

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

LUCIANA RIBEIRO JARDULI

Polimorfismo de genes KIR em pacientes com hanseníase de área brasileira
considerada hiperendêmica pela Organização Mundial de Saúde

Maringá
2012

LUCIANA RIBEIRO JARDULI

Polimorfismo de genes KIR em pacientes com hanseníase de área brasileira
considerada hiperendêmica pela Organização Mundial de Saúde

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^a Dr^a Jeane Eliete Laguila Visentainer

Maringá
2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUCIANA RIBEIRO JARDULI

Polimorfismo de genes KIR em pacientes com hanseníase de área brasileira considerada hiperendêmica pela Organização Mundial de Saúde

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

Prof^a Dr^a Jeane Eliete Laguila Visentainer
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a Dr^a Edna Maria Vissoci Reiche
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Ricardo Alberto Moliterno
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Luis Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Manuel Amaro de Matos Santos Rosa
Universidade de Coimbra

Aprovada em 21 de dezembro de 2012

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

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a todos os pacientes portadores de hanseníase do Brasil, em especial aos residentes em Rondonópolis, Mato Grosso.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sabedoria e capacidade de realização desta conquista.

Aos meus pais, Elias Jarduli e Irene Ribeiro Jarduli, meu irmão, Lucas Ribeiro Jarduli e a minha avó, Maria Farinha Ribeiro, pelo apoio incondicional, paciência, confiança e amor em todos os momentos, minha imensa admiração e gratidão por tudo.

À minha amiga e irmã Danielly Louise Tamburussi Bueno, pelos dois anos em que dividimos não somente um lar, mas também experiências e muitas partilhas. Por tudo que crescemos e vivenciamos juntas.

Ao Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação Celular do Hemocentro Regional de Londrina, a coordenadora Marlene Silva Bardi e toda equipe, por me permitir avançar nos primeiros passos no caminho da Imunogenética.

À Prof^a Dr^a Edna Maria Vissoci Reiche, pela aula de Transplantes ministrada na graduação, pela inspiração como docente e pesquisadora.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, à coordenadora Prof^a Dr^a Márcia Edilaine Lopes Consolaro, pela oportunidade da obtenção do título de Mestre e ajuda extraordinária ao longo deste percurso.

Ao Departamento de Ciências Básicas e da Saúde, à secretária Márcia Maria Gomes da Silva Venturoso, pelo suporte e ajuda.

Ao Prof. Dr. Ricardo Alberto Moliterno, meu primeiro orientador, por todas as vezes que me orientou e aconselhou neste período.

A todos os professores do Laboratório de Imunogenética: Prof^a Dr^a Ana Maria Sell, Prof^a Dr^a Luiza Tamie Tsuneto, Prof^a Dr^a Marcia Machado de Oliveira Dalalio, Prof. Me. Rafael Campos Bezerra e Prof^a Dr^a Sueli Donizete Borelli, pelos ensinamentos e disponibilidade sempre que precisei.

A todos os funcionários do Laboratório de Imunogenética: Edina de Fátima Alcarde de Amêndoa Puppim, Fabiano Cavalcante de Melo, Graciela Cristina Barrena, Helen Cristiane da Silva Ribeiro, João Vitor Zavaglia Paschoalino, Leonardo Germiniani Cipulo, Marco Antônio

Braga, Mateus dos Santos Saad, Neuza Romão Barreto e Silvana Pereira da Silva, pela compreensão e acolhimento, muito obrigada!

Às minhas amigas e companheiras de mestrado: Christiane Maria Ayo, Emília Ângela Sippert, Flávia Cardoso Zaghi e Pâmela Guimarães Reis Rossini, por tudo que vivenciamos e aprendemos juntas.

À Dr^a Sara Tatiana Moreira, pelos ensinamentos estatísticos e por toda ajuda prestada, minha gratidão.

Ao meu amigo e aluno de iniciação científica, Hugo Vicentin Alves, pela ajuda em todas as etapas deste trabalho.

À minha amiga e secretária do Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, Luciane Menchon Moura da Silva, pela pessoa maravilhosa e querida, por contribuir de forma ímpar em todos os momentos de minha trajetória.

A toda equipe do Instituto Lauro Souza Lima de Bauru: Prof. Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond, Ana Carla Pereira, Elaine Valim Camarinha Marcos, Fabiana Covolo de Souza, Ida Maria Foschiane Dias Baptista e Weber Laurentino da Silva.

A toda equipe da PUC de Curitiba: Ao Prof. Dr. Marcelo Távora Mira, Heloísa Salomão, Geovana Brotto Ramos e Vinícius Medeiros Fava.

A toda equipe da Fundação Osvaldo Cruz do Rio de Janeiro: Ao Prof. Dr. Milton Ozório de Moraes.

À Secretaria de Saúde de Rondonópolis, Mato Grosso.

A toda equipe envolvida no projeto DECIT “Caracterização epidemiológica e clínica e avaliação de estratégias de intervenção em duas áreas endêmicas de hanseníase”.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à CAPES – Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior, pelo suporte financeiro.

À minha Orientadora, Prof^a Dr^a Jeane Eliete Laguila Visentainer, pela oportunidade de sonhar, de buscar, de arriscar, de crescer, pela confiança, pela inspiração, por todos os emails, pelo exemplo de pesquisadora e professora, por todos os ensinamentos e pela amizade que de agora em diante se torna uma parceria acadêmica.

EPÍGRAFE

“Se o conhecimento não se transformar em amor, se o amor não se transformar em vida, permaneceremos eternamente caricaturas.” (Pe. José Kentenich)

Polimorfismo de genes KIR em pacientes com hanseníase de área brasileira considerada hiperendêmica pela Organização Mundial de Saúde

RESUMO

Hanseníase é uma doença infecciosa crônica de evolução lenta causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, que afeta primeiramente a pele e os nervos periféricos, podendo se manifestar em diferentes formas clínicas. Existe uma grande evidência para uma base genética de susceptibilidade do hospedeiro à doença *per se* e aos seus subtipos. Os receptores KIR são um grupo de moléculas ativatórias e inibitórias, presente principalmente na superfície das células NK, e a interação entre KIR e moléculas HLA, pode influenciar o padrão de resposta imunológica. O objetivo deste estudo foi investigar a associação de genes KIR e seus ligantes HLA na ocorrência da hanseníase e suas formas clínicas por meio de um estudo caso-controle. O estudo consistiu de 408 pacientes com hanseníase e 413 indivíduos saudáveis de uma região hiperendêmica do Brasil, tipificados para os genes KIR e HLA-A, B e C, pelo método de PCR-r SSOP Luminex. A análise estatística foi realizada pelo teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, além de uma análise de regressão logística multivariada, utilizando o método *stepwise* para análise dos dados. Verificou-se uma maior frequência dos genes KIR ativatórios (*KIR2DS1*, *2DS2* e *3DS1*) na presença de seus ligantes HLA no grupo Tuberculóide (TT) em relação ao grupo Lepromatoso (LL). *KIR2DL2/2DL2 – C1* foi mais frequente no grupo *per se*, TT e LL em relação ao grupo de controles. Pacientes Borderline apresentaram maior frequência de pares inibitórios em relação ao grupo controle e maior frequência de pares ativatórios em relação à forma LL. A análise multivariada confirmou as associações encontradas no teste do qui-quadrado e revelou que o sexo feminino pode ser um fator protetor contra o desenvolvimento da doença e sua forma clínica mais grave. Em conclusão, este estudo demonstrou que genes KIR ativatórios e inibitórios podem ter algum efeito no desenvolvimento da hanseníase, destacando-se a influência dos genes ativatórios na proteção contra a forma mais agressiva da doença, evidenciando o papel das células NK na imunopatologia da hanseníase.

Palavras-chave: Hanseníase. Genes HLA. Genes KIR. Células NK.

KIR gene polymorphism in patients with leprosy from Brazilian area considered hyperendemic by the world health organization

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease of slow evolution caused by *Mycobacterium leprae*, which primarily affects the skin and peripheral nerves and may manifest in different clinical forms. There is strong evidence for a genetic basis for host susceptibility to disease *per se* and its subtypes. KIR receptors are a group of inhibitory and activatory molecules, mainly present on the surface of NK cells, and the interaction between KIR and HLA molecules may influence the pattern of immune response. The aim of this study was to investigate the association of KIR genes and their HLA ligands in the occurrence of leprosy and its clinical forms through a case-control study. The study consisted of 408 leprosy patients and 413 healthy individuals from a hyperendemic region of Brazil, typed for KIR genes and HLA-A, B and C, by PCR-SSOPr Luminex. Statistical analysis was performed by Chi-square or Fisher exact test, and a multivariate logistic regression analysis, using the *stepwise* method for data analysis. There was a greater frequency of genes KIR activatory (*KIR2DS1*, *2DS2* and *3DS1*) in the presence of their HLA ligands in the tuberculoid group (TT) compared to the lepromatous group (LL). *KIR2DL2/2DL2 - C1* was more frequent in the group *per se*, TT and LL compared to the control group. Borderline patients showed a higher frequency of inhibitory peers compared to the control group and higher frequency of activatory pairs compared to the LL form. Multivariate analysis confirmed the associations found in the chi-square test and revealed that females may be a protective factor against the development of the disease and its most severe clinical form. In conclusion, this study demonstrated that KIR genes inhibitory and activatory, may have some effect on the development of leprosy, highlighting the influence of protectors activatory genes against the most aggressive form of the disease, highlighting the role of NK cells in the immunopathology of the leprosy.

Keywords: Leprosy. HLA genes. KIR genes. NK cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Classificação clínica e imunológica do espectro da doença.....	16
Figura 2 Suscetibilidade genética à hanseníase.....	20
Figura 3 Estrutura dos receptores KIR.....	23

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica: *The Journal of Infectious Diseases* Disponível em: <http://jid.oxfordjournals.org/>

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I.....	13
1.1	Introdução.....	13
1.2	Epidemiologia da Região Endêmica.....	13
1.3	Classificação e Características da Doença.....	14
1.4	Manifestações Clínicas.....	16
1.5	Diagnóstico Laboratorial.....	17
1.6	Tratamento e Profilaxia.....	18
1.7	Suscetibilidade Genética à Hanseníase.....	19
1.8	Células <i>Natural Killer</i> e a hipótese do <i>Missing-Self</i>	21
1.9	Genes KIR e seus Receptores.....	22
1.10	Genes KIR e sua Influência na Hanseníase.....	24
1.11	Justificativa.....	26
1.12	Objetivos.....	27
1.12.1	Geral.....	27
1.12.2	Específicos.....	27
1.13	Referências.....	28
2	CAPÍTULO II.....	33
2.1	Influência dos genes KIR e seus ligantes HLA na patogênese da hanseníase em uma população brasileira hiperendêmica.....	34
3	CAPÍTULO III.....	56
3.1	Conclusões.....	57
3.2	Perspectivas Futuras.....	58

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

O bacilo *Mycobacterium leprae* (*M. Leprae*) foi identificado em 1873 pelo norueguês Gerhard Henrick Amauer Hansen e foi considerado o primeiro agente etiológico causador de uma doença infecciosa humana. Trata-se de um bacilo intracelular obrigatório de multiplicação lenta cuja transmissão ocorre de pessoa para pessoa através das vias respiratórias, por contato íntimo e prolongado ⁽¹⁾.

A hanseníase é uma doença distribuída em quase todos os países da África, Ásia e América Latina. Acredita-se que o *M. Leprae* tenha se propagado pelo mundo através de sucessivas migrações que se iniciaram a partir das guerras pré-idade média e, posteriormente, com o colonialismo e o comércio de escravos ⁽²⁾.

A prevalência da doença caiu substancialmente nos últimos 50 anos ⁽³⁾, entretanto, a transmissão persiste e a hanseníase ainda é considerada um problema de saúde pública no contexto mundial ⁽⁴⁾. Embora a prevalência global tenha diminuído ao longo dos anos, devido à terapia com múltiplas drogas, a detecção de novos casos permanece estável com, aproximadamente, 250.000 novos casos a cada ano ⁽⁵⁾.

O Brasil mantém a queda na incidência da doença no país. Entre 2010 e 2011, o coeficiente de detecção de novos casos caiu 15% e, em menores de 15 anos, este percentual baixou 11%. Dados preliminares mostraram que em 2011 houve 30.298 casos novos detectados, resultando em um coeficiente de 15,88 casos novos por 100 mil habitantes. Destes, 2.192 casos foram registrados em menores de 15 anos (4,77 casos por 100 mil habitantes). Apesar desta queda, o país ocupa o segundo lugar na posição mundial de prevalência da doença, permanecendo a Índia em primeiro lugar ⁽⁶⁾.

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA REGIÃO ENDÊMICA

No Brasil, a hanseníase é diagnosticada em todas as regiões do país, mantendo-se as regiões Norte e Centro-Oeste hiperendêmicas e a região Nordeste com alto parâmetro de endemicidade ⁽⁷⁾.

O município de Rondonópolis (Região Centro-Oeste, Estado do Mato Grosso, latitude 16°28'15" sul e longitude 54°38'08 oeste), está localizado no entroncamento das

rodovias BR-163 e BR-364, a 210 km da capital Cuiabá. É uma cidade pólo para o Sul de Mato Grosso atendendo 19 municípios. Apresenta crescimento devido ao grande fluxo de migrantes vindos de outras partes do país, principalmente sul e sudeste, com o objetivo de investir em pecuária, agricultura e indústria. Em 1979 foi implantado o Programa de Hanseníase com apoio da Associação Alemã de Assistência aos Hansenianos e Tuberculosos (DAHW). As ações de controle da doença são desenvolvidas em todas as unidades básicas de saúde do município. O percentual de novos casos detectados aumentou significativamente (de 6,22 a 17,64/100 mil habitantes) no período entre 2000 e 2006, o que demonstra diagnóstico tardio da doença e provável manutenção de transmissão ativa na comunidade. No ano de 2007 foram notificados 207 casos novos de hanseníase com coeficiente de prevalência de 13 casos para 100.000 habitantes. A detecção em crianças menores de 15 anos tem aumentado, bem como, o número de casos da forma multibacilar da doença, que são indicadores de permanência do município como região endêmica ⁽⁸⁾.

A estratégia global para redução da carga de doenças devido à hanseníase (período do plano: 2011-2015) está sendo adotada e implementada por programas nacionais de hanseníase nos países onde a doença é endêmica. A estratégia visa reduzir a taxa de novos casos até o final de 2015, especialmente os casos que levam a elevados graus de incapacidade. Espera-se que a fixação de uma meta global possa estimular a implementação de atividades para reduzir atrasos no diagnóstico da doença e administração de tratamento imediato com poliquimioterapia (PQT) ⁽⁹⁾.

1.3 CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DA DOENÇA

Uma vez que a infecção no paciente é confirmada, é importante classificar a doença a fim de determinar o tratamento apropriado e prever o risco de complicações como deformidades físicas, perdas sensoriais e danos permanentes nos nervos ⁽¹⁰⁾.

O modelo mais utilizado para classificação da doença é o de Ridley-Jopling que utiliza características histopatológicas e clínicas e também o índice bacteriológico, dividindo a doença em cinco formas polares e interpolares (intermediárias): Tuberculóide (TT), Borderline-Tuberculóide (BT), Borderline-Borderline (BB), Borderline-Lepromatosa (BL) e Lepromatosa ou Virchowiana (LL) ⁽¹⁾. A forma TT consiste em lesões localizadas, pequeno número de bacilos e intensa resposta imune celular. A forma LL apresenta lesões cutâneas bem distribuídas, alto número de bacilos e resposta imune mediada por células ineficaz ⁽¹¹⁾.

Inicialmente, a doença apresenta-se de forma indeterminada, podendo regredir espontaneamente ou evoluir para um destes estágios.

As diferentes categorias clínicas geralmente se correlacionam com a resposta imune do hospedeiro. Pacientes TT apresentam lesões de pele anestésicas com hipopigmentação limitada e poucas micobactérias. Estes pacientes apresentam uma resposta imune mediada por células do tipo linfócitos Th1 CD4+ produtores de citocinas (IL-2, INF- γ e TNF), que promove a formação de delineados granulomas, com macrófagos infectados ao centro, muitas vezes fundidos em células gigantes multinucleadas⁽¹²⁻¹³⁾. O IFN- γ é a principal citocina de ativação dos macrófagos e tem funções críticas na imunidade contra a micobactéria. A IL-2 estimulando o crescimento de células Th1 antígeno-específicas, resultando em doença mais branda ou cura⁽¹¹⁾.

Por outro lado, pacientes LL apresentam numerosas lesões, sensíveis ou anestésicas, com alta carga bacilar⁽¹⁴⁾. Eles apresentam uma resposta imune mediada por linfócitos T CD4+ do tipo Th2 com produção de citocinas (IL4, IL5 e IL-10) que inibem a formação de granulomas, permitindo uma descontrolada replicação dos bacilos e infiltração contínua da pele e dos nervos. A IL-4 estimula a produção de IgE e juntamente com a IL-10, estimulam as células B com produção de anticorpos que inibem a ativação dos macrófagos, resultando em infecção progressiva. O perfil de citocinas presentes em lesões LL parece contribuir para a ineficácia da resposta imune e a falha de ativação dos macrófagos nestes indivíduos⁽¹¹⁾.

As formas Borderline (BT, BB e BL) compreendem a maioria dos casos. Estes indivíduos apresentam fenótipos clínicos e histológicos intermediários resultantes de uma resposta imunologicamente instável contra a micobactéria⁽¹⁵⁾.

Outra classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) divide a doença em duas formas clínicas: paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), em que o paciente apresenta de 1 a 5 lesões cutâneas para a forma PB e, 6 ou mais lesões cutâneas para a forma MB⁽¹⁰⁾.

Pacientes com a forma PB apresentam infecção localizada com baixa carga bacilar e lesões características de imunidade mediada por células Th1. Pacientes com a forma MB são mais susceptíveis à micobactéria, eles exibem uma infecção sistêmica com lesões características de imunidade mediada por células Th2. A forma MB inclui as formas BB, BL e LL, enquanto a forma PB inclui as formas TT e BT⁽¹⁵⁻¹⁶⁾. A Figura 1 ilustra a relação entre o

tipo de resposta imunológica apresentada pelo indivíduo infectado pelo bacilo, o espectro clínico e a carga bacilar, de acordo com as classificações clínicas.

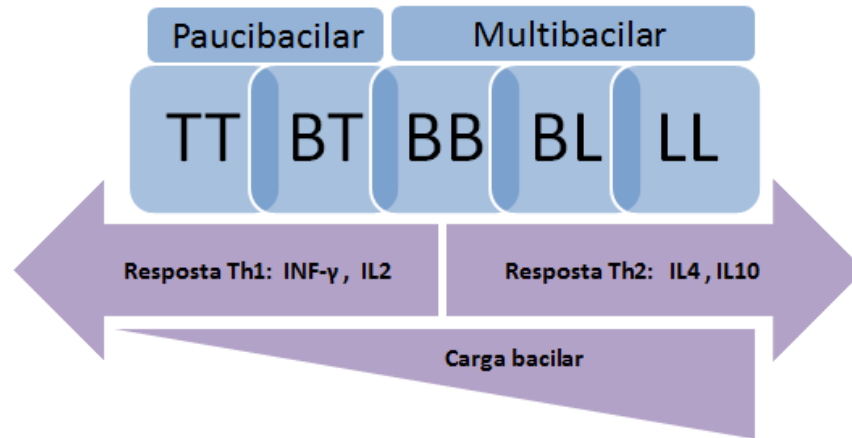


Figura 1. Classificação clínica e imunológica do espectro da hanseníase. Classificação de acordo com Ridley-Jopling (TT, BT, BB, BL, LL) ⁽¹⁾ e Organização Mundial de Saúde (PB e MB) ⁽¹⁰⁾. A resposta imunológica do hospedeiro (Th1 *versus* Th2) e a carga bacilar é correlacionada com o subtipo da doença (Adaptado de Alter *et al.*, 2011).

1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas da doença dependem de fatores como a capacidade de proliferação e multiplicação dos bacilos e da resposta imunológica apresentada pelo hospedeiro. Em indivíduos infectados, é comum o aparecimento de lesões cutâneas e mucosas, além de comprometimento de nervos periféricos ⁽¹⁷⁾.

Reações do tipo I ou Reação Reversa (RR) representam uma resposta imunológica inflamatória aguda do tipo Th1 a antígenos do *M. Leprae* que ocorrem na pele e/ou nos nervos e são a principal causa de comprometimento neurológico em pacientes com hanseníase. As lesões de pele tornam-se inflamadas e edemaciadas, podendo ocorrer a formação de úlceras. Edema das mãos, pés e rosto também podem ser características desta reação, mas os sintomas sistêmicos são incomuns. RR ocorrem mais frequentemente nas categorias limítrofes BL, BT e BB, com uma frequência de 30% nestes pacientes. Reações do tipo I podem acontecer a qualquer momento, no entanto são vistas com frequência após o início do tratamento com PQT ou durante o puerpério em mulheres ⁽¹⁰⁾.

Segundo Pocaterra *et al.* ⁽¹⁸⁾, Reações do tipo II ou Eritema Nodoso Hansênico (ENH) têm uma prevalência de 24% nos pacientes com hanseníase. É uma reação imunológica sistêmica que pode ocorrer em pacientes LL (até 50% dos casos) e em pacientes BL (9% dos casos), sendo causada pela deposição de imunocomplexos no endotélio vascular e nos tecidos devido à alta produção de anticorpos à carga antigênica do *M. Leprae*. Existem três tipos subclínicos de ENH: Agudo único (8% dos casos), Agudo múltiplo (episódios repetidos) e Crônico (episódios mais longos e mais graves). Apresenta-se com febre, pápulas e nódulos vermelhos na pele, muitas vezes afetando face e membros. As lesões podem ser superficiais ou profundas, podendo ulcerar. Pode ocorrer comprometimento subcutâneo dos tecidos, causando perda da função motora pelo acometimento das articulações. As reações podem ser acompanhadas de uveíte, neurite, artrite, linfadenite e orquite. A inflamação prolongada dos órgãos pode levar à cegueira e esterilidade. Maior infiltração na pele e maior índice baciloscópico são dois riscos relevantes para o desenvolvimento de ENH.

Lesões nos nervos periféricos são complicações clínicas importantes, que levam à diminuição da qualidade de vida dos pacientes acometidos ⁽¹⁹⁾. Pacientes LL apresentam inflamação de nervos periféricos causando um alargamento palpável dos nervos, podendo ou não ser doloroso, e faz com que haja perda sensorial e motora do nervo afetado ⁽¹⁰⁾. Em pacientes LL, o comprometimento dos nervos ocorre mais cedo do que em pacientes TT ⁽²⁰⁾, sendo que a destruição dos nervos dérmicos ocorre primeiramente e a destruição dos nervos periféricos mais tardiamente. A proliferação bacilar dentro das células de Schwann leva a sua degeneração, provocando lesões nos nervos que causam deformidades e incapacidades, gerando um estigma social e discriminação dos doentes ⁽¹⁹⁾.

1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Existem alguns testes laboratoriais que são utilizados para detectar a infecção e monitorar o progresso no tratamento. Tais testes também são úteis para monitorar a transmissão dentro de uma comunidade e orientar o tratamento ⁽²¹⁾.

A primeira manifestação sugestiva da doença é uma mancha na pele com alteração da sensibilidade. A confirmação pode ser realizada por bacterioscopia pela identificação de bacilos, na linfa coletada dos lóbulos das orelhas, cotovelos ou da própria lesão. Conta-se o número de bacilos por campo microscópico e gera-se um índice baciloscópico (IB) que vai ser útil tanto para o diagnóstico como para o acompanhamento pós-tratamento. A biópsia da pele afetada também pode ser utilizada com alta especificidade, pois, além de refletir a resposta

inflamatória na pele e nervos periféricos, pode identificar a presença do bacilo por colorações específicas, como a de Ziehl-Neelsen, e serve para diferenciar a relação granulomatosa da hanseníase de outras doenças granulomatosas ⁽²²⁾.

Um dos testes imunológicos pesquisa anticorpos contra o antígeno glicolípido fenólico tipo 1 (PGL-1, presente na parede do *M. leprae*), pela metodologia de ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês, *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*). No entanto, esta metodologia é sensível e específica apenas para pacientes MB, devido a grande produção de anticorpos. Outro teste que utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), é altamente sensível e específico para detecção do DNA do *M. leprae*; porém pode falhar em pacientes PB, devido ao baixo número de bacilos apresentados por estes pacientes ⁽²³⁾.

O teste de hipersensibilidade tardia de Mitsuda realizado *in vivo* é utilizado para avaliar a imunidade mediada por células frente ao *M. leprae* ⁽²⁴⁾. O paciente recebe uma injeção intradérmica de bacilos inativados pelo calor, provocando uma reação cutânea tardia granulomatosa. Após um período de 21 a 28 dias é feita a leitura do local da inoculação ⁽¹⁶⁾. Embora o teste tenha sido desenvolvido para avaliar a resposta imune frente ao *M. leprae* em condições naturais de infecção, outros agentes podem influenciar no resultado do teste, tais como o bacilo Camette-Guérin (vacina BCG) e o *M. tuberculosis*. Portanto, o teste de Mitsuda reflete a capacidade de desenvolver um granuloma imunológico após uma infecção micobacteriana e não é um marcador específico para resposta imune contra o *M. Leprae* não estando relacionado a variantes clínicas em pacientes hanseníacos ⁽²⁵⁾.

1.6 TRATAMENTO E PROFILAXIA

A OMS recomenda a PQT com rifampicina (uma droga bactericida), dapsona e clofazimina (duas drogas bacteriostáticas) para o tratamento da hanseníase. Para aqueles com doença PB, é recomendado o esquema terapêutico de rifampicina e dapsona durante 6 meses, e para pacientes MB, recomenda-se o esquema terapêutico de rifampicina, dapsona e clofazimina durante 12 meses. Em 2009, o relatório da OMS do Grupo de Aconselhamento Técnico no Controle da Hanseníase (*Technical Advisory Group on Leprosy Control*) sugeriu que, em termos de saúde pública, é possível concluir que a infecciosidade se torna pouco provável após o início do tratamento com PQT. Um tratamento mais prolongado, entretanto, pode ser necessário em alguns pacientes com elevado índice baciloscópico no diagnóstico, para evitar recaídas ⁽²⁶⁾.

Pacientes com a forma MB constituem a principal fonte de propagação do bacilo e, se a recidiva ocorrer nestes pacientes, a transmissão recomeça. A taxa de recaída após a PQT varia, mas é de pelo menos três casos a cada 100 pessoas, por ano. Fatores associados à recidiva incluem: uso de monoterapia, terapia inadequada ou irregular e ausência de resposta ao tratamento ⁽²⁷⁾. A recomendação atual da OMS é que a terapia com múltiplas drogas seja reiniciada nos pacientes cuja recidiva for comprovada ⁽⁹⁾.

A utilização da vacina de BCG em recém-nascidos, indicada para prevenção do desenvolvimento da tuberculose, contribuiu substancialmente para a diminuição da prevalência da hanseníase, demonstrando efeito protetor contra a infecção pelo *M. Leprae*. Entretanto, tal como acontece com a tuberculose, o grau de proteção contra o desenvolvimento da hanseníase obtido a partir da vacinação varia entre as populações ⁽²⁸⁾. Alguns fatores que modificam a eficácia da vacina são diferenças na BCG produzidas em países diferentes, meio ambiente em que a população reside e fatores genéticos que promovem diferentes respostas à vacinação ⁽²⁹⁾.

1.7 SUSCETIBILIDADE GENÉTICA À HANSENÍASE

Evidências sugerem que a incidência da infecção na população provavelmente seja muito maior que a incidência de hanseníase clínica, pois, uma pequena proporção (aproximadamente 5%) dos infectados desenvolvem sintomas clínicos e o restante desenvolve infecções subclínicas que podem ser persistentes ou se curarem espontaneamente. Isto pode ser devido, em parte, aos fatores ambientais, como a nutrição, ou a diferenças genéticas bacterianas. Entretanto, existe também uma grande evidência para uma base genética de susceptibilidade do hospedeiro tanto à doença *per se* quanto aos subtipos ⁽³⁰⁾.

Durante anos as pesquisas buscam conhecer a predisposição genética à hanseníase *per se* e uma particular forma da doença. O espectro clínico e patológico da hanseníase e a heterogeneidade epidemiológica, geográfica e étnica, podem ser explicados pelas diferenças genéticas na resistência do hospedeiro. Enquanto alguns *loci* afetam a susceptibilidade intrínseca à hanseníase (hanseníase *per se*), outros modificam a forma clínica da doença ⁽³¹⁾.

De acordo com uma revisão feita por Moraes *et al.* ⁽³²⁾, de forma geral, a partir do momento da infecção pelo bacilo *M. Leprae*, três etapas podem ser identificadas e subdivididas no curso crônico da doença:

Na primeira etapa (I), o indivíduo infectado pode desenvolver a doença ou apresentar resistência e, conseqüentemente, a cura.

Em uma segunda etapa (II), no indivíduo uma vez doente, observa-se um agravamento da doença, quando será definida a forma do espectro clínico que o acometerá, podendo ser mais branda (tuberculóide) ou mais grave (lepromatosa), ou ainda variar entre os dois pólos opostos, apresentando uma forma intermediária.

Na terceira e última etapa (III) ocorrem os estados reacionais que se intercalam no curso natural da doença. Devido aos estágios diferenciados durante o desenvolvimento da doença e à baixa variabilidade encontrada no genoma do *M. leprae*, estudos sugeriram que fatores genéticos do hospedeiro são componentes primordiais para o estabelecimento e desencadeamento da doença.

A Figura 2 ilustra as três etapas envolvidas no curso natural da doença e a participação do fator genético influenciando cada uma das etapas.

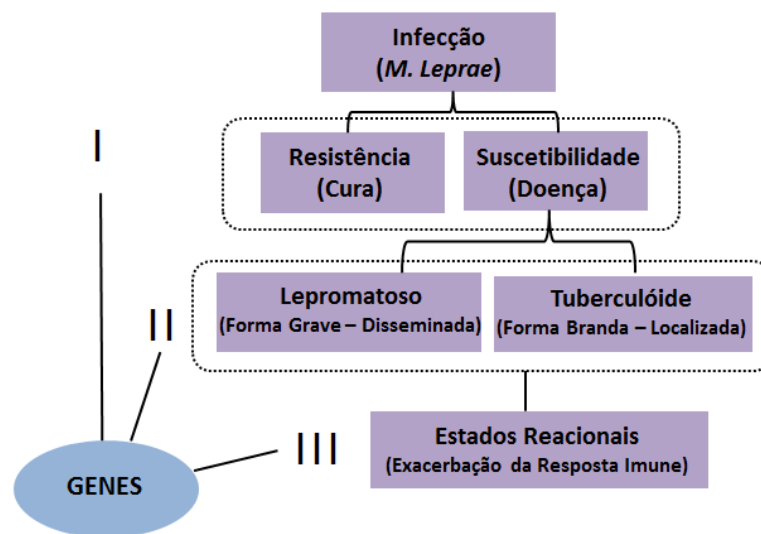


Figura 2. Suscetibilidade genética à hanseníase. Curso natural da hanseníase: estágios da doença após a exposição ao patógeno. Participação de diferentes genes sugerida nas três etapas distintas. (Extraído de Vanderborgh & Cardoso, 2009)⁽⁵⁵⁾.

O que difere a suscetibilidade à hanseníase das demais doenças é que ela é considerada uma doença complexa, sendo que os mecanismos genéticos da imunopatogênese da hanseníase parecem ser poligênicos, pois vários genes desempenham um papel na

determinação de suscetibilidade à doença. Os fatores genéticos provavelmente interagem com fatores ambientais, influenciando no tempo e na gravidade da doença ⁽³³⁾.

1.8 CÉLULAS *NATURAL KILLER* E A HIPÓTESE DO *MISSING-SELF*

Células NK (do inglês, *Natural Killer*) são linfócitos granulares grandes derivados da medula óssea que possuem importantes funções na regulação da resposta imune inata. São capazes de lisar células infectadas sem a necessidade de serem estimuladas previamente. O reconhecimento de células alvo por células NK envolve a ligação e interação entre receptores ativadores e inibidores presentes em sua membrana celular, com moléculas ligantes na superfície da célula alvo, além da integração de sinais transmitidos por estes receptores que determinam a ativação ou inibição da célula NK ⁽³⁴⁾.

As moléculas de superfície celular, chamadas de HLA no homem (do inglês, *Human Leukocyte Antigens*) são extremamente polimórficas e têm participação efetiva na resposta imune específica e na resposta imune inata, promovendo a interação entre os epítomos de um dado patógeno e o repertório de células T apresentadas pelo hospedeiro. A região genômica que codifica as moléculas HLA é chamada de Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) e está localizada no braço curto do cromossomo 6 humano ⁽³⁵⁾.

Os genes HLA são herdados seguindo as leis de Mendel e são expressos de forma codominante em cada indivíduo. São divididos em genes de classe I e classe II, os quais codificam as moléculas HLA. Existe ainda uma terceira região, denominada região de classe III, que codifica outras moléculas importantes na resposta imunológica, como fatores do complemento (C4A e C4B), LT- α , LT- β e TNF- α ⁽³⁵⁾.

As moléculas HLA de Classe I (HLA-A, -B e -C), possuem distribuição variada, sendo encontradas em todas as células nucleadas e nas plaquetas. Diferentemente, as moléculas HLA de classe II que codificam as moléculas clássicas HLA-DR, -DQ e -DP, e as moléculas não clássicas HLA-E, HLA-F e HLA-G, possuem distribuição restrita, sendo encontradas somente em alguns poucos tipos de células denominadas células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs), das quais as mais importantes são as células B, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais do timo ⁽³⁵⁾.

Algumas variantes HLA, de classe I e classe II, já foram associadas ao controle da resposta imune frente ao *M. leprae*, com participação significativa na suscetibilidade e resistência à doença ⁽³⁶⁻⁴³⁾.

Mecanismos envolvidos na ativação ou inibição das células NK estão sendo descritos, sendo a hipótese do *Missing-Self* (perda do próprio) a mais aceita atualmente ⁽⁴⁴⁾. De acordo com esta hipótese, as células NK fornecem imunovigilância para células que apresentam diminuição da expressão de moléculas HLA de Classe I após alguma transformação celular ou infecção viral. As células NK são capazes de perceber a diminuição ou ausência destas moléculas, desencadeando citotoxicidade contra as células alteradas ⁽⁴⁵⁾.

1.9 GENES KIR E SEUS RECEPTORES

O grupo de genes KIR compreende uma região de aproximadamente 150 Kb na região do LCR (do inglês, *Leukocyte Receptor Complex*) do cromossomo 19q13.4, os quais codificam os receptores KIR (do inglês, *Killer Immunoglobulin-Like Receptor*), que são membros de um grupo de moléculas regulatórias presentes na superfície de células NK. Os receptores KIR são os principais reguladores funcionais das células NK através do balanço entre sua ativação e inibição, que ocorre pela ligação de KIR com as moléculas HLA de Classe I ⁽⁴⁶⁾.

Estruturalmente, os receptores KIR são formados por dois ou três domínios extracelulares (D0, D1 e/ou D2), uma região transmembranar e uma cauda citoplasmática que pode ser longa ou curta. Estes receptores são membros da superfamília das imunoglobulinas (Ig) e foram identificados pela primeira vez em 1990 por Moretta *et al.* (1990) ⁽⁴⁷⁾.

A família de receptores KIR inclui moléculas inibitórias (2DL e 3DL) que possuem uma longa cauda citoplasmática, a qual contém ITIMs (motivos de inibição baseados em tirosina) e desencadeiam eventos de inibição da citotoxicidade; e também moléculas ativatórias (2DS e 3DS), que não possuem ITIMs, mas apresentam ITAMs (motivos de ativação baseados em tirosina) em sua região transmembrana. Este resíduo de aminoácido permite associação do receptor KIR com a molécula DAP-12, a qual libera sinais ativadores, promovendo uma cascata que resulta em um aumento da granulação citoplasmática e produção de citocinas e quimiocinas, iniciando a resposta imunológica ⁽⁴⁸⁾. As características estruturais dos receptores KIR estão apresentadas na Figura 3.

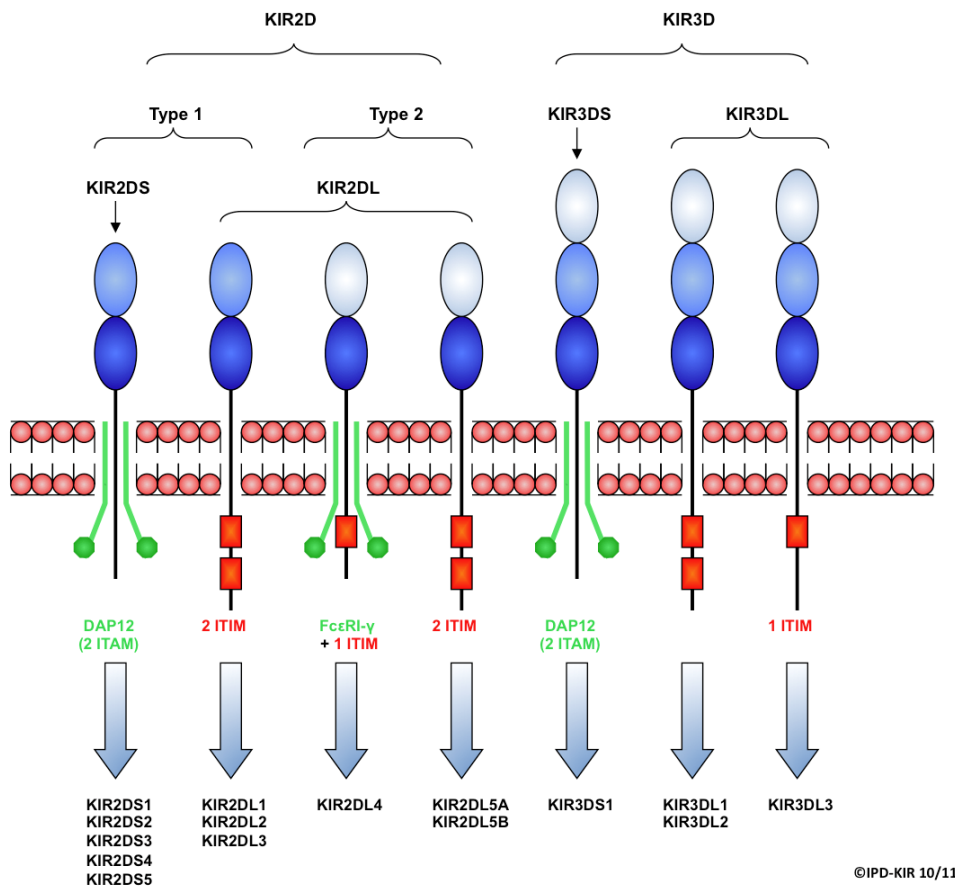


Figura 3. Estrutura dos receptores KIR. Características estruturais das proteínas com dois (KIR2D) ou três (KIR3D) domínios extracelulares semelhantes à Ig. A associação dos receptores KIR ativadores com as moléculas adaptadoras é ilustrada em verde, enquanto os motivos de inibição baseados em tirosina (ITIMs) dos receptores inibidores estão ilustrados como caixas vermelhas. FONTE: Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/> Acesso em: outubro de 2012.

Alguns pares ‘KIR-ligantes’ com determinadas especificidades de moléculas HLA são conhecidos: O KIR2DL4 apresenta especificidade de ligação com a molécula HLA-G⁽⁴⁹⁾. O receptor KIR2DL1 reconhece um subgrupo de moléculas HLA com o epítipo Bw4 como ligante, que está presente em aproximadamente um terço de todos os alelos *HLA-B*. O KIR3DS1, altamente homólogo com KIR3DL1, parece compartilhar Bw4 como ligante, embora esta característica ainda seja pouco elucidada. O ligante de KIR3DL2 ainda é discutido, porém alguns estudos indicaram que as moléculas *HLA-A*03* e *HLA-A*11* possam realizar este papel⁽⁵⁰⁾.

Grande parte dos receptores KIR liga-se às moléculas HLA-C. Este ligante possui um dimorfismo de aminoácidos no resíduo 80 da α -hélice-1, o que faz com que estas moléculas possam ser definidas em dois grupos: O primeiro Grupo é caracterizado por possuir o aminoácido Serina na posição 77 e Asparagina na posição 80. Dentro dele estão incluídos os ligantes de *KIR2DL2*, *2DL3* e *2DS2* – HLA-C *01, *02, *03, *07, *08, *12, *13, *14, *16. Já o segundo Grupo é caracterizado por possuir o aminoácido Asparagina na posição 77 e Lisina na posição 80. Este grupo consiste nos ligantes de *KIR2DL1* e *2DS1* – HLA-C*02, *04, *05, *06, *07, *15, *17 e *18⁽⁵¹⁾. Variações de sequências nos genes KIR podem ocorrer em posições que codificam resíduos que afetam a interação com moléculas ligantes HLA de classe I⁽⁵²⁾.

A diversidade dos genes KIR em níveis alélicos, genotípicos, haplotípicos e funcionais é imensa. Esta variabilidade dá origem a uma vasta gama de haplótipos KIR dentro das populações humanas. Estes haplótipos variam em termos de conteúdo genético e número de genes, sendo categorizados em duas classes funcionais distintas: ‘Haplótipo A’ que possui um conteúdo genético restrito e ausência da maioria dos genes ativatórios (compreende os genes *2DL1*, *2DL3*, *3DL1*, *3DL2*, *2DL4* e *2DS4*) e o ‘Haplótipo B’ que possui um conteúdo genético mais variável e a presença de mais genes ativadores. Esta diversidade resulta na expressão variada de genes KIR nos indivíduos, influenciando a resposta imune inata das células NK⁽⁵³⁻⁵⁴⁾.

1.10 GENES KIR E SUA INFLUÊNCIA NA HANSENÍASE

A resposta imune do hospedeiro é um fator crítico para o desencadeamento da doença, e os níveis desta resposta são também influenciados pelos produtos de diversos genes⁽⁵⁵⁾.

A primeira associação entre genes KIR e seus ligantes na evolução da hanseníase foi demonstrada por nosso grupo em 2008 no trabalho de Franceschi *et al.* (2008)⁽⁵⁶⁾. Por meio de um estudo caso-controle, foram avaliados 165 pacientes portadores de hanseníase oriundos do estado do Paraná e classificados de acordo com os critérios estabelecidos por Ridley-Jopling (1966)⁽¹⁾. A análise das frequências dos genes KIR entre os pacientes, de acordo com a classificação clínica, revelou diferença significativa entre as frequências dos genes ativadores *KIR2DS2* e *KIR2DS3*. O grupo de pacientes TT apresentou uma maior frequência de ambos os genes ativadores (61,9% e 38,1%) em relação ao grupo de pacientes LL (43,1% e 18,5%), o que permite aos pacientes TT desenvolverem uma melhor ativação das células NK, resultando em um mecanismo de proteção contra as formas mais graves da doença.

Ainda no estudo de Franceschi *et al.* (2008) ⁽⁵⁶⁾, pacientes com a forma clínica BB, apresentaram maior frequência do gene *KIR3DL2* com seu ligante *HLA-A*03/*11* quando comparado ao grupo de pacientes LL e ao grupo controle, e uma menor frequência do gene *KIR2DL1* e seu ligante C2 em relação ao grupo de pacientes TT e ao grupo controle. Enquanto *KIR3DL2-HLA-A*03/*11* promove a inibição da citotoxicidade pelas células NK, ocorre uma diminuição da inibição através de *KIR2DL1-C2*, produzindo um efeito oposto. O balanço entre estas interações pode explicar as características indefinidas observadas nos pacientes com a forma clínica BB. Este trabalho forneceu a primeira evidência da contribuição dos genes KIR no desenvolvimento da hanseníase em suas formas clínicas.

Considerando existir até o momento apenas um estudo envolvendo os genes KIR e seus ligantes HLA com a suscetibilidade/resistência à hanseníase, propomos este estudo de uma população oriunda de uma região hiperendêmica do Brasil. O polimorfismo genético das variantes de genes KIR pode gerar produtos diferentes que interagem entre si ou com receptores de alguns tipos celulares, alterando a resposta imune a agentes infecciosos. Portanto, a identificação e caracterização do repertório de genes KIR, juntamente com seus ligantes HLA de Classe I podem revelar novos mecanismos de imunidade às micobactérias.

1.11 JUSTIFICATIVA

A hanseníase é considerada uma doença negligenciada, cuja prevalência, embora tenha diminuído ao longo dos anos, apresenta um índice alto de detecção de novos casos por ano. No Brasil, a hanseníase é diagnosticada em todas as regiões do país, com algumas regiões apresentando altos parâmetros de endemicidade, como a região Centro-Oeste, ficando em segundo lugar na posição mundial de acordo com a OMS, um dado muito importante dentro do contexto da saúde pública brasileira ⁽⁶⁾.

Atualmente, muitos genes de resposta imune estão sendo estudados no intuito de esclarecer sua possível participação na ocorrência ou gravidade de uma doença, visto que as variações de respostas imunes entre indivíduos estão frequentemente associadas ao polimorfismo do genoma humano.

Este trabalho pode contribuir para o esclarecimento dos mecanismos imunopatogênicos do *M. leprae*, continuando os estudos da participação de genes de resposta imune no desenvolvimento da hanseníase. A análise de genes KIR em pacientes com hanseníase residentes numa região hiperendêmica pode ser usada como instrumento de investigação auxiliar na caracterização genética dos pacientes hansenianos, permitindo assim a determinação de uma possível associação entre estas combinações gênicas e o desenvolvimento da hanseníase e suas formas clínicas.

1.12.1 OBJETIVOS

1.12.2 GERAL

Investigar a participação dos genes KIR e seus ligantes HLA de Classe I na susceptibilidade e/ou resistência ao desenvolvimento da hanseníase e suas formas clínicas de uma população de uma região hiperendêmica do Brasil (Rondonópolis, Mato Grosso).

1.12.2 ESPECÍFICOS

1. Identificar os genes KIR (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*, *KIR2DP1*, *KIR3DP1*) e alelos dos *loci* HLA de Classe I (HLA-A, -B, -C) em pacientes com hanseníase do município de Rondonópolis, Mato Grosso, e em indivíduos controles saudáveis da mesma região através da tecnologia PCR-SSO Luminex®.
2. Estimar as frequências genotípicas, haplotípicas e alélicas para estes genes nas populações estudadas.
3. Investigar por meio de um estudo caso-controle uma associação entre os genes KIR e seus receptores HLA de classe I, dos loci A, B e C com o desenvolvimento da hanseníase e suas formas clínicas.
4. Avaliar por meio de análise de regressão logística o efeito conjunto das variáveis: idade, gênero e grupo étnico (brancos, negros e pardos) e genes KIR no desenvolvimento da hanseníase e suas formas clínicas.

1.13 REFERÊNCIAS

- 1 Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepro Other Mycobact Dis* 1966; 34(3):255-73.
- 2 Gallo MEN, Nery JA, Moraes MO, Antunes, SL, Pessolani, MCV, Sarno EN. Hanseníase: aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro; 2005. p.1383-94.
- 3 Merle CS, Cunha SS, Rodrigues LC. BCG vaccination and leprosy protection: review of current evidence and status of BCG in leprosy control. *Expert Rev Vaccines* 2010; 9(2): 209-22.
- 4 WHO Enhance global strategy for further reducing the disease burden due to leprosy (plan period 2011-2015). New Delhi: World Health Organization Regional Office for South-East Asia, 2008 [acesso em 05 Abr 2012]. Disponível em: <http://www.searo.who.int/LinkFiles/GLP_SEA-GLP-2009_3.pdf>
- 5 Rodrigues LC, Lockwood DNJ. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges and research gaps. *The Lancet Infectious Diseases* 2011; 11(6):464-70.
- 6 Ribeiro R. Novos casos de hanseníase caem 15% em um ano. Portal da Saúde; 2012 Jan 26 [acesso em 13 Mar 2012]. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/4085/162/novos-casos-de-hanseníase-%3Cbr%3Ecaem-15-em-um-ano.html>>
- 7 Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil, 2001-2006. Portal da Saúde; 2006 [acesso em 30 Mar 2012]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/poster_hansen_brasil.pdf>
- 8 Coelho NMB, Pereira EC, Ghidella CC, Rosa OS, Belone AFF, et al. Impacto das ações em saúde na detecção de casos novos de hanseníase. *Hansenologia Internationalis*; 2007 [acesso em 30 Mar 2012]. Disponível em <<http://www.ils.br/revista/index.php/hi/article/view/202>>
- 9 WHO. Weekly epidemiological Record. Leprosy update 2011; 86(36):349-400. [acesso em 5 Abr 2012]. Disponível em <<http://www.who.int/wer/2011/wer8636.pdf>>
- 10 Walker SL, Lockwood DN. The clinical and immunological features of leprosy. *Br Med Bull* 2006; 77-78(1):103-21.
- 11 Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35(4):363-75.

- 12 Mariano M. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1995; 37(2):161-76.
- 13 Crawford CL, Hardwicke PM. Experimental leprosy: a model of epithelioid cell granuloma. *Int J Dermatol* 2011; 50(3):255-61.
- 14 Mira MT. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes Infect* 2006; 8(4):1124-31.
- 15 Alter A, Grant A, Abel L, Alcaïs A, Schurr E. Leprosy as a genetic disease. *Mamm Genome* 2011; 22(1-2):19-31.
- 16 Misch EA, Berrington WR, Vary JC, Hawn TR. Leprosy and the human genome 2010; 74(4):589-620.
- 17 Hastings RC, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Fransblau, SG. Leprosy. *Clin Microb Rev* 1988; 1(3):330-48.
- 18 Pocaterra L, Jain S, Reddy R, Muzaffarullah S, Torres O, Suneetha S, Lockwood DN. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74(5):868-79.
- 19 Alcaïs A, Mira M, Casanova JL, Schurr E, Abel L. Genetic dissection of immunity in leprosy. *Curr Opin Immunol* 2005; 17(1):44-8.
- 20 Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The Continuing Challenges of Leprosy. *Clin Microbiol* 2006 ; 19(2): 338–81.
- 21 Sekar B. Recent Advances in immunodiagnosis of leprosy. *Indian J Lepr* 2007; 79(2-3):85-106.
- 22 Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet* 2004; 363(9416):1209-19.
- 23 Moschella SL. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51(3):417-26.
- 24 Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol* 2010; 22(1):48-54.
- 25 Ranque B, Alcaïs A, Thuc NV, Woynard S, Thai VH, Huong NT, Ba NN, Khoa PX, Schurr E, Abel L. A recessive major gene controls the Mitsuda reaction in a region endemic for leprosy. *J Infect Dis* 2005; 192(8):1475-82.
- 26 WHO Technical Advisory Group on Leprosy Control. Report of the Tenth Meeting of the WHO Technical Advisory Group on Leprosy Control. New Delhi: World Health Organization Regional Office for South-East Asia, 2009 [acesso em 14 Ago 2012]. Disponível em: < http://www.searo.who.int/LinkFiles/GLP_SEA-GLP-2009_5.pdf >

- 27 Kaimal S, Thappa DM. Relapse in leprosy. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2009; 75(2):126-35.
- 28 Merle CS, Cunha SS, Rodrigues LC. BCG vaccination and leprosy protection: review of current evidence and status of BCG in leprosy control. *Expert Rev Vaccines* 2010; 9(2):209-22.
- 29 Fine PEM, Carneiro IAM, Milstien JB, Clements CJ. Issues relating to the use of BCG in immunization programmes. WHO/B&V 1999 [acesso em 14 Ago 2012]. Disponível em: <<http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF99/www9943.pdf>>
- 30 Fine PE. Natural history of leprosy - aspects relevant to a leprosy vaccine. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1983; 51(4):553-55.
- 31 Schurr E, Alcaïs A, de Léséleuc L, Abel L. Genetic predisposition to leprosy: A major gene reveals novel pathways of immunity to *Mycobacterium leprae*. *Semin Immunol* 2006; 18(6):404-10.
- 32 Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborcht PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev* 2006; 77(3):189-202.
- 33 Feitosa MF, Krieger H. O futuro da epidemiologia genética de características complexas. *Ciência & Saúde Coletiva* 2002; 7(1):73-83.
- 34 Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:225-74.
- 35 Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade e Apresentação do Antígeno ao Linfócito T. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, editores. *Imunologia Celular e Molecular*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. P. 117-25.
- 36 Visentainer JE, Tsuneto LT, Serra MF, Peixoto PR, Petzl-Erler ML. Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern Brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30(1):51-9.
- 37 Marcos EVC, Souza FC, Ura S, Opromolla DVA. Estudo de associação entre antígenos HLA e reação hansênica tipo 1 ulcerada. *An Bras Dermatol* 2000;75(3):283-90.
- 38 Koçak M, Balci M, Peñçe B, Kundakçi N. Associations between human leukocyte antigens and leprosy in the Turkish population. *Clin Exp Dermatol* 2002; 27(3):235.
- 39 Marquet S, Schurr E. Genetics of susceptibility to infectious diseases: tuberculosis and leprosy as examples. *Drug Metab Dispos* 2001; 29(4 Pt 2):479-83.

- 40 Hegazy AA, Abdel-Hamid IA, Ahmed el-SF, Hammad SM, Hawas SA. Leprosy in a high-prevalence Egyptian village: epidemiology and risk factors. *Int J Dermatol* 2002; 41(10):681-86.
- 41 Shankarkumar U, Ghosh K, Badakere S, Mohanty D. Novel HLA Class I Alleles Associated with Indian Leprosy Patients. *J Biomed Biotechnol* 2003; 2003(3):208-11.
- 42 da Silva SA, Mazini PS, Reis PG, Sell AM, Tsuneto LT, Peixoto PR, Visentainer JE. HLA-DR and HLA-DQ alleles in patients from the south of Brazil: markers for leprosy susceptibility and resistance. *BMC Infect Dis* 2009; (9):134.
- 43 Franceschi DS, Tsuneto LT, Mazini PS, Sacramento WS, Reis PG, Rudnick CC, Clementino SL, Sell AM, Visentainer JE. Class-I human leukocyte alleles in leprosy patients from Southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44(5):616-20.
- 44 Kärre K. NK cells, MHC Class I molecules and the missing-self. *Scand J Immunol* 2002; 53(3):221-8.
- 45 Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing-self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11(7):237-44.
- 46 Rajagopalan S, Long EO. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *J Exp Med* 2005; 201(7):1025-29.
- 47 Moretta A, Tambussi G, Bottino C, Tripodi G, Merli A, Ciccone E, Pantaleo G, Moretta L. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3- CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. *J Ex Med* 1990; 171(3):695-714.
- 48 McVicar DW, Burshtyn DN. Intracellular signaling by the killer immunoglobulin-like receptors and Ly49. *Sci STKE* 2001; 2001(75):re1.
- 49 Rajagopalan S, Long EO. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med* 1999; 189(7):1093-1100.
- 50 O'Connor GM, Hart OM, Gardiner CM. Putting the natural killer cell in its place. *Immunology* 2006;117(1):1-10.
- 51 Boyton RJ, Altmann DM. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 149(1):1-8.
- 52 Boyington JC, Sun PD. A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol Immunol* 2002; 38(14):1007-21.

- 53 Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002; 190(1):40-52.
- 54 Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart CA, Beck S, Wilson MJ. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol Rev* 2001; 181(1):20-38.
- 55 Vanderborght PR, Cardoso CC. Susceptibilidade genética na hanseníase. In *Estudos de Associação HLA x Doenças: Extratos do II Simpósio Brasileiro. Capítulo 5.* Editora da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro; 2009. p.97.
- 56 Franceschi DS, Mazini PS, Rudnick CC, Sell AM, Tsuneto LT, de Melo FC, Braga MA, Peixoto PR, Visentainer JE. Association between killer-cell immunoglobulin-like receptor genotypes and leprosy in Brazil. *Tissue Antigens* 2008; 72(5):478-82.

CAPÍTULO II

INFLUÊNCIA DOS GENES KIR E SEUS LIGANTES HLA NA PATOGÊNESE DA HANSENÍASE EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA HIPERENDÊMICA.

Running title: Genes KIR e hanseníase.

Luciana Ribeiro Jarduli¹; Hugo Vicentin Alves¹; Fabiana Covolo de Souza²; Elaine Valim Camarinha Marcos²; Ana Carla Pereira²; Ida Maria Foschiani Dias-Baptista²; Vinícius Medeiros Fava³; Marcelo Távora Mira³; Milton Ozório de Moraes⁴; Marcos da Cunha Lopes Virmond²; Jeane Eliete Laguila Visentainer¹

¹Laboratório de Imunogenética, Departamento de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

²Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brasil.

³Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

⁴Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

* Address reprint requests to:

Prof. Dr. Jeane Eliete Laguila Visentainer

Universidade Estadual de Maringá - Departamento de Ciências Básicas da Saúde. Bloco T-20, sala 111.

Av. Colombo, 5790. Zona 07. Maringá, PR, Brazil – CEP 87020-900

Phone number: (+55 44) 3011-5392

E-mail address: jelvisentainer@gmail.br

RESUMO:

Introdução: O objetivo deste estudo foi investigar a associação de genes KIR na imunopatogênese da hanseníase. **Métodos:** As tipificações dos genes KIR e HLA foram realizadas pelo método de PCR-r SSOP Luminex em 408 pacientes e 413 contatos saudáveis. A análise estatística foi realizada pelo teste do Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher e por análise multivariada empregando-se o método *stepwise*. **Resultados:** Verificou-se uma maior frequência dos genes KIR ativatórios (*KIR2DS1*, *2DS2* e *3DS1*) na presença de seus ligantes HLA no grupo Tuberculóide (TT) em relação ao grupo Lepromatoso (LL). *KIR2DL2/2DL2 – C1* foi mais frequente no grupo *per se*, TT e LL em relação ao grupo de controles. Pacientes Borderline apresentaram maior frequência de pares inibitórios em relação ao grupo controle e maior frequência de pares ativatórios em relação à forma LL. A análise multivariada confirmou as associações encontradas no teste do qui-quadrado e revelou que o sexo feminino pode ser um fator protetor contra o desenvolvimento da doença e sua forma clínica mais grave. **Conclusão:** O estudo demonstrou que genes KIR ativatórios e inibitórios podem ter algum efeito no desenvolvimento da hanseníase, destacando-se a influência dos genes ativatórios na proteção contra a forma mais agressiva da doença, evidenciando o papel das células NK na imunopatologia da doença.

Palavras-Chave: Hanseníase. Genes KIR. Células NK.

INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica de evolução lenta causada pelo *Mycobacterium leprae*, cuja prevalência global vem diminuindo ao longo dos anos, devido à terapia com múltiplas drogas, com uma detecção de novos casos que permanece estável, aproximadamente, 250.000 novos casos a cada ano. Além disso, bolsões de alta endemicidade permanecem em países como o Brasil, Angola, África, Índia, Nepal e República Unida da Tanzânia [1].

No Brasil, a hanseníase é diagnosticada em todas as regiões do país, mantendo-se as regiões Norte e Centro-Oeste hiperendêmicas e a região Nordeste com alto parâmetro de endemicidade [2].

O modelo mais utilizado para classificação da doença é o de Ridley-Jopling que divide a doença em cinco formas polares e interpolares: Tuberculóide (TT), Borderline-Tuberculóide (BT), Borderline-Borderline (BB), Borderline-Lepromatosa (BL) e Lepromatosa ou Virchowiana (LL) [3]. Inicialmente, a doença apresenta-se de forma indeterminada, podendo regredir espontaneamente ou evoluir para um destes estágios. As manifestações clínicas da doença dependem de fatores como a capacidade de proliferação e multiplicação dos bacilos e da resposta imunológica apresentada pelo hospedeiro [4].

Ao longo dos anos, as pesquisas buscam conhecer a genética de predisposição à hanseníase *per se* e suas formas clínicas. O espectro clínico e patológico da hanseníase e a heterogeneidade epidemiológica, geográfica e étnica podem ser explicados pelas diferenças genéticas na resistência do hospedeiro. Enquanto alguns *loci* afetam a susceptibilidade intrínseca à hanseníase (hanseníase *per se*), outros modificam a forma clínica da doença [5]. Entre os genes candidatos à resistência/susceptibilidade do indivíduo à hanseníase, estão os genes KIR, que compreendem uma região de, aproximadamente, 150 Kb na região do LCR (*Leukocyte Receptor Complex*) do cromossomo 19q13.4, os quais codificam os receptores KIR (*Killer Immunoglobulin-Like Receptor*), membros de um grupo de moléculas regulatórias presentes na superfície de células NK [6].

Os receptores KIR são os principais reguladores funcionais das células NK (*Natural Killer*) e a atividade destas células efectoras é determinada pelo balanço entre sua ativação e

inibição que ocorre pela ligação de receptores KIR com as moléculas HLA de Classe I, presentes em todas as células nucleadas de um indivíduo [7]. Grande parte dos receptores KIR liga-se às moléculas HLA-C. Receptores inibitórios KIR2DL2 e KIR2DL3 interagem com HLA-C do grupo 1 enquanto KIR2DL1 reconhece HLA-C do grupo 2. Na ausência destes receptores inibidores, as células NK podem ser ativadas por meio de receptores ativatórios, tais como, KIR2DS1 e KIR2DS2 [8]. O genótipo de um indivíduo pode predispor a determinadas interações KIR/HLA que podem variar da inibição até ativação, dependendo de qual padrão KIR/HLA está presente [9].

É de nosso conhecimento, que até o momento, apenas um trabalho relatou a associação entre genes KIR e seus ligantes HLA na evolução da hanseníase, conduzido por Franceschi *et al.* [10], o qual avaliou 165 pacientes brasileiros da região sul do Brasil.

O objetivo deste trabalho foi investigar a associação dos genes KIR e seus ligantes HLA no desenvolvimento da hanseníase e suas formas clínicas em pacientes de uma região hiperendêmica, do município de Rondonópolis, Mato Grosso, localizado na região Centro-Oeste do país, visando esclarecer mecanismos imunopatogênicos do *M. leprae*.

METODOLOGIA

População e Coleta de Dados Epidemiológicos

Esta investigação foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Lauro Souza Lima de Bauru, São Paulo, Brasil, e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Todos os participantes foram contatados e esclarecidos com relação à pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para participação no estudo. As informações para caracterização epidemiológica foram coletadas nas Unidades Básicas de Saúde por meio de aplicação de questionário, investigação em prontuários e fichas de notificação, entre 2006 e 2009.

Este estudo de associação caso-controle foi realizado com uma população de Rondonópolis (Região Centro-Oeste, Estado do Mato Grosso, Brasil: latitude 16°28'15" sul e longitude 54°38'08 oeste). A amostra consistiu de 408 pacientes com hanseníase (250 homens e 158 mulheres), com idade mediana de 41 anos, atendidos nas Unidades de Saúde do município de Rondonópolis, MT, Brasil. Os pacientes foram classificados em grupos distintos segundo os critérios Ridley-Jopling [3]: LL (5,14%), Borderline (BL = 15,4%; BB = 25,8%; BT = 39,4%) e TT (14,7%), sendo que 25 pacientes (6,12%) apresentaram a forma

indeterminada da doença. O grupo controle foi composto por 413 indivíduos saudáveis (249 homens e 164 mulheres), com idade mediana de 42 anos. Para composição do grupo controle, foram adotados os seguintes critérios: ter contato domiciliar com pacientes com hanseníase, não ser aparentado do caso índice, convivência com o caso índice por mais de cinco anos, apresentar resultados de avaliação imunológica (anti-PGL-1 e reação de Mitsuda) e clínica negativos, para excluir o risco de adoecimento e não apresentar história de infecções crônicas, inflamação e doenças autoimunes. Ainda no grupo controle, foi respeitada a proporção de composição do grupo de casos com relação à etnia, gênero, idade e mesma região geográfica dos casos.

Extração de DNA

Após a coleta venosa de 5 mL de sangue periférico com o anticoagulante EDTA, a extração e purificação do DNA foram realizadas pela precipitação seletiva conforme descrito por John *et al.* [11].

Tipificação dos genes KIR e alelos HLA de Classe I

Após avaliação da pureza e ajuste da concentração do DNA (20 ng), a tipificação dos genes KIR e dos alelos HLA de Classe I (HLA-A, -B, -C) foi realizada pela metodologia PCR-SSOP (*Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific of Oligonucleotides Probes*), empregando-se o kit LabType® SSO (One Lambda, San Diego, CA,USA). O produto amplificado foi hibridizado com microesferas ligadas a sondas específicas para os genes KIR e para os alelos HLA de Classe I. As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo pela tecnologia LUMINEX® e os resultados foram analisados pelo programa HLA Fusion™ (One Lambda, San Diego, CA,USA).

Análise Estatística

As frequências dos genes KIR e dos alelos HLA de Classe I foram obtidas por contagem direta e as comparações destas frequências entre pacientes e controles foram realizadas por meio do teste de qui-quadrado com correção de Yates ou pelo Teste Exato de Fisher, utilizando-se a tabela de contingência 2x2, com intervalo de confiança (IC) de 95%. O risco de desenvolver hanseníase e suas formas clínicas foi calculado por meio da determinação de OD (*odds ratio*) para valores de $P < 0,05$, de acordo com Wolf [12], por meio do programa OpenEpi v. 2.3.1. (<http://www.openepi.com/OE2.3/Menu/OpenEpiMenu.htm>).

Subsequentemente, realizou-se uma análise de regressão logística multivariada, empregando-se o método *stepwise* para análise dos dados. Os pacientes foram comparados com suas formas clínicas entre si e com indivíduos controles, para analisar o efeito conjunto das variáveis: idade, gênero, etnia e genes KIR, por meio do software IBM® SPSS® Statistics 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA), assumindo-se o nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS

As características da população de estudo referentes à idade, gênero e grupo étnico estão apresentadas na Tabela 1. A mediana de idade apresentou-se equivalente entre todos os grupos, sendo a mediana de idade do grupo TT a mais baixa. Houve predomínio de indivíduos do sexo masculino para os grupos *per se* (61,2%), LL (80,9%), Borderline (64,2%) e controles (60,2%), com diferença para o grupo TT que apresentou mais indivíduos do gênero feminino (58,3%) em relação ao masculino (41,6%). Com relação à distribuição do grupo étnico, houve predomínio de indivíduos pardos, seguidos de brancos e negros para todos os grupos (*per se*, LL, Borderline, TT e controles), com proporção equivalente entre eles.

Com relação à distribuição das frequências dos genes KIR (Tabela 2), observou-se diferença significativa para o gene *KIR2DL1* na comparação entre os grupos *per se* vs. controles (87,0% vs. 96,2%, $P < 0,001$; OR = 0,3; IC = 0,2 – 0,5) e Borderline vs. controles (86,0% vs. 96,2%, $P < 0,001$; OR = 0,2; IC = 0,1 – 0,5). Verificou-se também uma tendência ($P = 0,07$) para associação positiva do gene ativatório *KIR3DS1* com a forma TT em relação à LL (43,3% vs. 19,0%).

Os dados da distribuição dos genes KIR juntamente com seus ligantes HLA de Classe I correlacionados estão apresentados na Tabela 3. Para o haplótipo *KIR2DS2 – C1* ativatório, os grupos de pacientes *per se* e TT demonstraram maior frequência (27,2% e 33,3%, respectivamente) em relação ao grupo controle (20,5%), encontrando-se para *per se* vs. controles ($P = 0,031$; OR = 1,4; IC = 1,0 – 2,0) e para TT vs. controles ($P = 0,045$; OR = 1,9; IC = 1,1 – 3,5). Para os genes inibitórios, quando *KIR2DL2* estava em homozigose na presença de C1 (*KIR2DL2/2DL2 – C1*) observou-se uma maior frequência no grupo *per se* em comparação ao grupo controle (5,4% vs. 2,2%, $P = 0,024$; OR = 2,6; IC = 1,2 – 5,6) e maior frequência nas formas clínicas TT (8,3%, vs. 2,8% $P = 0,045$; OR = 4,1; IC = 1,3 – 12,6) e LL (14,2% vs. 2,17%, $P = 0,032$; OR = 7,5; IC = 1,9 – 30,1) em comparação ao grupo controle. Na análise do haplótipo *KIR2DL2/2DL3* com seu ligante C1 em homozigose (*KIR2DL2/2DL3*

– *C1/C1*), sua frequência apresentou-se menor no grupo *per se* em comparação com o grupo controle (13,7% vs. 19,8%, $P = 0,023$; OR = 0,6; IC = 0,4 – 0,9).

Foi realizada uma análise com o número de pares KIR – HLA de Classe I, inibitórios e ativatórios, a fim de investigar sua influência no desenvolvimento da hanseníase e suas formas clínicas (Figura 1). Quando apenas um par de ligante inibitório estava presente, foi significativa a comparação entre o grupo *per se* e o grupo controle (16,9% vs. 10,1%, $P = 0,006$; OR = 1,8; IC = 1,2 – 2,7) e entre o grupo de Borderline com o grupo controle (17,8% vs. 10,1%, $P < 0,001$; OR = 2,3, IC = 1,5 – 3,6). Quando dois pares estavam presentes, observou-se significância para TT vs. controles (28,3% vs. 36,7%, $P = 0,001$; OR = 0,4, IC = 0,2 – 0,8). Já na análise dos pares de ligantes KIR – HLA de Classe I ativatórios, para apenas um par, encontrou-se significância na comparação entre o grupo TT vs. controles (46,6% vs. 32,6%, $P = 0,047$; OR = 1,8; IC = 1,0 – 3,1). Na presença de dois pares, encontrou-se significância na comparação entre os grupos TT vs. LL (20,0% vs. 0%, $P = 0,024$; OR = 11,0; IC = 0,6 – 19,8) e Borderline vs. LL (17,2% vs. 0%, $P = 0,034$; OR = 9,0; IC = 0,5 – 15,1).

Por fim, foi realizada uma análise de regressão logística multivariada através do método *stepwise* [13], para investigar a relação entre as variáveis idade, gênero e grupo étnico, somadas ao fator genético (genes KIR), no desenvolvimento da hanseníase e suas formas clínicas (Tabela 4). Com relação ao fator genético, foram incluídos na análise, somente os resultados significativos da análise do qui-quadrado.

De acordo com a Tabela 4, a variável gênero mostrou diferença significativa entre os grupos: LL vs. controles, TT vs. controles, TT vs. Borderline e TT vs. LL. Para a variável etnia, encontrou-se associação apenas na comparação entre TT vs. controles e TT vs. Borderline. O gene *KIR2DL1* foi associado negativamente nas comparações entre: *per se* vs. controles ($\beta = -2,2$; OR = 0,1) LL vs. controles ($\beta = -2,8$; OR = 0,06), TT vs. controles ($\beta = -3,7$; OR = 0,02) e TT vs. Borderline ($\beta = -1,8$; OR = 0,1). Já na presença de seu ligante C2 em homozigose, *KIR2DL1-C2/C2*, foi associado positivamente entre os grupos *per se* vs. controles ($\beta = 0,4$; OR = 1,5), TT vs. controles ($\beta = 1,6$; OR = 5,0) e TT vs. Borderline ($\beta = 1,9$; OR = 6,9). O gene *KIR2DL2-C1* foi significativo para TT vs. controles e TT vs. Borderline. Já *KIR2DL2/2DL2-C1*, associou-se positivamente nas comparações LL vs. controles ($\beta = 1,6$; OR = 5,0) e TT vs. controles ($\beta = 1,1$; OR = 3,2) e negativamente entre os grupos Borderline vs. LL ($\beta = -1,5$; OR = 0,2). O par ativatório *KIR2DS2-C1*, apresentou-se significativo apenas para *per se* vs. controles ($P = 0,002$).

Quando somente os ligantes HLA dos genes KIR foram avaliados nos grupos, não foram encontradas diferenças significativas nas suas frequências. Verificou-se também uma distribuição homogênea dos haplótipos de KIR, classificados como AA e Bx, nos pacientes e controles.

DISCUSSÃO

O estudo do impacto da genética em doenças infecciosas como a hanseníase, em regiões endêmicas, é de extrema importância, pois oferece informações sobre a contribuição de fatores genéticos do hospedeiro para o desenvolvimento da doença e o ambiente em que ele vive. Historicamente no Brasil, a região Centro-Oeste sempre registrou as maiores taxas de detecção de novos casos de hanseníase e evolução mais desfavorável da endemia no Brasil [14]. Em um estudo recente conduzido por Magalhães *et al.* [15], em que avaliou-se o comportamento da hanseníase no estado do Mato Grosso, os dados revelaram uma evolução da doença relacionada ao processo de ocupação do território mato-grossense através de sucessivas migrações, alterando sua estrutura epidemiológica, devido às limitadas condições de vida da população migrante, associadas a outros fatores relacionados ao processo de infecção da doença.

No presente estudo, verificou-se que os homens foram mais acometidos pela hanseníase do que as mulheres, a literatura apresenta resultados divergentes em relação à prevalência da hanseníase segundo o gênero [16-17]. Alguns autores afirmam que o maior contato social entre homens e sua frequente exposição em ambientes de risco pode contribuir para elevar o número de casos [18]. Outros autores afirmam que a predominância da doença no sexo masculino não é universal e que, quando relacionados às reações hansenianas, o sexo feminino, a gravidez e a amamentação são fatores de risco para a ocorrência, ressaltando características imunológicas e genéticas presentes no indivíduo com a doença [17]. Na avaliação do grupo étnico, a maior frequência foi de pardos, seguidos pelos brancos, revelando uma maior proporção da raça/cor parda entre a população mato-grossense. Tanto a média quanto a mediana da idade apresentaram-se equivalentes entre todos os grupos (*per se*, LL, Borderline, TT e controles), demonstrando um ótimo pareamento entre os grupos de casos e controles.

Na análise da distribuição das frequências dos genes KIR, destacam-se os resultados dos genes ativatórios na comparação entre as formas TT e LL, tanto separadamente quanto na presença de seus ligantes HLA correlacionados. A Figura 2 ilustra a comparação entre estas

duas formas clínicas com relação aos genes ativatórios e seus ligantes, observando-se uma maior frequência de todas as combinações KIR-HLA na forma tuberculóide em relação à forma lepromatosa, diferindo apenas na combinação *KIR2DS2-C1/C1*, corroborando com os resultados encontrados por Franceschi *et al.* [10]. Com relação aos resultados dos genes ativatórios (Tabela 2), os genes *KIR2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS5* e *3DS1* estavam mais frequentes no grupo TT em relação à LL, encontrando-se uma tendência de associação apenas para o gene *KIR3DS1* (43,3% vs. 19,0%). Estes resultados também estão de acordo com os resultados descritos por Franceschi *et al.* [10], que reportaram uma maior frequência dos genes *KIR2DS1*, *2DS2*, *2DS3* e *2DS4* nos pacientes TT em relação aos LL.

O passo inicial para a eliminação do *M. leprae* envolve a participação efetiva do sistema imune inato, e dentro deste contexto, as células NK, exercem um papel relevante. A ativação das células NK resulta na produção de IFN- γ , principal citocina envolvida na ativação de macrófagos, promovendo, assim, a morte das micobactérias fagocitadas. Além disso, a estimulação dos macrófagos pelo IFN- γ resulta na produção de TNF, o qual juntamente com IFN- γ contribui com a atividade dessas células contra a micobactéria [22]. A maior frequência dos genes ativatórios no grupo de pacientes tuberculóides, em relação ao grupo lepromatoso, pode promover uma ativação mais eficiente das células NK, resultando em baixa carga bacilar, e, conseqüentemente, em menos lesões de pele e nervos, resultado numa doença mais branda, protegendo-os contra a forma mais grave da doença.

Ainda na análise dos genes KIR ativatórios, houve significância para o par *KIR2DS2 – C1* que se apresentou mais frequente no grupo *per se* e no grupo TT, em relação ao grupo controle. É importante ressaltar a presença de forte desequilíbrio de ligação entre *KIR2DL2* e *KIR2DS2* [9], o qual foi confirmado neste estudo. As frequências do haplótipo *KIR2DL2/2DS2* foram maiores do que o esperado no grupo *per se* e no grupo controle. No grupo *per se*, a frequência observada de *KIR2DL2/2DS2* foi de 51,4%, enquanto a frequência esperada foi de 37,5% ($P = 0,001$). O grupo controle apresentou uma frequência observada de 45,4% e uma frequência esperada de 34,6% ($P = 0,002$). Não houve significância entre a distribuição do haplótipo *KIR2DL2/2DS2* para o grupo TT, porém, neste grupo a frequência do gene *KIR2DL2* foi elevada (80,0%). Considerando a presença do desequilíbrio de ligação entre estes dois genes, a presença de associação pode ser atribuível ao gene *KIR2DL2*, tanto para o grupo *per se* quanto para o grupo TT. No trabalho de Franceschi *et al.* [10], *KIR2DS2-C1* não foi associado com o desenvolvimento da hanseníase e suas formas clínicas.

A função dos genes KIR na resposta imune é altamente dependente das moléculas HLA expressas na superfície das células alvo, sendo que esta interação KIR-HLA pode resultar na ativação ou inibição das células NK. O reconhecimento de moléculas HLA específicas pelos receptores KIR inibidores está estabelecido [19], existindo uma hierarquia de inibição das moléculas KIR2DL: 2DL1–C2/C2, possui maior potencial inibitório, seguido de 2DL2–C1 e 2DL3–C1 [21]. Neste trabalho, encontrou-se uma tendência de associação para *KIR2DL1 – C2/C2* na comparação entre as formas BL e BT (26,9% vs. 17,3%). As duas formas clínicas são opostas, estando BL mais próximo do polo lepromatoso. Os resultados sugerem que nestes pacientes possa ocorrer uma maior inibição das células NK, levando a uma manifestação mais grave da doença.

Verificou-se a distribuição dos genes inibitórios *KIR2DL2* e *KIR2DL3* em homozigose e heterozigose, assumindo a hipótese de que estes genes segregam como alelos de um mesmo locus [20-21]. Resultados interessantes foram encontrados para *KIR2DL2/2DL2 – C1*; sua frequência foi maior em todos os grupos em relação ao grupo controle, embora tenha sido significativa somente nos grupos *per se*, TT e LL. O grupo LL apresentou a maior frequência (14,2%), seguido do grupo TT (8,3%) e por último o grupo *per se* (5,4%), que sugere que o efeito inibitório de *KIR2DL2/2DL2 – C1* pode contribuir para o desenvolvimento da hanseníase, mas principalmente contribuir para um pior prognóstico na infecção contra o *M. leprae*.

É considerável destacar os resultados observados na análise do número de pares de ligantes KIR – HLA. O grupo *per se* demonstrou um perfil mais inibitório, pela presença em maior frequência de apenas um par inibitório em relação ao grupo controle (16,9% vs. 10,1%), o que pode favorecer o desenvolvimento da doença. Resultado similar foi encontrado para o grupo de pacientes Borderline em relação ao grupo controle (17,8% vs. 10,1%). Significativamente, na análise dos pares de ligantes ativatórios, dois pares estavam presentes em maior frequência nos pacientes Borderline em relação aos pacientes LL (17,2% vs. 0%). As formas interpolares, denominadas Borderline, compreendem a maioria dos casos. A análise dos pares de ligantes KIR-HLA para este grupo revelou um perfil mais inibitório em relação ao grupo controle, somado a um perfil mais ativatório em relação ao grupo LL. Estes indivíduos apresentam como característica instabilidade imunológica contra a micobactéria, o que faz com que haja grande variação em suas manifestações clínicas, seja na pele, nervos, ou no comprometimento sistêmico. O equilíbrio entre ativação/inibição de células NK pode explicar as características indefinidas observadas nestes pacientes. Além disso, encontrou-se

significância na comparação entre os grupos TT vs. LL (20,0% vs. 0%) com relação ao número de pares ativatórios, confirmado pelos resultados apresentados na Figura 2. A presença de mais pares ativatórios no grupo TT em relação ao grupo LL ressalta os dados já descritos neste trabalho, com relação à melhor resposta imune do grupo tuberculóide frente ao grupo lepromatoso.

O resultado da análise multivariada, além de confirmar a influência dos genes KIR e seus ligantes HLA na imunopatologia da hanseníase e seus subtipos, demonstrou a influência da variável gênero. Interessantemente, o grupo LL apresentou uma associação negativa com relação à variável gênero, em comparação com o grupo controle ($\beta = -2,2$; OR = 0,1). Pacientes LL apresentaram uma menor frequência de indivíduos do gênero feminino em comparação com o grupo controle (19,0% vs. 37,7%). Por outro lado, o grupo TT demonstrou associação positiva nas três comparações cuja variável gênero foi significativa: TT vs. controles ($\beta = 0,7$; OR = 2,1), TT vs. Borderline ($\beta = 0,9$; OR = 2,5) e TT vs. LL ($\beta = 1,7$; OR = 5,9). Entre todos os grupos, o grupo TT foi o único que apresentou mais indivíduos do sexo feminino em relação ao sexo masculino (58,3% vs. 41,6%). Estes resultados sugerem que o gênero feminino parece ser um fator protetor contra a forma mais grave e disseminada da doença, além de contribuir para sua manifestação mais branda, susceptível ao polo tuberculóide. O padrão de resposta imune específica difere entre homens e mulheres para as doenças infecciosas e autoimunes. O estrógeno, hormônio sexual feminino, pode aumentar a produção de INF- γ e de IL-2, influenciando a resposta imunológica nas mulheres. O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) está envolvido na maturação do timo, além de exercer um potente efeito estimulador levando ao aumento de IL-2 e seu receptor (IL-2R), de INF- γ e ativação auxiliar de células T CD4+ [23]. Já os andrógenos masculinos, estão relacionados com a inibição da resposta imune das células T e B, sendo encontrados em baixos níveis em homens portadores de doenças autoimunes como o lúpus [24].

Com relação à variável etnia, a análise multivariada demonstrou associação positiva entre os grupos TT vs. controles ($\beta = 0,3$; OR = 1,4) e TT vs. Borderline ($\beta = 0,4$; OR = 1,5), O grupo TT apresentou uma maior frequência de indivíduos pardos (71,6%), em relação aos controles (62,7%) e ao grupo de pacientes Borderline (58,2%), e esta diferença possa ter ocasionado resultado significativo nesta análise. É possível que as migrações que ocorreram durante a ocupação do estado de Mato Grosso, possam ter influenciado na composição étnica da população, visto que os indivíduos classificados como pardos possuem ascendência mestiça, resultante da miscigenação entre afrodescendentes e indígenas.

O gene *KIR2DL1* que se apresentou significativo nas comparações entre os grupos *per se* e Borderline com o grupo controle na análise do qui-quadrado, foi significativo em algumas comparações na análise multivariada, porém, em ambas as análises, os resultados não foram correlacionados com o desenvolvimento da doença e seus subtipos. *KIR2DL1 - C2/C2*, que não apresentou associação na análise do qui-quadrado, foi significativo para *per se vs.* controles ($P = 0,022$), TT *vs.* controles ($P = 0,001$) e TT *vs.* Borderline ($P = 0,001$), todavia, isto não implicou em associações com a doença e suas formas clínicas. O par inibitório *KIR2DL2/2DL2 - C1*, que se demonstrou significativo na análise do qui-quadrado, apresentou significância na análise multivariada nas comparações entre LL *vs.* controles ($P = 0,042$) e Borderline *vs.* LL ($P = 0,024$), sendo que para TT *vs.* controles ($P = 0,059$) encontrou-se tendência. A significância de *KIR2DL2-C1* apresentada na multivariada pode ser devido à maior frequência deste par no grupo TT (45,0%) em relação ao grupo LL (38,0%) e ao grupo controle (32,4%), sem haver, entretanto, implicações na patogênese da doença. Resultado equivalente observou-se para *KIR2DS2-C1*, cuja significância encontrada para *per se vs.* controles, provavelmente, seja devido ao desequilíbrio de ligação com *KIR2DL2* relatado neste estudo, para os dois grupos.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que genes KIR ativatórios e inibitórios, na presença de seus ligantes HLA cognatos, podem ter algum efeito sobre o desenvolvimento da hanseníase e suas formas clínicas, destacando-se neste estudo, a forte presença dos genes ativatórios no grupo tuberculóide. O balanço entre genes ativatórios e inibitórios, podem interferir na progressão da doença para uma forma mais branda ou mais agressiva, ou ainda variar entre os dois polos, apresentando formas indeterminadas, evidenciando o papel das células NK na imunopatologia da doença.

O destaque desse estudo foi identificar o perfil de pacientes com hanseníase provenientes de uma área hiperendêmica do país e compará-los a um grupo de contatos saudáveis extremamente pareados com os pacientes.

AGRADECIMENTOS

Às equipes do Instituto Lauro de Souza Lima de Bauru, do Laboratório de Imunogenética da UEM e das Unidades Básicas de Saúde de Rondonópolis.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Lauro Souza Lima de Bauru e Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Global leprosy situation. *Wkly Epidemiol Rec* **2012**; 87:317-328.
2. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil, 2001-2006. Portal da Saúde; 2006. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/poster_hansen_brasil.pdf. Acesso em 30 Mar 2012.
3. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepro Other Mycobact Dis* **1966**; 34:255-273.
4. Alter A, Grant A, Abel L, Alcaïs A, Schurr E. Leprosy as a genetic disease. *Mamm Genome* **2011**; 22:19-31.
5. Misch EA, Berrington WR, Vary JC, Hawn TR. Leprosy and the human genome **2010**; 74:589-620.
6. Schurr E, Alcaïs A, de Léséleuc L, Abel L. Genetic predisposition to leprosy: A major gene reveals novel pathways of immunity to *Mycobacterium leprae*. *Semin Immunol* **2006**; 18:404-410.
7. Rajagopalan S, Long EO. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *J Exp Med* **2005**; 201:1025-1029.
8. McVicar DW, Burshtyn DN. Intracellular signaling by the killer immunoglobulin-like receptors and Ly49. *Sci STKE* **2001**; 2001:re1.
9. Rajalingam R. Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease. *Korean J Hematol* **2011**; 46:216-228.
10. Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol* **1998**; 161:571-577.
11. Carrington M, Martin MP. The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **2006**; 298:225-257.
12. Franceschi DS, Mazini PS, Rudnick CC *et al.* Association between killer-cell immunoglobulin-like receptor genotypes and leprosy in Brazil. *Tissue Antigens* **2008**; 72:478-482.
13. John SW, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res* **1991**; 19:408.

14. Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* **1995**; 19:251-253.
15. Hosmer, DW, Lemeshow, S. *Applied Logistic Regression*. John Wiley & Sons, New York **1989**; 10:1162-1163.
16. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Hanseníase: Informe Epidemiológico. 1ª ed. Brasília, 2008. Disponível em: www.portal.saude.gov.br/arquivos/pdf/boletim-novembro.pdf. Acesso em 29 Out 2012.
17. Magalhães MCC, Santos ES, Queiroz ML, Lima ML, Borges RCM, *et al*. Migração e hanseníase em Mato Grosso. *Rev bras epidemiol* **2011**; 14:386-397.
18. Miranzi SSC, Pereira LHM, Nunes AA. Perfil epidemiológico da hanseníase em um município brasileiro, no período de 2000 a 2006. *Rev Soc Bras Med Trop* **2010**; 43:62-
19. Lima HMN, Sauaia N, Costa VRL, *et al*. Perfil epidemiológico dos pacientes com hanseníase atendidos em Centro de Saúde em São Luís, MA. *Rev Bras Clin Med* **2010**; 8:323-327.
20. Silva AR, Matos WB, Silva CCB, *et al*. Hanseníase no município de Buriticupu, estado do Maranhão: busca ativa de casos na população adulta. *Rev Soc Bras Med Trop* **2010**; 43:691-694.
21. Long EO, Rajagopalan S: HLA class I recognition by killer cell Ig-like receptors. *Semin Immunol* **2000**; 12:101-108.
22. Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* **2005**; 5:201-214.
23. Khakoo SI, Carrington M. KIR and disease: a model system or system of models? *Immunol Rev* **2006**; 214:186-201.
24. Carrington M, Martin MP. The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **2006**; 298:225-257.

TABELAS

Tabela 1. Distribuição da população dos pacientes e indivíduos saudáveis com relação às formas clínicas da hanseníase, idade, gênero e etnia.

		<i>Per se</i> N = 408	LL N = 21	Borderline N = 302	TT N = 60	Controles N = 413
Idade	(Média ± SD)	42,0±16,4	45,7±15,2	42,8±15,9	37,4±16,8	42,0±14,5
	(Mediana)	41	45	42	37	42
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Gênero	Masculino	250 (61,2)	17 (80,9)	194 (64,2)	25 (41,6)	249 (60,2)
	Feminino	158 (38,7)	4 (19,0)	108 (35,7)	35 (58,3)	164 (37,7)
Etnia	Branco	146 (35,7)	8 (38,0)	115 (38,0)	14 (23,3)	137 (28,3)
	Negro	16 (3,92)	0 (0,0)	11 (3,64)	3 (5,0)	17 (4,11)
	Pardo	246 (60,2)	13 (61,9)	176 (58,2)	43 (71,6)	259 (62,7)

NOTA: Distribuição dos pacientes classificados segundo critérios de Ridley & Joplin: Hanseníase (*per se*), Tuberculóide (TT), Borderline (BL, BB, BT) e Lepromatosa (LL); de acordo com a idade, gênero (masculino e feminino) e grupo étnico (brancos, negros e pardos). Valores entre parênteses correspondem às porcentagens de cada variável.

Tabela 2. Distribuição das frequências dos genes KIR em pacientes com hanseníase e suas formas clínicas e controles saudáveis na população de Rondonópolis, MT.

Genes	<i>Per se</i> N = 408 n (%)	LL N = 21 n (%)	Borderline N = 302 n (%)	TT N = 60 n (%)	Controles N = 413 n (%)
<i>KIR2DL1</i>	355 (87,0) ^a	19 (90,4)	260 (86,0) ^a	56 (93,3)	397 (96,2) ^a
<i>KIR2DL2</i>	290 (72,0)	14 (66,6)	209 (69,2)	48 (80,0)	300 (72,6)
<i>KIR2DL3</i>	363 (88,9)	18 (85,7)	272 (90,0)	53 (88,3)	380 (92,0)
<i>KIR2DL4</i>	405 (99,2)	21 (100)	300 (99,3)	60 (100)	409 (99,0)
<i>KIR2DL5</i>	227 (55,6)	8 (38,0)	167 (55,2)	36 (60,0)	225 (54,4)
<i>KIR3DL1</i>	388 (95,0)	21 (100)	286 (94,7)	58 (96,6)	392 (94,9)
<i>KIR3DL2</i>	405 (99,2)	21 (100)	301 (99,6)	59 (98,3)	413 (100)
<i>KIR3DL3</i>	406 (99,5)	21 (100)	301 (99,6)	60 (100)	413 (100)
<i>KIR2DS1</i>	151 (37,0)	5 (23,8)	112 (37,0)	25 (41,6)	156 (37,7)
<i>KIR2DS2</i>	215 (52,6)	10 (47,6)	159 (52,6)	30 (50,0)	197 (47,6)
<i>KIR2DS3</i>	123 (30,1)	4 (19,0)	90 (29,8)	19 (31,6)	129 (60,5)
<i>KIR2DS4</i>	387 (94,8)	21 (100)	286 (94,7)	57 (95,0)	386 (93,4)
<i>KIR2DS5</i>	144 (35,2)	5 (23,8)	107 (35,4)	23 (38,3)	157 (38,0)
<i>KIR3DS1</i>	148 (36,2)	4 (19,0) ^b	107 (35,4)	26 (43,3) ^b	153 (37,0)

NOTA: Os dados representam o número de genes KIR e os valores entre parênteses correspondem às percentagens de cada gene.

TT: Tuberculóide, Borderline (BL, BB, BT), LL: Lepromatosa.

^a Para *KIR2DL1*: $P < 0,001$, OR = 0,26 (0,15 – 0,48) para *per se* vs. controles e $P < 0,001$, OR = 0,24 (0,13 – 0,45) para Borderline vs. controles.

^b Para *KIR3DS1*: $P = 0,07$ (tendência) para TT vs. LL.

Tabela 3. Frequências dos genes KIR na presença de seus ligantes HLA de Classe I em pacientes com hanseníase e suas formas clínicas e contatos saudáveis na população de Rondonópolis, MT.

<i>KIR – HLA de Classe I</i>	<i>Per se</i> N = 408 n (%)	LL N = 21 n (%)	Borderline N = 302 n (%)	TT N = 60 n (%)	Controles N = 413 n (%)
<i>KIR2DL1 – C2</i>	173 (42,4)	10 (47,6)	121 (40,0)	29 (48,3)	188 (45,5)
<i>KIR2DL1 – C2/C2</i>	82 (20,0)	5 (23,8)	59 (19,5)	14 (23,3)	79 (19,1)
<i>KIR2DL2 – C1</i>	145 (35,5)	8 (38,0)	95 (31,4)	27 (45,0)	134 (32,4)
<i>KIR2DL2 – C1/C1</i>	71 (17,4)	2 (9,52)	56 (18,5)	11 (18,3)	95 (23,0)
<i>KIR2DL3 – C1</i>	174 (42,6)	9 (42,8)	128 (42,3)	26 (43,3)	184 (44,5)
<i>KIR2DL3 – C1/C1</i>	92 (22,5)	3 (14,2)	71 (23,5)	13 (21,6)	116 (28,0)
<i>KIR3DL1 – Bw4</i>	153 (37,5)	7 (33,3)	118 (39,0)	18 (30,0)	164 (39,7)
<i>KIR3DL1 – Bw4/Bw4</i>	44 (10,7)	2 (9,52)	33 (10,9)	7 (11,6)	54 (13,0)
<i>KIR3DL2 – A*03/*11</i>	99 (24,2)	4 (19,0)	74 (24,5)	15 (25,0)	86 (20,8)
<i>KIR2DS1 – C2</i>	70 (17,1)	2 (9,52)	48 (15,8)	14 (23,3)	74 (17,9)
<i>KIR2DS1 – C2/C2</i>	38 (9,31)	2 (9,52)	27 (8,94)	7 (11,6)	25 (6,05)
<i>KIR2DS2 – C1</i>	111 (27,2) ^a	5 (23,8)	74 (24,5)	20 (33,3) ^a	85 (20,5) ^a
<i>KIR2DS2 – C1/C1</i>	51 (12,5)	3 (14,2)	39 (12,9)	6 (10,0)	60 (14,5)
<i>KIR3DS1 – Bw4</i>	57 (13,9)	1 (4,76)	46 (15,2)	7 (11,6)	59 (14,2)
<i>KIR3DS1 – Bw4/Bw4</i>	21 (5,14)	1 (4,76)	16 (5,29)	4 (6,66)	23 (5,56)
<i>KIR2DL2/2DL2 – C1</i>	22 (5,39) ^b	3 (14,2) ^b	10 (3,31) ^b	5 (8,33) ^b	9 (2,17) ^b
<i>KIR2DL2/2DL2 – C1/C1</i>	14 (3,43)	0 (0,0)	11 (3,64)	2 (3,33)	10(2,42)
<i>KIR2DL2/2DL3 – C1</i>	122 (29,9)	6 (28,5)	88 (29,1)	19 (31,6)	124(30,0)
<i>KIR2DL2/2DL3 – C1/C1</i>	56 (13,7) ^c	2 (9,52)	43 (14,2)	11 (18,3)	82 (19,8) ^c
<i>KIR2DL3/2DL3 – C1</i>	55 (13,4)	4 (19,0)	44 (14,5)	5 (8,33)	62 (15,0)
<i>KIR2DL3/2DL3 – C1/C1</i>	34 (8,33)	1 (4,76)	25 (8,27)	4 (6,66)	32 (7,74)

NOTA: Os dados representam o número de genes KIR com seus respectivos ligantes HLA de Classe I; os valores entre parênteses correspondem às porcentagens de cada par KIR-HLA de Classe I.

TT: Tuberculóide, Borderline (BL, BB, BT), LL: Lepromatosa.

^a Para *KIR2DS2 – C1*: $P = 0,031$, OR = 1,4 (1,0 – 2,0) para *per se* vs. controles; $P = 0,045$, OR = 1,9 (1,1 – 3,5) para TT vs. controles.

^b Para *KIR2DL2/2DL2 – C1*: $P = 0,024$, OR = 2,6 (1,2 – 5,6) para *per se* vs. controles; $P = 0,045$, OR = 4,1 (1,3 – 12,6) para TT vs. controles; $P = 0,032$, OR = 7,5 (1,9 – 30,1) para LL vs. controles; $P = 0,057$ (tendência) para Borderline vs. LL.

^c Para *KIR2DL2/2DL3 – C1/C1*: $P = 0,023$, OR = 0,6 (0,4 – 0,9) para *per se* vs. controles.

Tabela 4. Análise de regressão logística *stepwise* dos fatores associados ao desenvolvimento da hanseníase e suas formas clínicas.

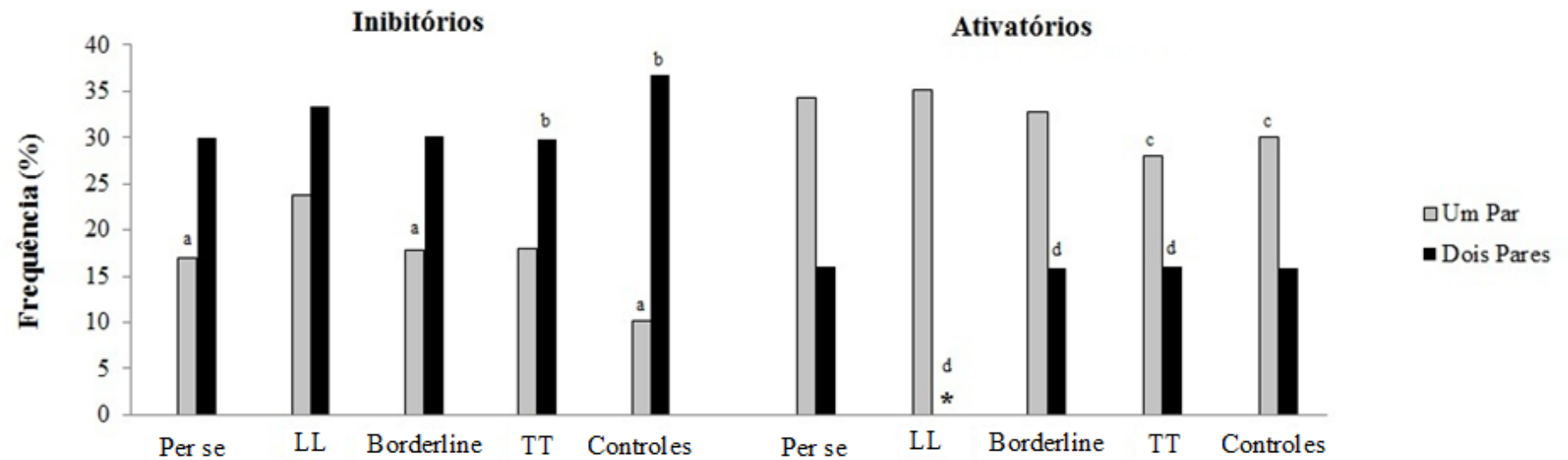
Variável Resposta	Variáveis Independentes	Coefficiente (β)	P	OR	-2Log
<i>per se</i> vs. controles	<i>KIR2DL1</i>	-2,227	0,001	0,10	1060,2
	<i>KIR2DL1 - C2/C2</i>	0,431	0,022	1,54	
	<i>KIR2DS2 - C1</i>	0,537	0,002	1,71	
LL vs. controles	Gênero	-1,217	0,047	0,29	141,9
	<i>KIR2DL1</i>	-2,815	0,001	0,06	
	<i>KIR2DL2/2DL2 - C1</i>	1,612	0,042	5,01	
Borderline vs. controles	<i>KIR2DL1</i>	-1,868	0,001	0,15	936,9
TT vs. controles	Gênero	0,755	0,017	2,13	288,5
	Etnia	0,365	0,048	1,44	
	<i>KIR2DL1</i>	-3,708	0,001	0,02	
	<i>KIR2DL1 - C2/C2</i>	1,612	0,001	5,01	
	<i>KIR2DL2 - C1</i>	1,452	0,001	4,27	
	<i>KIR2DL2/2DL2 - C1</i>	1,173	0,059	3,23	
TT vs. Borderline	Gênero	0,947	0,002	2,57	281,7
	Etnia	0,410	0,017	1,50	
	<i>KIR2DL1</i>	-1,809	0,001	0,16	
	<i>KIR2DL1 - C2/C2</i>	1,932	0,001	6,90	
	<i>KIR2DL2 - C1</i>	1,840	0,001	6,30	
TT vs. LL	Gênero	1,783	0,004	5,95	82,4
Borderline vs. LL	<i>KIR2DL2/2DL2 - C1</i>	-1,579	0,024	0,206	151,3

NOTA: (β): Coeficiente das variáveis; -2Log: Logatirímo da chance.

Tuberculóide (TT), Borderline (BL, BB, BT), Lepromatosa (LL).

FIGURAS

Figura 1. Frequências dos pares de ligantes KIR – HLA de Classe I inibitórios e ativatórios em pacientes com hanseníase e suas formas clínicas e contatos saudáveis na população de Rondonópolis, MT.



NOTA: Diagrama de barras representando as frequências dos pares de genes KIR ativatórios e inibitórios, com seus respectivos ligantes HLA de Classe I. TT: Tuberculóide, Borderline (BL, BB, BT), LL: Lepromatosa.

*Representa que o grupo LL apresentou resultado de 0% para dois pares ativatórios.

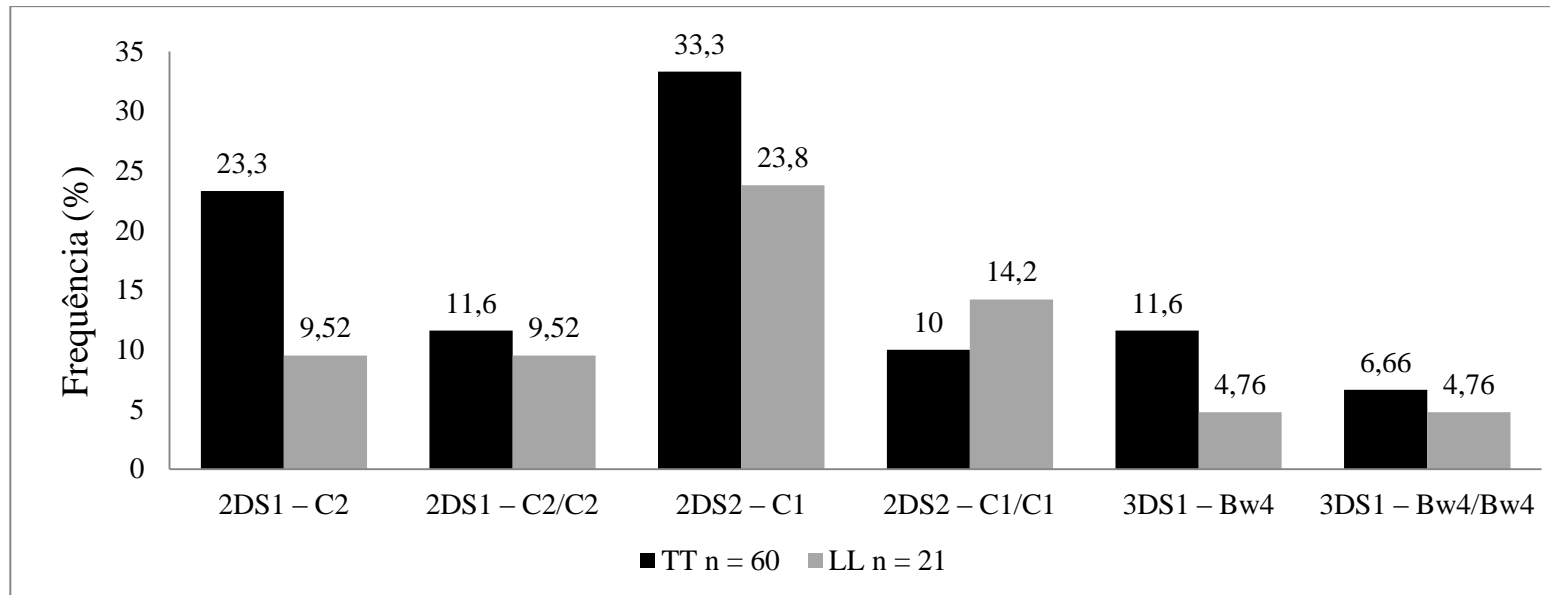
^a Para um par inibitório: $P = 0,006$, OR = 1,8 (1,2 – 2,7) para *per se* vs. controles e $P < 0,001$, OR = 2,3 (1,5 – 3,6); para Borderline vs. controles.

^b Para dois pares inibitórios: $P = 0,001$, OR = 0,4 (0,2 – 0,8) para TT vs. controles.

^c Para um par ativatório: $P = 0,047$, OR = 1,8 (1,0 – 3,1) para TT vs. controles.

^d Para dois pares ativatórios: $P = 0,024$, OR = 11,0 (0,6 – 19,8) para TT vs. LL e $P = 0,034$, OR = 9,0 (0,5 – 15,1) para Borderline vs. LL.

Figura 2. Distribuição das frequências dos genes KIR ativatórios com seus ligantes HLA de classe I em pacientes com as formas Tuberculóide e Lepromatosa na população de Rondonópolis, MT.



NOTA: Diagrama de barras representando as frequências dos genes KIR ativatórios com seus respectivos ligantes HLA de Classe I em pacientes com as formas clínicas Tuberculóide e Lepromarosa; os valores correspondem às porcentagens de cada par KIR-HLA.

TT: Tuberculóide; LL: Lepromatosa.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Neste trabalho, as análises das frequências de genes KIR correlacionados aos seus ligantes HLA de Classe I cognatos, somadas à análise de regressão multivariada, em indivíduos com hanseníase e/ou suas formas clínicas e indivíduos controles saudáveis de uma região hiperendêmica permitiram algumas conclusões:

- Os homens foram mais afetados pela doença, sendo que o sexo feminino parece ser um fator protetor, levando as mulheres a manifestarem uma forma mais branda da doença.
- Destacam-se os resultados para os genes KIR ativatórios na comparação entre as formas TT e LL, tanto separadamente quanto na presença de seus ligantes HLA correlacionados. Houve uma maior frequência de todas as combinações KIR-HLA (exceto para *KIR2DS2-C1/C1*) e dos genes *KIR2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS5* e *3DS1* na forma TT em relação à forma LL, encontrando-se uma tendência de associação para o gene *KIR3DS1*.
- *KIR2DS2 – C1* foi mais frequente no grupo *per se* e no grupo TT, em relação ao grupo controle, sendo que a presença desta associação pode ser atribuível ao desequilíbrio de ligação entre *KIR2DL2* e *KIR2DS2*, confirmado neste estudo.
- *KIR2DL2/2DL2 – C1* pode contribuir para o desenvolvimento da hanseníase *per se*, e suas formas clínicas TT e LL, sendo que a maior frequência no grupo LL pode levar a um pior prognóstico na infecção contra o *M. leprae*.
- O par *KIR2DL1 – C2/C2* apresentou uma tendência à associação no grupo BL em relação ao grupo BT.
- Em relação aos pares de ligantes KIR/HLA, o grupo borderline apresentou maior número de pares inibitórios em relação ao grupo controle e maior número de pares ativatórios em relação à LL, caracterizando uma forma instável de resposta imune contra o *M. leprae*.
- A análise multivariada confirmou a influência dos genes KIR e seus ligantes HLA na imunopatologia da hanseníase e seus subtipos e revelou que o gênero também pode influenciar no desenvolvimento da hanseníase e suas formas clínicas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A análise de casos de susceptibilidade genética em doenças infecciosas tem sido um tema amplamente abordado. Através de diferentes estudos sabe-se que o meio ambiente e a virulência dos patógenos não são suficientes para explicar os diferentes padrões de resposta imune apresentados em uma mesma população frente a um patógeno particular. A hipótese da existência de uma rede complexa de fatores atuando simultaneamente em doenças infecciosas é reconhecida, e dentro deste contexto, na hanseníase a resposta imunológica do hospedeiro é um fator crítico para o desencadeamento da doença, e os níveis desta resposta são influenciados pela interação de diversos genes.

Com o desenvolvimento da imunogenética, novos estudos, envolvendo um número grande de fatores genéticos, em populações de distintas partes do Brasil e do mundo, devem ser conduzidos para elucidar melhor as interações entre estes fatores, a fim de tornar possível a identificação de biomarcadores que podem ser úteis na avaliação de pacientes com hanseníase quanto ao prognóstico, evolução e formas clínicas.