoglobulin-like Receptor Ligand HLA-Bw4 Protects Against Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* 2009;65:658-666.

[120] Jobim M, Chagastelles P, Salim PH, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigen-C genotypes in South Brazilian with type 1 diabetes. *Hum Immunol* 2010;71:799-803.

[121] Kulkarni S, Martin M, Carrington P. M. The Yin and Yang of *HLA* and *KIR* in human disease. *Semin Immunol* 2008; 20:343-352.

[122] Bonagura VR, Du Z, Ashouri E, et al. Activating killer cell immunoglobulin-like receptors 3DS1 and 2DS1 protect against developing the severe form of recurrent respiratory papillomatosis. *Hum Immunol* 2010;71:212-219.

[123] Franceschi DAS, de Souza CA, Aranha FJ, et al. Importance of immunoglobulin-like receptors in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011; 33:126-139.

[124] Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, et al. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 2004;200:957-965.

## **CAPÍTULO II**

**Artigo: “ASSOCIAÇÃO DOS GENES KIR E SEUS LIGANTES HLA COM O DESENVOLVIMENTO DA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA”**

**ASSOCIAÇÃO DOS GENES KIR E SEUS LIGANTES HLA COM O  
DESENVOLVIMENTO DA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA**

*Laboratório de Imunogenética, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade  
Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.*

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Av.  
Colombo, 5790. Zona 07. Maringá, PR, CEP: 87020-900, Brasil. Tel.: (44) 3011-4847.

## RESUMO

A proposta deste estudo foi investigar a influência dos genes KIR e seus ligantes HLA no desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica. Participaram desta pesquisa 124 pacientes sorologicamente diagnosticados com doença de Chagas (57 homens e 67 mulheres, com idade média de 60,2 anos  $\pm$  9,9) atendidos pelo Hospital Universitário de Londrina e pelo Laboratório de Doença de Chagas da Universidade Estadual de Maringá e 163 indivíduos saudáveis, cônjuge dos pacientes ou doadores de sangue do Hemocentro Regional de Maringá (94 homens e 69 mulheres, com idade média 49,3 anos  $\pm$  6,1). A genotipagem dos genes KIR e dos ligantes HLA foi realizada pela técnica de PCR-SSOP reversa. Os pares KIR2DL2-C1/C2 (16,1% vs 29,4%;  $P=0,012$ ; OR=0,46; IC=0,24–0,85) e KIR3DL2-A3/11 (20,6% vs 31,9%;  $P=0,035$ ; OR=0,53; IC=0,29–0,96) foram menos frequentes em pacientes do que em controles. A combinação KIR2DS2+/2DL2-/C1+ foi mais frequente em pacientes (11,3% vs 4,3%;  $P=0,042$ ; OR=2,83; IC=1,02–1,55) e na doença de Chagas com comprometimento cardíaco (17,1% vs 4,3%;  $P=0,001$ ; OR=4,58; IC=1,26–16,3) quando comparados aos controles. A combinação KIR2DS2+/2DL2-/KIR2DL3+/C1+ também foi associada positivamente à doença de Chagas (10,5% vs 6,7%;  $P=0,039$ ; OR=3,06; IC=1,13–8,30) e à cardiopatia chagásica crônica (14,6% vs 3,7%;  $P=0,021$ ; OR=4,48; IC=1,36–14,73). A combinação iKIR-HLA foi associada a proteção à agressão tecidual ao contrário da ligação aKIR-HLA. Assim, a citotoxicidade das células NK, mediada pelos receptores KIR e ligantes HLA, pode contribuir no desenvolvimento das lesões teciduais observadas na cardiopatia chagásica crônica.

**Palavras-chave:** Receptores KIR. Antígenos HLA. Doença de Chagas, Estudo de associação genética.

## 1. Introdução

A cardiopatia chagásica crônica constitui a manifestação clínica mais grave da doença de Chagas, sendo encontrada em aproximadamente 30% dos indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* [1]. Esta complicação ocorre com maior frequência em pessoas com idades entre 20-59 anos, época mais produtiva de suas vidas, e, em áreas endêmicas, representa a principal causa de incapacidade e mortalidade [2]. A doença manifesta-se por insuficiência cardíaca, transtornos do ritmo dos batimentos e da condução elétrica, fenômenos tromboembólicos e morte súbita. Pacientes portadores desta forma clínica apresentam miocardite usualmente intensa e difusa, sendo acompanhados de cardiomegalia, lesões vasculares e fibrose [3,4].

Os danos ao tecido cardíaco levaram à proposição de fenômenos que podem estar associados aos mecanismos patogênicos da cardiopatia chagásica crônica [5-8], dentre os quais destacam-se os mecanismos de autoimunidade, uma vez que o agente infeccioso pode mimetizar antígenos próprios, induzir proliferação de células autorreativas ou aumentar, nas células infectadas, a expressão de moléculas HLA e de moléculas coestimulatórias [9].

O processo inflamatório na fase crônica da doença de Chagas apresenta sinais de atividade celular e os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> são as principais células encontradas no tecido cardíaco, entretanto as células NK (*natural killer*), macrófagos e linfócitos B também estão presentes em menor número [5,10]. Na doença de Chagas crônica assintomática ou indeterminada, a presença de células NK circulantes (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> e CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>), somada à presença de células imunorreguladoras (Treg- CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup>, e NKT- CD3<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>) ou macrófagos-like (CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>), são responsáveis pelo controle da parasitemia e da agressão tecidual. No entanto, falha nos mecanismos de imunorregulação, com níveis basais de células NK, NKT e CD4<sup>+</sup> CD25<sup>HIGH</sup>, associada à maior expressão de células T CD8<sup>+</sup> ativadas estão associadas com os eventos de comprometimento cardíaco [11-13].

A função das células NK é regulada por um balanço de sinais de ativação e inibição mediados por um conjunto diversificado de receptores expressos em sua superfície, entre eles, os receptores KIR [14]. Os receptores KIR reconhecem moléculas HLA de classe I, presentes na superfície das células-alvo [15], e a ausência ou a diminuição da expressão das moléculas HLA faz com que a ação das células NK seja efetiva sobre as células-alvo [16].

Os genes KIR são responsáveis por codificar os receptores KIR (*Killer immunoglobulin-like receptors*) das células NK. Esses genes apresentam alto polimorfismo, o qual pode contribuir para a ocorrência de diferentes respostas imunológicas e clínicas a uma mesma doença numa população [17]. Vários estudos constataram a participação de genes KIR e seus ligantes em doenças infecciosas, tais como a AIDS [18,19], hepatite C [20,21], tuberculose [22,23], hanseníase [24] e malária [25,26] doenças autoimunes ou inflamatórias como a psoríase, escleroderma, vasculite reumatoide [27-29] e ainda em muitos tipos de câncer [30-32] e transplantes [33]. Contudo, ainda há poucos dados disponíveis sobre o papel dos genes KIR na imunopatogênese da doença de Chagas [34].

O objetivo do presente estudo foi investigar a influência dos genes de resposta imune KIR e seus ligantes HLA na resistência ou suscetibilidade à doença de Chagas, bem como no desenvolvimento da forma cardíaca.

## **2. Materiais e métodos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (COPEP-UEM) segundo parecer 012/2010, CAAE 0296.0.093.000-09.

### **2.1. Casuística**

Participaram desta pesquisa 124 indivíduos não aparentados (57 homens e 67 mulheres, com idade média de 60,2 anos  $\pm$  9,9) com diagnóstico sorológico confirmado para doença de Chagas crônica, residentes em diferentes municípios do norte/noroeste do Estado do Paraná, atendidos pelo Hospital Universitário de Londrina e pelo Laboratório de Doença de Chagas da Universidade Estadual de Maringá, constituindo assim o grupo de pacientes (P). O grupo controle (C) foi constituído por 163 indivíduos saudáveis e não aparentados, cônjuge dos pacientes ou doadores de sangue do Hemocentro Regional de Maringá (94 homens e 69 mulheres, com idade média de 49,3  $\pm$  6,1) provenientes da mesma área geográfica dos pacientes e cujo exame sorológico para detecção de anticorpos contra doença de Chagas resultou em negativo. O grupo étnico dos pacientes com a doença de Chagas e dos controles



saudáveis foram branco, mulato e negro, mas devido à grande miscigenação existente no Brasil, pacientes e controles foram classificados como uma população de grupo étnico misto, levando em consideração a composição da população do Paraná, segundo Probst *et al.* [35].

Os critérios para inclusão dos indivíduos no grupo de pacientes foram: apresentar diagnóstico laboratorial positivo para doença de Chagas e estar na fase crônica da doença, enquanto que para o grupo controle, os critérios de inclusão foram: diagnóstico laboratorial negativo para doença de Chagas e serem provenientes da mesma área geográfica dos pacientes. As características dos pacientes e controles estão apresentadas na Tabela 1.

## 2.2. Sorologia para *T.cruzi*

O diagnóstico laboratorial para a doença de Chagas foi realizado pelo Hemocentro Regional de Maringá por meio da reação de ELISA (ensaio imunoenzimático) em soro ou plasma, conduzida com reagentes para ensaio imunoenzimático “Chagas” da Abbott Laboratories (Santiago, Chile) seguindo as instruções do fabricante. A leitura das microplacas foi feita em equipamento semi-automatizado (ASYS Expert Plus, Cambrige, UK). Em casos de resultados fraco reagente, foi realizada a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) da Wama diagnóstica (São Carlos, Brasil).

## 2.3. Diagnóstico cardiológico

Os pacientes foram classificados em dois subgrupos distintos de acordo com as alterações observadas no exame de eletrocardiograma *standard* ou convencional em repouso. Do total de 124 pacientes (grupo P), 41 (33,1%) foram considerados como tendo cardiopatia chagásica crônica (grupo CCC), por apresentarem alterações características da doença de Chagas, como Bloqueio de Ramo Direito, Bloqueio Divisional Ântero-Superior, Alterações Difusas da Repolarização Ventricular e Extrassistolia Ventricular e Supra Ventricular, e 83 indivíduos (66,9%) foram considerados como não tendo cardiopatia (grupo NC) (Tabela 1).

## 2.4. Genotipagem KIR e HLA

O DNA de todas as amostras foi extraído por meio do método *salting out* adaptado por Cardozo et al. [36]. A concentração e a pureza do DNA foram verificadas por meio do aparelho NanoDrop 2000<sup>®</sup> (Thermo Scientific).

Para a genotipagem dos genes KIR e dos ligantes HLA dos pacientes e controles, utilizou-se a técnica de PCR-SSOP (*polymerase chain reaction - sequence specific of oligonucleotides probes*) reversa, com a tecnologia Luminex (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA). A hibridização foi verificada por meio de um citômetro de fluxo (LABScan<sup>™</sup> 100 *flow analyzer*) e os dados foram interpretados por um programa computacional (HLA Fusion 2.0 Research, One Lambda).

## 2.5. Análise estatística

As frequências gênicas foram obtidas por contagem direta e para avaliar se a distribuição dos genes encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado o programa Arlequin versão 3.1. As comparações das frequências de genes KIR e de KIR com seus ligantes HLA, entre pacientes e controles, foram realizadas pelo teste do qui-quadrado com correção de Yates ou Teste Exato de Fisher. O risco dos indivíduos portadores de determinados genes KIR e de KIR-HLA em desenvolver a cardiopatia chagásica crônica foi calculado por meio da determinação de OR (*Odds Ratio*) e do intervalo de confiança de 95%. As análises foram executadas utilizando o programa Open Epi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, versão 2.3.1 (<http://www.openepi.com/OE2.3/Menu/OpenEpiMenu.htm>). Os valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 3. Resultados

A distribuição das frequências dos genes KIR para os controles (grupo C), para os subgrupos de pacientes (NC e CCC) e para o grupo total de pacientes com a doença de Chagas (P) está apresentada no gráfico 1. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada na distribuição dos genes KIR entre os grupos analisados. Os genes moldura ou *framework* *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e *KIR3DP1* estavam presentes em todas as amostras.

As frequências dos ligantes dos receptores KIR, moléculas HLA de classe I, foram semelhantes entre os grupos, exceto para as especificidades HLA-A3 e/ou A11, ligantes de KIR3DL2, que estavam diminuídas em pacientes (20,2% vs 31,9% ;  $P = 0,036$ ; OR = 0,53; IC= 0,26 – 0,96) quando comparadas com controles (Tabela 2).

Na Tabela 3 estão reunidas as frequências dos pares KIR-HLA. Os genes inibidores *KIR2DL2*, na presença do seu ligante em heterozigozidade (*KIR2DL2-C1/C2*) (16,1% vs 29,4% ;  $P = 0,012$ ; OR = 0,46; IC = 0,24 – 0,85), e o par *KIR3DL2-A3/11* (20,6% vs 31,9%;  $P = 0,035$ ; OR = 0,53; IC = 0,29 – 0,96) foram menos frequentes em pacientes em relação aos controles.

A correlação entre a distribuição de KIR ativadores e inibidores e seus respectivos ligantes HLA do grupo C está apresentada na tabela 4. Um aumento significativo na frequência da combinação *KIR2DS2+/2DL2-/C1+* foi observado no grupo de pacientes (11,3% vs 4,3%;  $P = 0,042$ ; OR = 2,83; IC = 1,02 – 1,55) e no grupo CCC (17,1% vs 4,3%;  $P = 0,001$ ; OR = 4,58; IC = 1,26 – 16,3) quando comparado aos controles. A tabela 5 traz a correlação entre KIR e seus ligantes HLA. O par *KIR2DS2+/2DL2-/C1+*, na presença de *KIR2DL3*: *KIR2DS2+/2DL2-/KIR2DL3+/C1+*, permaneceu mais frequente nos pacientes com doença de Chagas e nos pacientes com cardiopatia (10,5% vs 6,7%;  $P = 0,039$ ; OR = 3,06; IC = 1,13 – 8,30 e 14,6% vs 3,7%;  $P = 0,021$ ; OR = 4,48; IC = 1,36 – 14,73, respectivamente). Ao contrário, o par *KIR3DL2+/A3+A11+* apresentou menor frequência em pacientes (20,2% vs 31,9%;  $P = 0,036$ ; OR = 0,54; IC = 0,31 – 0,93) do que no grupo controle.

Com relação aos haplótipos KIR, não houve diferença estatisticamente significante entre os haplótipos AA e BX na comparação entre os grupos, e o haplótipo BX foi o mais frequente entre ambos.

#### 4. Discussão

De acordo com a revisão de literatura este é o primeiro estudo a abordar a importância dos genes KIR e seus ligantes HLA em relação à doença de Chagas e sua forma clínica cardíaca. A identificação dos pares KIR com seus ligantes HLA como candidatos à

suscetibilidade ou proteção à doença de Chagas traz implicações importantes para uma melhor compreensão do papel das células NK na imunopatogênese desta doença.

A distribuição das frequências dos genes KIR foi semelhante entre pacientes com a doença de Chagas e controles. As frequências dos genes KIR nas populações estudadas foram semelhantes com as frequências encontradas no estudo feito por Rudnick et al. [37] em indivíduos da população norte/noroeste do Paraná (dados não mostrados).

Apesar de não terem sido verificadas diferenças na distribuição dos genes KIR entre pacientes e controles foi encontrada uma tendência de aumento da frequência do gene *KIR2DL5* em indivíduos do grupo NC quando comparados com o grupo CCC (59,0% vs 41,4%) e, possivelmente, *KIR2DL5* poderia estar exercendo papel protetor ao desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica. Alguns estudos anteriores comprovam a associação deste gene com a proteção contra o vírus da hepatite B juntamente com o *KIR2DS1* [38], com a suscetibilidade à Espondilite Anquilosante junto com os genes *KIR3DS1* e *KIR2DS5* [39] e com um menor risco de desenvolver Lúpus Eritematoso Sistêmico bem como um aumento do risco desses pacientes desenvolverem eventos infecciosos [40].

O extenso polimorfismo dos genes KIR pode conferir a possibilidade de efeitos pleiotrópicos em diferentes doenças, isto é, um gene KIR que confere proteção contra uma doença pode predispor à outra [41]. O ligante para o gene *KIR2DL5* ainda permanece indefinido mas ele é considerado um gene de função inibidora pois possui duas ITIMs (motivos baseados em tirosina) na região citoplasmática [42].

Os genes KIR foram analisados na presença dos seus respectivos ligantes HLA. Os genes HLA de classe I estão localizados no cromossomo 6 e os genes KIR no cromossomo 19, o que permite uma herança e expressão independente de ambos. A segregação independente desses genes, somada à alta especificidade de KIR por determinados alótipos HLA, possibilita a expressão de moléculas KIR para as quais o ligante HLA não está presente, ou vice-versa, o que resulta na ausência de funcionalidade das células NK pela falta de sinalização [43]. Além disso, dependendo da combinação de genes KIR e ligantes HLA, as células NK podem apresentar vários níveis de resposta, como o excesso de inibição ou ativação, balanço entre inibição e ativação ou, até mesmo, um comportamento indeterminado.

Esses níveis de respostas estão associados principalmente com os ligantes HLA do grupo C [44,45].

Neste estudo, *KIR2DL2* na presença do ligante HLA-C1 foi significativamente menos frequente em pacientes do que em controles. Somado a este fato, pacientes com cardiopatia chagásica crônica apresentaram menor frequência do par *KIR2DL2* com o ligante C1 em homozigose (*KIR2DL2-C1C1*) em relação ao grupo sem comprometimento cardíaco (4,9% vs 18,1%), embora não significante estatisticamente. Quando *KIR2DL2* foi analisado separadamente do seu ligante diferenças não foram observadas entre os grupos avaliados, o que evidencia a importância da presença dos ligantes HLA específicos na função efetora das células NK. Os resultados obtidos indicaram resistência à doença de Chagas e ao desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica entre os pacientes que apresentam o par *KIR2DL2-C1*, ou seja, maior inibição das células NK relaciona-se a uma menor agressão tecidual e consequente proteção às manifestações cardíacas. Em outros estudos *KIR2DL2-C1* foi associado com a proteção da Leucemia Mielóide Crônica [46] e da Esclerose Sistêmica [47].

*KIR3DL2* com o ligante HLA-A3/11 também foi menos frequente em pacientes que em controles. *KIR3DL2* é um gene *framework*, ou seja, está presente em quase todos os haplótipos e, neste estudo, a frequência dos ligantes HLA-A3/A11 também foi menor em pacientes em relação aos controles: assim a diferença na frequência deste par KIR inibidor - HLA pode estar relacionado à diferença nas frequências dos ligantes HLA-3/11.

Em relação à combinação dos pares KIR e ligantes, a combinação *KIR2DS2+/2DL2-/C1+* foi mais frequente em pacientes chagásicos e, dentre estes, naqueles que manifestavam cardiopatia chagásica crônica, quando ambos foram comparados ao grupo controle. Resultado similar também foi encontrado por Momot et al. [28] com relação ao desenvolvimento da esclerodermia e por Lowe et al. [48] com a manifestação da Síndrome de Sjögren. Em adição, *KIR2DS2+/2DL2-/C1+* na presença de *KIR2DL3* (*KIR2DS2+/2DL2-/KIR2DL3+/C1+*) também foi significativamente mais frequente em pacientes e em CCC quando comparados aos controles.

Os resultados encontrados nesse estudo indicam uma possível suscetibilidade entre o KIR ativador 2DS2 e seu respectivo ligante C1, na ausência de *KIR2DL2* e na ausência ou presença de *KIR2DL3*, com o desenvolvimento da doença de Chagas e da cardiopatia

chagásica crônica. O par KIR2DL2-C1 exerce grande força de inibição sobre as células NK e sinais inibitórios mais fracos à célula efetora são exercidos pelo par KIR2DL3- HLA-C1 [49]. Embora para alguns receptores KIR, o mesmo ligante tenha afinidade aos receptores de ativação (-DS) ou de inibição (-DL) das células NK, o mesmo ligante possui mais afinidade pelo KIR inibidor do que para seu homólogo ativador [44]. Assim, na ausência do KIR inibidor na superfície das células NK, o ligante HLA do grupo C se ligará aos receptores ativadores, o que levará à função efetora da célula NK e, conseqüentemente, a maior lesão tecidual, predispondo à doença e às manifestações autoimunes da cardiopatia chagásica crônica. Embora a combinação KIR2DS2+/2DL2-/KIR2DL3+/C1+ apresente um KIR ativador e outro inibidor os sinais de ativação gerados por KIR2DS2+/C1+ parecem estar sobressaindo aos sinais de inibição gerados por KIR2DL3+/C1+.

Os genes *KIR2DL2* e *KIR2DS2* estão em forte desequilíbrio de ligação e isso foi observado entre pacientes ( $\Delta^2=0,1470$ ;  $p=0,008$ ) e controles ( $\Delta^2=0,4344$ ;  $p=0,0002$ ). Contudo, nesse estudo foram observados oito controles (4,9%) e seis pacientes (4,8%) onde apenas o *KIR2DL2* estava presente, e dez controles (6,1%) e dezessete pacientes (13,7%) que possuíam o gene *KIR2DS2* (ativador) sem o inibidor *KIR2DL2*. Entre os subgrupos de pacientes, três com cardiopatia (7,3%) e três sem cardiopatia (3,6%) apresentam somente o *KIR2DL2*, enquanto que em oito pacientes com cardiopatia (19,5%) e nove pacientes sem cardiopatia (10,8%) apenas o gene *KIR2DS2* estava presente. Assim, genótipos que excluem o KIR inibidor 2DL2, em combinação com os ligantes HLA do grupo C1 pode ser um dos principais fatores-chave à imunopatologia, mediada por NK, da doença de Chagas e sua forma cardíaca.

A resposta imunológica durante a infecção por *T. cruzi* determina o desenvolvimento das diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas: ela está associada tanto a patogênese quanto aos eventos protetores que controlam o dano tecidual [12]. Vários estudos demonstram que há um aumento na frequência das células NK circulantes nos pacientes chagásicos crônicos e que a ativação descontrolada das células NK e de monócitos pró-inflamatórios podem também conduzir a danos no tecido, o que leva ao desenvolvimento da doença crônica grave [12-14].

Neste estudo, a atividade das células NK, mediada por seus receptores KIR e ligantes HLA, foi avaliada em pacientes com a doença de Chagas crônica com ou sem manifestações

cardíacas. Indivíduos que apresentaram o par KIR inibidor KIR2DL2-C1 foram resistentes ao desenvolvimento da doença de Chagas e da cardiopatia chagásica crônica. No entanto, indivíduos com a ausência do gene KIR2DL2, e conseqüentemente de sua expressão nas células NK, mas que possuem o par KIR ativador KIR2DS2-C1 foram suscetíveis à doença chagásica crônica e ao comprometimento cardíaco. Assim, possíveis mecanismos relacionados à resistência a doença foram mediados pela inibição de NK, via KIR2DL2-C1. Ao contrário, a ativação de NK mediada pelo receptor KIR2DS2-C1 na ausência de KIR2DL2 foi relacionada à agressão tecidual. A cardiopatia chagásica crônica tem sido associada à autoimunidade [5,9,50] e os resultados deste estudo corroboram com este mecanismo imunopatogênico na cardiopatia crônica.

## **5. Conclusão**

O receptor ativador KIR2DS2 e seu ligante HLA do grupo C1, está associado a suscetibilidade à doença de Chagas e à cardiopatia chagásica crônica; ao contrário, a ligação do KIR inibidor com seu ligante HLA (KIR2DL2-HLA-C1) está relacionada à proteção à agressão tecidual. Assim, a citotoxicidade das células NK, mediada pelos receptores KIR e ligantes HLA, pode contribuir no desenvolvimento das lesões teciduais observadas na cardiopatia chagásica crônica.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem a todos os voluntários que participaram deste estudo, ao Hemocentro Regional de Maringá, aos Hospitais Universitários de Maringá e Londrina e ao Laboratório de Doença de Chagas da UEM. Este estudo recebeu suporte financeiro da Fundação Araucária do Estado do Paraná, da CAPES e do Laboratório de Imunogenética UEM.

## **Referências**

- [1] Brener Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1987; 82:205-213.
- [2] Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its Discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104:31-40.

- [3] Marin Neto JA, Gallo L, Jr Manco JC, et al. Mechanisms of tachycardia on standing: studies in normal individuals and in chronic Chagas' heart patients. *Cardiovasc Res* 1980; 14:541-550.
- [4] Rassi AJr, Rassi A, Little WC. Chagas' Heart Disease. *Clin Cardiol* 2000; 23:883–889.
- [5] Reis DD, Jones EM, Tostes S, et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- $\alpha$ + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 637-644.
- [6] Jones EM, Colley DG, Tostes S, et al. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from 108 inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48:348-357.
- [7] Higuchi ML, Gutierrez PS, Aiello VD. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat* 1993; 423: 157-160.
- [8] Rossi MA, Tanowitz HB, Malvestio LM, et al. Coronary microvascular disease in chronic Chagas cardiomyopathy including an overview on history, pathology, and other proposed pathogenic mechanisms. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:674
- [9] Cooke A, Zaccone P, Raine T, et al. Infection and autoimmunity: are we winning the war, only to lose the peace? *Trends Parasitol*. 2004;20:316-321.
- [10] Higuchi, M. D.; Ries, M.M.; Aiello, V.D.; et al. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 5:485-489.
- [11] Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JCP, et al. Chagasic Patients with Indeterminate Clinical Form of the Disease have High Frequencies of Circulating CD3<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> Natural Killer T Cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> Regulatory T Lymphocytes. *Scand J Immuno* 2005; 62:297–308.
- [12] Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Massara RL, et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells balancing activated CD8<sup>+</sup> T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol* 2006; 145:81–92.
- [13] Sathler-Avelar R., Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, et al. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 246-251.
- [14] Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro, Elsevier, 2005.
- [15] Vilches C, Parham P. KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptative immunity. *Ann Rev Immunol* 2002; 20:217-251.
- [16] Ljunggren HG, Karre K. In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11:237-244.



- [17] Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, et al. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 1999; 180:1429-1435.
- [18] Martin MP, Gao X, Lee JH, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Gen* 2002; 31:429-434.
- [19] Alter G, Martin MP, Teigen N, et al. Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J Exp Med* 2007; 204:3027-3036.
- [20] Montes-Cano MA, Caro-Oleas JL, Romero-Gómez M, Diago M, Andrade R, Carmona I, Aguilar Reina J, Nunez-Roldan A, Gonzalez-Escribano MF. HLA-C and KIR genes in hepatitis C virus infection. *Hum immunol* 2005; 66:1106-1109.
- [21] Marangon AV, Silva GF, de Moraes CF, et al. KIR genes and their human leukocyte antigen ligands in the progression to cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hum Immunol* 2011; 72:1074-1078.
- [22] Méndez A, Granda H, Meenagh A, et al. Study of KIR genes in tuberculosis patients. *Tissue Antigens* 2006; 68:386-389.
- [23] Lu C, Shen YJ, Deng YF, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with pulmonary tuberculosis in Chinese Han. *Genet Mol Res* 2012; 11:1370-1378.
- [24] Franceschi DAS, Mazini OS, Rudnick CCC, et al. Association between killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genotypes and leprosy in Brazil. *Tissue Antigens* 2008; 72:478-482.
- [25] Taniguchi M, Kawabata M. KIR3DL1/S1 genotypes and KIR2DS4 allelic variants in the AB KIR genotypes are associated with Plasmodium-positive individuals in malaria infection. *Immunogenetics* 2009; 61:717-730.
- [26] Yindom LM, Forbes R, Aka P, et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptors and malaria caused by Plasmodium falciparum in The Gambia. *Tissue Antigens* 2012; 79:104-113.
- [27] Luszczek W, Manczak M, Cislo M, et al. Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *Hum Immunol* 2004; 65:758-766.
- [28] Momot T, Koch S, Hunzelmann N, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1561-1565.
- [29] Yen JH, Moore BE, Nakajima, T, et al. Major Histocompatibility Complex class I recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 2001; 193:1159-1168.
- [30] Carrington M, Wang S, Martin MP, et al. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med* 2005; 201:1069-1075.

- [31] Ashouri E, Dabbaghmanesh MH, Rowhanirad S, et al. Activating KIR2DS5 receptor is a risk for thyroid cancer. *Hum Immunol* 2012; 73:1017-1022.
- [32] Wiśniewski A, Jankowska R, Passowicz-Muszyńska E, et al. KIR2DL2/S2 and HLA-C C1C1 genotype is associated with better response to treatment and prolonged survival of patients with non-small cell lung cancer in a Polish Caucasian population. *Hum Immunol* 2012; 73:927-931.
- [33] Franceschi DAS, de Souza CA, Aranha FJ, et al. Importance of immunoglobulin-like receptors in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011; 33:126-139.
- [34] Hermann E, Berthe A, Truyens C, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor expression induction on neonatal CD8(+) T cells in vitro and following congenital infection with *Trypanosoma cruzi*. *Immunology* 2010; 129:418-426.
- [35] Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, et al. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. *Hum Biol* 2000; 72:597-617.
- [36] Cardozo DM, Guelsin GA, Clementino SL, et al. Extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem de antígenos leucocitários humanos e de receptores semelhantes à imunoglobulina. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42: 651-56.
- [37] Rudnick CCC, Franceschi DSA, Marangon AV, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Southern Brazilian population from the state of Paraná. *Hum Immunol* 2008;69:872-6.
- [38] Zhi-ming L, Yu-lian J, Zhao-lei F, et al. Polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptor gene: possible association with susceptibility to or clearance of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *Croat Med J* 2007; 48: 800-806.
- [39] Díaz-Peña R, Blanco-Gelaz MA, Suárez-Alvarez B, et al. Activating KIR genes are associated with ankylosing spondylitis in Asian populations. *Hum Immunol*. 2008; 69:437-42.
- [40] Kimoto Y, Horiuchi T, Tsukamoto H, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL5 with systemic lupus erythematosus and accompanying infections. *Rheumatology (Oxford)*. 2010; 49:1346-53.
- [41] Carrington M, Norman P. The KIR gene cluster. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10135/pdf/TOC.pdf>> Acesoo em: 6 de abr. 2011.
- [42] Estefania E, Flores R, Gomez-Lozano N, et al. Human KIR2DL5 is a inhibitory receptor expressed on the surface of NK and T lymphocyte subsets. *J Immunol* 2007;178:4402-10.
- [43] Kulkarni S, Martin M, Carrington P. M. The Yin and Yang of *HLA* and *KIR* in human disease. *Semin Immunol* 2008; 20:343-352.
- [44] Williams AP, Bateman AR, Khakoo SI. Hanging in balance. *KIR* and their role in disease. *Mol Interv* 2005;5:226-46.

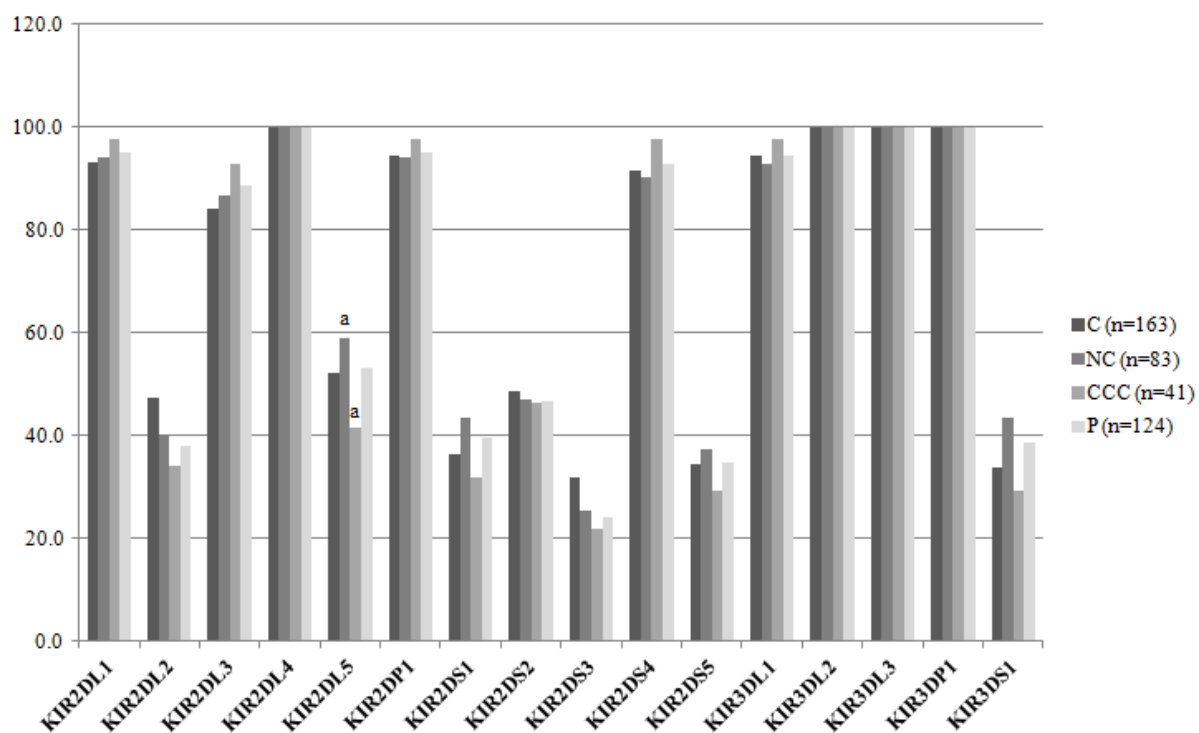
- [45] Nelson GW, Martin MP, Gladman D, et al. Cutting edge: Heterozygote advantage in autoimmune disease: Hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol* 2004;173:4273–6.
- [46] Middleton D, Diler AS, Meenagh A, et al. Killer immunoglobulin-like receptors (KIR2DL2 and/or KIR2DS2) in presence of their ligand (HLA-C1 group) protect against chronic myeloid leukaemia. *Tissue Antigens* 2009; 73:553-60.
- [47] Salim PH, Jobim M, Bredemeier M, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes insystemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2010; 160: 325–330.
- [48] Lowe DP, Cook MA, Bowman SJ, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with primary Sjogren’s syndrome. *Rheumatology (Oxf)* 2009; 48:359–62.
- [49] Bashirova AA, Martin MP, McVicar DW, et al. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006; 7:277-300.
- [50] Cunha-Neto E, Teixeira PC, Nogueira LG, et al. New concepts on the pathogenesis of chronic Chagas cardiomyopathy: myocardial gene and protein expression profiles. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;39:59-62.

**Tabela 1.** Características dos indivíduos controles, pacientes com doença de Chagas e seus subgrupos sem e com comprometimento cardíaco.

Características	Controles (C)	Pacientes (P)	NC	CCC	P
	n=163	n= 124	n=83	n=41	
Idades (anos)					
Média	49,3 ± 6,1	60,2 ± 9,9	58,5 ± 9,8	65 ± 10,9	
Gênero n (%)					
Feminino	69 (42,3)	67 (54,0)	49 (59,0)	18 (43,9)	P=0,064
Masculino	94 (57,7)	57 (46,0)	34 (41,0)	23 (56,1)	
Grupo Étnico* n (%)					
Branco	116 (71,2)	90 (72,6)	59 (71,1)	31 (75,6)	P=0,895
Mulato	37 (22,7)	22 (17,1)	16 (19,3)	6 (14,6)	P=0,377
Negro	10 (6,1)	12 (9,7)	7 (8,4)	5 (12,2)	P=0,371
Cardiopatía n (%)					
Positivo		41 (33,1)			
Negativo		83 (66,9)			

\* População mista (branco+mulato+negro) totalizando 163 controles e 124 pacientes.

**Gráfico 1.** Distribuição dos genes KIR em controles saudáveis, subgrupo de pacientes sem e com comprometimento cardíaco, e total de pacientes.



C: controles, NC: não cardiopatas, CCC: indivíduos com cardiopatia chagásica crônica, P: pacientes

<sup>a</sup>  $P = 0,098$ ; OR = 0,49; IC = 0,22 – 1,05

**Tabela 2.** Comparação das frequências dos ligantes de KIR, HLA de classe I, em controles saudáveis, pacientes com doença de Chagas e seus subgrupos sem e com comprometimento cardíaco.

Ligantes HLA	C	P	NC	CCC
	n=163 (%)	n=124 (%)	n=83 (%)	n=41 (%)
A3 e/ou A11	52 (31,9) <sup>a</sup>	25 (20,2) <sup>a</sup>	18 (21,7)	7 (17,1)
Bw4	115 (70,6)	92 (74,2)	60 (72,3)	32 (78,0)
C1C2	89 (54,6)	55 (45,8)	34 (41,0)	21 (51,2)
C1C1	44 (27,0)	46 (38,3)	32 (38,6)	14 (34,1)
C2C2	30 (18,4)	23 (19,2)	17 (20,5)	6 (14,6)

C: controles, P: pacientes, NC: não cardiopatas, CCC: indivíduos com cardiopatia chagásica crônica.

<sup>a</sup>  $P = 0,036$ ; OR = 0,54; IC = 0,31 – 0,93

Bw4= HLA-A23, 24, 32

Bw4 = HLA-B08, 13, 27, 37, 44, 51, 52, 53, 57, 58

Grupo C1 = HLA-C01, 03, 07, 08, 12, 14, 16

Grupo C2 = HLA-C02, 04, 05, 06, 07, 15, 17, 18

**Tabela 3.** Comparação entre as frequências de KIR e seus respectivos ligantes HLA em controles saudáveis, pacientes com doença de Chagas e seus subgrupos com e sem comprometimento cardíaco.

Genes KIR - ligantes HLA	C	P	NC	CCC
	n=163 (%)	n=124 (%)	n=83 (%)	n=41 (%)
2DL1-C2	80 (49,1)	54 (43,5)	34 (41,0)	20 (48,8)
2DL2-C1	48 (29,4) <sup>a</sup>	20 (16,1) <sup>a</sup>	11 (13,3)	9 (22,0)
2DL3-C1	73 (44,8)	52 (41,9)	32 (38,6)	20 (48,8)
3DL2-A3/A11	52 (31,9) <sup>b</sup>	25 (20,2) <sup>b</sup>	18 (21,7)	7 (17,1)
3DL1-Bw4	109 (66,9)	88 (71,0)	57 (68,7)	31 (75,6)
2DS1-C2	33 (20,2)	24 (19,4)	17 (20,5)	7 (17,1)
2DS2-C1	48 (29,4)	25 (20,2)	14 (16,9)	11 (26,8)
3DS1-Bw4	39 (23,9)	33 (26,6)	24 (28,9)	9 (22,0)
2DL1-C2C2	29 (17,8)	21 (16,9)	15 (18,1)	6 (14,6)
2DL2-C1C1	17 (10,4)	17 (13,7)	15 (18,1) <sup>c</sup>	2 (4,9) <sup>c</sup>
2DL3-C1C1	38 (23,3)	38 (30,6)	26 (31,3)	12 (29,3)
2DS1-C2C2	11 (6,7)	8 (6,5)	7 (8,4)	1 (2,4)
2DS2-C1C1	18 (11,0)	22 (17,7)	18 (21,7)	4 (9,8)
2DL2/2DL2-C1C2	12 (7,4)	3 (2,4)	2 (2,4)	1 (2,4)
2DL2/2DL3-C1C2	36 (22,1)	17 (13,7)	9 (10,8)	8 (19,5)
2DL3/2DL3-C1C2	37 (22,7)	35 (28,2)	23 (27,7)	12 (29,3)
2DL2/2DL2-C1C1	5 (3,1)	7 (5,6)	6 (7,2)	1 (2,4)
2DL2/2DL3-C1C1	12 (7,4)	11 (8,9)	10 (12,0)	1 (2,4)
2DL3/2DL3-C1C1	26 (16,0)	28 (22,6)	17 (20,5)	11 (26,8)

C: controles, P: pacientes, NC: não cardiopatas, CCC: indivíduos com cardiopatia chagásica crônica.

<sup>a</sup>  $P = 0,012$ ; OR = 0,46; IC = 0,24 – 0,85

<sup>b</sup>  $P = 0,035$ ; OR = 0,53; IC = 0,29 – 0,96

<sup>c</sup>  $P = 0,071$ ; OR = 0,23; IC = 0,05 – 1,09

Bw4 = HLA-A23, 24, 32

Bw4 = HLA-B08, 13, 27, 37, 44, 51, 52, 53, 57, 58

Grupo C1 = HLA-C01, 03, 07, 08, 12, 14, 16

Grupo C2 = HLA-C02, 04, 05, 06, 07, 15, 17, 18

**Tabela 4.** Correlação entre a distribuição de KIR ativadores e inibidores e seus respectivos ligantes HLA do grupo C em controles saudáveis, pacientes com doença de Chagas e seus subgrupos sem e com comprometimento cardíaco.

	C	P	NC	CCC
<b>Correlação KIR/HLA do grupo C</b>	<b>n=163 (%)</b>	<b>n=124 (%)</b>	<b>n=83 (%)</b>	<b>n=41 (%)</b>
<b>KIR/grupo C1</b>				
2DS2+/2DL2-/C1+	7 (4,3) <sup>a,b</sup>	14 (11,3) <sup>a</sup>	7 (8,4)	7 (17,1) <sup>b</sup>
2DS2-/2DL2+/C1+	6 (3,7)	4 (3,2)	1 (1,2)	3 (7,3)
2DS2+/2DL3-/C1+	17 (10,4)	10 (8,1)	8 (9,6)	2 (4,9)
2DS2-/2DL3+/C1+	62 (38,0)	53 (42,7)	34 (41,0)	19 (46,3)
<b>KIR/grupo C2</b>				
2DS1+/2DL1-/C2+	3 (1,8)	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (2,4)
2DS1-/2DL1+/C2+	68 (41,7)	44 (35,5)	25 (30,1)	19 (46,3)

C: controles, P: pacientes, NC: não cardiopatas, CCC: indivíduos com cardiopatia chagásica crônica.

<sup>a</sup>  $P = 0,042$ ; OR = 2,83; IC = 1,02 – 1,55

<sup>b</sup>  $P = 0,001$ ; OR = 4,58; IC = 1,26 – 16,3

Grupo C1 = HLA-C01, 03, 07, 08, 12, 14, 16

Grupo C2 = HLA-C02, 04, 05, 06, 07, 15, 17, 18



**Tabela 5.** Correlação entre KIR e seus ligantes HLA em controles saudáveis, pacientes com doença de Chagas e seus subgrupos sem e com comprometimento cardíaco.

Correlação KIR/Ligantes HLA	C	P	NC	CCC
	n=163 (%)	n=124 (%)	n=83 (%)	n=41 (%)
KIR/HLA do grupo C1				
2DS2+/2DL2-/2DL3-/C1+	1 (0,6)	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (2,4)
2DS2-/2DL2-/2DL3+/C1+	57 (35,0)	50 (40,3)	33 (39,8)	17 (41,5)
2DS2+/2DL2-/2DL3+/C1+	6 (3,7) <sup>a,b</sup>	13 (10,5) <sup>a</sup>	7 (8,4)	6 (14,6) <sup>b</sup>
2DS2-/2DL2+/2DL3+/C1+	5 (3,1)	3 (2,4)	1(1,2)	2 (4,9)
2DS2+/2DL2+/2DL3-/C1+	16 (9,8)	9 (7,3)	8 (9,6)	1 (2,4)
2DS2+/2DL2+/2DL3+/C1+	43 (26,4)	24 (19,4)	17 (20,5)	7 (17,1)
KIR/HLA do grupo C2				
2DS1+/2DL1-/C2+	3 (1,8)	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (2,4)
2DS1-/2DL1+/C2+	68 (41,7)	44 (35,5)	25 (30,1)	19 (46,3)
2DS1+/2DL1+/C2+	41 (25,2)	31 (25,0)	24 (28,9)	7 (17,1)
KIR/HLA do grupo BW4				
3DS1+/3DL1+/BW4+	33 (20,2)	30 (24,2)	22 (26,5)	8 (19,5)
3DS1+/3DL1-/BW4+	6 (3,7)	3 (2,4)	2 (2,4)	1 (2,4)
3DS1-/3DL1+/BW4+	76 (46,6)	58 (46,8)	35 (56,1)	23 (56,1)
KIR/HLA do grupo A				
3DL2+/A3+/A11+	52 (31,9) <sup>c</sup>	25 (22,2) <sup>c</sup>	18 (21,7)	7 (17,1)
3DL2+/A3-/A11+	17 (10,4)	6 (4,8)	5 (6,0)	1 (2,4)
3DL2+/A3+/A11-	35 (21,5)	19 (15,3)	13 (15,7)	6 (14,6)
3DL2+/A3-/A11-	111(68,1)	99 (79,8)	65 (78,3)	34 (82,9)

C: controles, P: pacientes, NC: não cardiopatas, CCC: indivíduos com cardiopatia chagásica crônica,

<sup>a</sup>  $P = 0,039$ ; OR = 3,06; IC = 1,13 – 8,30

<sup>b</sup>  $P = 0,021$ ; OR = 4,48; IC = 1,36 – 14,73

<sup>c</sup>  $P = 0,036$ ; OR = 0,54; IC = 0,31 – 0,93

Bw4= HLA-A23, 24, 32

Bw4 = HLA-B08, 13, 27, 37, 44, 51, 52, 53, 57, 58

Grupo C1 = HLA-C01, 03, 07, 08, 12, 14, 16

Grupo C2 = HLA-C02, 04, 05, 06, 07, 15, 17, 18

## CAPÍTULO III

### CONCLUSÕES

Neste estudo, as comparações das frequências de genes KIR e de seus ligantes HLA entre pacientes com doença de Chagas e um grupo controle permitiram concluir que:

- ✓ As combinações dos pares e ligantes KIR2DS2+/2DL2-/C1+ e KIR2DS2+/2DL2-/KIR2DL3+/C1+ estão relacionadas à suscetibilidade ao desenvolvimento da cardiopatia Chagásica crônica;
- ✓ Os pares KIR2DL2-C1/C2 e KIR3DL2-A3/11 estão relacionados à resistência à doença de Chagas;
- ✓ Não há diferença na distribuição dos genes KIR entre os grupos analisados;
- ✓ Os genes moldura ou *framework* KIR2DL4, KIR3DL2, KIR3DL3 e KIR3DP1 estão presentes em todas as amostras;
- ✓ As células NK, mediada pelos receptores KIR e ligantes HLA, podem contribuir para o desenvolvimento de lesões teciduais observadas na cardiopatia chagásica crônica.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Como este foi um trabalho pioneiro na análise dos genes KIR e seus ligantes HLA na ocorrência da doença de Chagas e sua influência no desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica, a coleta de mais amostras de pacientes e controles será realizada com a finalidade de definir com mais clareza o papel do gene KIR na imunopatologia da doença de Chagas relacionada com o desenvolvimento de suas formas clínicas.

Além disso, a tipificação HLA de alta resolução do loco C do MHC pode permitir uma melhor definição da influência dos ligantes de KIR na ativação e/ou inibição das células *Natural Killer* e o desenvolvimento da resposta imune no hospedeiro.

A genotipagem dos genes HLA de classe I e II está sendo realizada com intuito de avaliar a resistência ou suscetibilidade genética do hospedeiro frente ao desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica.