



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

FERNANDA FORMAGGI LARA ARMI

Influência dos genes *KIR* e *HLA* de classe I na patogênese do HIV-1/aids em  
pacientes da região noroeste do Estado do Paraná, Brasil.

Maringá  
2016

FERNANDA FORMAGGI LARA ARMI

Influência dos genes *KIR* e *HLA* de classe I na patogênese do HIV-1/aids em pacientes da região noroeste do Estado do Paraná, Brasil.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Dennis Armando Bertolini

Maringá

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

A729i Armi, Fernanda Formaggi Lara  
Influência dos genes KIR e HLA de classe I na patogênese do HIV-1/aids em pacientes da região noroeste do Estado do Paraná, Brasil / Fernanda Formaggi Lara Armi. -- Maringá, 2016.  
66 f. : figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Dennis Armando Bertolini.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.

1. HIV (Vírus Imunodeficiência Humana). 2. Genes MHC. 3. Polimorfismo Genético. 4. Receptores KIR. 5. Células natural killer. I. Bertolini, Dennis Armando, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 23.ed. 616.9792

GVS-002739

# FOLHA DE APROVAÇÃO

FERNANDA FORMAGGI LARA ARMI

Influência dos genes *KIR* e *HLA* de classe I na patogênese do HIV-1/aids em pacientes da região noroeste do Estado do Paraná, Brasil.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

## COMISSÃO JULGADORA

### Titulares

Prof. Dr. Dennis Armando Bertolini – Universidade Estadual de Maringá – UEM (Presidente)  
Profª. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche – Universidade Estadual de Londrina – UEL  
Profª. Dra. Luiza Tamie Tsuneto – Universidade Estadual de Maringá – UEM  
Prof. Dr. Ricardo Alberto Moliterno – Universidade Estadual de Maringá – UEM  
Profª. Drª. Daniela Maira Cardozo – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

### Suplentes

Prof. Dr. Jorge Juarez Vieira Teixeira, Universidade Estadual de Maringá – UEM  
Profª. Dra. Thais Gomes Verzignassi Silveira – Universidade Estadual de Maringá – UEM  
Profª. Dra. Ana Maria Sell – Universidade Estadual de Maringá – UEM

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu esposo, Elvis Toth Armi, por ter estado sempre ao meu lado.

Aos meus pais, Nelson Lara e Nelza Formaggi Lara, por terem me apoiado, incentivado e proporcionado a base, pela qual me possibilitou realizar esse trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu mais uma importante conquista em minha vida e me deu força a cada manhã para continuar sempre em frente.

Ao meu esposo Elvis Toth Armi, por estar ao meu lado em todos os momentos, por me apoiar, me incentivar, e por ter me proporcionado apoio psicológico durante esses dois anos.

Aos meus pais, Nelson Lara e Nelza Formaggi Lara, pelo incentivo, apoio, e por ter feito o possível e, muitas vezes, o que parecia impossível, para me proporcionar a base necessária que me possibilitou chegar até aqui.

Aos meus irmãos Graziela Formaggi Lara e Rodrigo Formaggi Lara, pelo apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Dennis Armando Bertolini, pela sua dedicação, competência e profissionalismo, essenciais ao desenvolvimento dessa pesquisa.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Jeane Eliete Laguila Visentainer, pela oportunidade, apoio e incentivo.

Ao amigo Hugo Vicentin Alves, pelo apoio, paciência e disposição em me ajudar.

Aos funcionários do laboratório de Virologia Clínica: Sonia Kaori Miyamoto, Hellen Capellari Menezes, Maria Ferreira dos Santos Neta, pelo apoio e colaboração.

Aos pacientes que participaram desse estudo, sem os quais seria impossível a realização dessa pesquisa.

Às minhas colegas de trabalho, Debora, Cida, Fabiana e Carine pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

À Secretaria de Saúde de Mandaguçu pelo apoio na realização dessa pesquisa.

A todos, que direta ou indiretamente ajudaram em meu trabalho, o meu sincero agradecimento.

## EPÍGRAFE

“O homem não teria alcançado o possível, se inúmeras vezes não tivesse tentado atingir o impossível.”

Max Weber

**Influência dos genes *KIR* e *HLA* de classe I na patogênese do HIV-1/aids em pacientes da região noroeste do Estado do Paraná, Brasil.**

**RESUMO:**

**Introdução:** O objetivo desse estudo foi investigar a contagem de células NK e a associação dos genes *KIR* e *HLA* de classe I com a infecção pelo HIV-1 e progressão da aids. **Métodos:** Foram coletadas 99 amostras de sangue de indivíduos para o grupo controle e 99 para o grupo HIV. A quantificação das células NK foi realizada pela metodologia de citometria de fluxo e as tipificações dos genes *HLA* de classe I e *KIR* pelo método de PCR-SSOR. A análise estatística foi realizada pelo teste do Qui-quadrado com correção de Yates ou Teste de Fisher, para as variáveis categóricas, e o teste de Mann Whitney para variáveis contínuas. **Resultados:** A contagem de células NK foi menor no grupo HIV em relação ao controle e no grupo aids em relação ao sem aids. O alelo *HLA-A\*68:02* e o haplótipo *HLA-A\*68\_C\*07* foram mais frequentes no grupo HIV em relação ao grupo controle. O alelo *A\*01:01* e alguns haplótipos formados por esse alelo foram mais frequentes no grupo aids em relação ao sem aids. A frequência da combinação *KIRD3L1-Bw4/Bw4* foi maior no grupo HIV em relação ao controle. **Conclusões:** O presente estudo mostrou que a contagem de células NK foi menor no grupo de pacientes HIV em relação ao controle e no grupo aids em relação ao sem aids. Em relação ao polimorfismo genético, houve susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 na presença do alelo *HLA-A\*68:02* e do haplótipo *HLA-A\*68\_C\*07*. O alelo *A\*01:01* foi associado à progressão para a aids, assim como alguns haplótipos formados por esse alelo. Os grupos alélicos *B\*35*, *B\*51*, *B\*44* e *B\*08* se mostraram importantes na progressão para a doença apenas quando associados formando haplótipos. Em relação aos genes *KIR*, houve associação do gene *KIR3DL1* com seu ligante *HLA-Bw4* em homozigose com a infecção pelo HIV-1.

**Palavras-chave:** Vírus da imunodeficiência humana 1; Genes MHC classe I; Polimorfismo genético; Receptores *KIR*; Células natural killer.



**Influence of *KIR* and *HLA* class I genes in the pathogenesis of HIV-1/aids in patients from northwest region of Paraná State, Brazil.**

***ABSTRACT***

**Introduction:** The aim of this study was to investigate the NK cell count and the association of *KIR* and *HLA* class I genes with HIV infection and progression to AIDS. **Methods:** 99 blood samples from individuals were collected for the control group and 99 for the HIV group. The quantitation of NK cells was performed by flow cytometric methodology and classifying the *KIR* and *HLA* genes by PCR-SSOR. Statistical analysis was performed by Chi-square test with Yates correction or Fisher's exact test for categorical variables and the Mann-Whitney test for continuous variables. **Results:** The NK cell count was lower in the HIV group compared to the control group and aids group in relation to without aids. The *HLA-A\*68:02* allele and the *HLA-A\*68\_C\*07* haplotype were more frequent in HIV group compared to the control group. The *A\*01:01* allele and some haplotypes formed by this allele were more frequent in the aids group in relation to without aids. The frequency of *KIRD3L1-Bw4 / Bw4* combination was higher in the HIV group compared to the control. **Conclusions:** This study showed that NK cell count was lower in the group of HIV patients in the control group and AIDS in relation to without aids. In relation to genetic polymorphism, there was susceptibility to HIV-1 infection in the *HLA-A\*68:02* and *HLA-A\*68\_C\*07* presence. The *A\*01:01* allele was associated with progression to aids, as well as some haplotypes formed by this allele. The *B\*35*, *B\*51*, *B\*44* and *B\*08* allelic groups proved to be important in disease progression associated only when forming haplotypes. Regarding *KIR* genes, there was association of the *KIR3DL1* gene with its *HLA-Bw4* ligand in homozygous with HIV-1.

**Keywords:** Human immunodeficiency virus 1; MHC Class I Genes; Genetic Polymorphism; *KIR* Receptors; Natural Killer Cells.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Contagem de células NK e Carga Viral nos grupos HIV, aids, sem aids e controle.....	50
Tabela 2.	Frequência dos genes <i>KIR</i> e haplótipos A e B nos grupos HIV, aids, sem aids e controle.....	51
Tabela 3.	Frequência dos genes <i>KIR</i> com seus ligantes <i>HLA</i> classe I nos grupos HIV, aids, sem aids e controle.....	52
Tabela 4.	Frequência dos alelos e haplótipos dos genes <i>HLA</i> de classe I associados ao grupo HIV comparado ao grupo Controle.....	53
Tabela 5.	Frequência dos alelos e haplótipos <i>HLA</i> de classe I associados ao grupo Aids comparado ao grupo Sem aids.....	54

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Distribuição percentual dos casos de aids em homens de 13 anos ou mais segundo categoria de exposição por ano de diagnostico. Brasil, 2005 a 2014.....	16
Figura 2.	A estrutura do HIV-1.....	17
Figura 3.	Locos <i>MHC</i> classes <i>I, II e III</i> .....	20
Figura 4.	Nomenclatura do sistema <i>HLA</i> .....	21
Figura 5.	Estrutura dos receptores <i>KIR</i> .....	23

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aids: Síndrome da imunodeficiência adquirida

Células NK: Células Natural Killer

COPEP: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

CTL: Linfócitos T citotóxicos

DAP-12: Proteína de ativação do DNAX de 12kDa

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DST: Doença sexualmente transmissível

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

TNF: Fator de Necrose Tumoral

HIV: Vírus da imunodeficiência humana, do inglês Human Immunodeficiency Virus

HIV-1: Vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HIV-2: Vírus da imunodeficiência humana tipo 2

HLA: Antígenos Leucocitários Humanos

HSH: Homens que fazem sexo com homens

ITAM: Motivos de ativação à base de tirosina do imunorreceptor

ITIM: Motivos de inibição à base de tirosina do imunorreceptor

KIR: do inglês, *killer immunoglobulin-like receptor*

LEPAC: Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas

LT $\alpha$ : Linfotoxina-alfa

LT $\beta$ : Linfotoxina-beta

MHC: do inglês, *major histocompatibility complex*

OR: Razão de probabilidade, do inglês, *Odds Ratio*

PCR: Reação em cadeia da polimerase

RNA: Ácido ribonucleico

SAE: Serviço de Assistência Especializado

SICLON: Sistema de Controle Logístico de Medicamentos

SISCEL: Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4+/CD8+ e Carga Viral

SSO: Sonda Sequência Específica

TAP: Transportador associado ao processamento de antígeno

UDI: Usuários de drogas injetáveis

UEM: Universidade Estadual de Maringá

UNAIDS: do inglês: *Joint UN Programme on HIV/AIDS*

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e das publicações científicas (Capítulo II): (artigo) Infection, Genetics and Evolution disponível em: <http://www.journals.elsevier.com/infection-genetics-and-evolution/> (anexo).

## SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I.....	15
1.1	Introdução.....	15
1.2	Epidemiologia.....	15
1.3	A estrutura do HIV.....	17
1.4	Resposta Imune.....	18
1.5	Células NK e HIV.....	18
1.6	Complexo Principal de Histocompatibilidade .....	19
1.7	Genes <i>KIR</i> .....	22
1.8	<i>HLA</i> e HIV.....	24
1.9	Justificativa.....	24
1.10	Objetivos.....	25
1.10.1	Geral.....	25
1.10.2	Específicos.....	25
1.11	Referências.....	26
2	CAPÍTULO II.....	30
2.1	Artigo.....	30
3	CAPÍTULO III.....	55
3.1	Conclusões.....	55
3.2	Perspectivas Futuras.....	56
3.3	Limitações .....	57
	Anexos.....	58
	Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos – COPEP.....	58
	Apêndice.....	61
	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	61
	Tabela suplementar 1. Frequência dos alelos HLA de classe I nos indivíduos dos grupos HIV, aids, sem aids e controle.....	63

## CAPÍTULO I

### 1.1 INTRODUÇÃO:

A síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) é a doença provocada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e é caracterizada pela imunossupressão profunda com infecções oportunistas associadas, tumores malignos e degeneração do sistema nervoso central (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012). Foi reconhecida pela primeira vez em 1981, mas somente em 1983 o vírus foi descoberto e caracterizado como agente etiológico da doença. O teste sorológico para detecção de anticorpos foi desenvolvido nessa mesma época e mostrou que a infecção pelo HIV estava concentrada em homossexuais masculinos, usuários de drogas intravenosas e hemofílicos (BLATTNER, GALLO e TEMIN; 1988).

O HIV pode ser transmitido sexualmente, por práticas heterossexuais e homossexuais, o que o caracteriza como uma doença sexualmente transmissível (DST). Ainda, o contágio pode ocorrer de mãe para filho, por meio de sangue contaminado decorrente da utilização de produtos hemoterápicos infectados, compartilhamento de agulhas contaminadas e acidentes ocupacionais. O risco de adquirir a infecção pelo HIV durante o ato sexual aumenta significativamente na presença de outras DSTs, práticas sexuais agressivas e se o parceiro for HIV positivo com carga viral elevada. Por conta de particularidades morfofisiológicas, as mulheres apresentam maior probabilidade de adquirir HIV durante ato sexual que os homens (KLIMAS, KONERU e FLETCHER, 2009).

### 1.2 EPIDEMIOLOGIA

De acordo com a *Joint UN Programme on HIV/AIDS* (UNAIDS), 36,9 milhões de pessoas no mundo são portadoras do HIV, das quais cerca de 66% se encontram na África, 14% na Ásia e 5% na América Latina. A África Subsaariana constitui o epicentro da epidemia de HIV, possuindo a maior taxa de infecção do mundo e a maior proporção de casos novos, cerca de 4.000 casos novos todos os dias (UNAIDS, 2015).

Menos de 20 milhões dos portadores do HIV no mundo estão diagnosticados e apenas 15,8 milhões estão em tratamento antirretroviral. Desde 2000, 25,3 milhões de pessoas morreram de doenças relacionadas com a aids. Em 2014, cerca de 2 milhões de pessoas foram infectadas com o HIV (UNAIDS, 2015).

No Brasil, desde o início da epidemia até junho de 2015, foram registrados 798.366 casos de HIV/aids. Destes, 65 % são representados por homens e 35% por mulheres. Indivíduos com idade entre 25 e 39 anos representam a maior concentração dos casos de aids; entre os



homens, essa faixa etária corresponde a 53,6% e, entre as mulheres, 49,8% do total de casos. Nos primeiros 15 anos da epidemia no Brasil, os casos de HIV/aids se concentravam nas capitais da região Sul e do Sudeste. Nos anos seguintes houve uma expansão da concentração para região Nordeste e Centro-Oeste e atualmente, por todo o território nacional. As regiões Sul e Sudeste apresentam a maior parte dos casos de HIV/aids, sendo que Porto Alegre é a capital com maior taxa de detecção da doença, 94,2 casos para cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2015). No Paraná, o número de indivíduos com HIV registrado nesse período foi de 44.460 (PARANÁ, 2015).

A transmissão vertical representa a principal via de transmissão do HIV entre os indivíduos menores de 13 anos. Entre o grupo com 13 anos ou mais de idade, a principal via de transmissão é a sexual. Em 2014, essa categoria correspondeu a 95,4% entre os homens e 97,1% entre as mulheres. Entre os homens, observa-se um predomínio da categoria de exposição heterossexual, porém, tem-se observado uma tendência de aumento na proporção de casos em homens que fazem sexo com homens (HSH) nos últimos dez anos, a qual passou de 34,9% em 2005 para 44,9% em 2014. A proporção de usuários de drogas injetáveis (UDI) infectados pelo HIV-1 está diminuindo ao longo dos anos em todo o Brasil (Figura 1) (BRASIL, 2015).

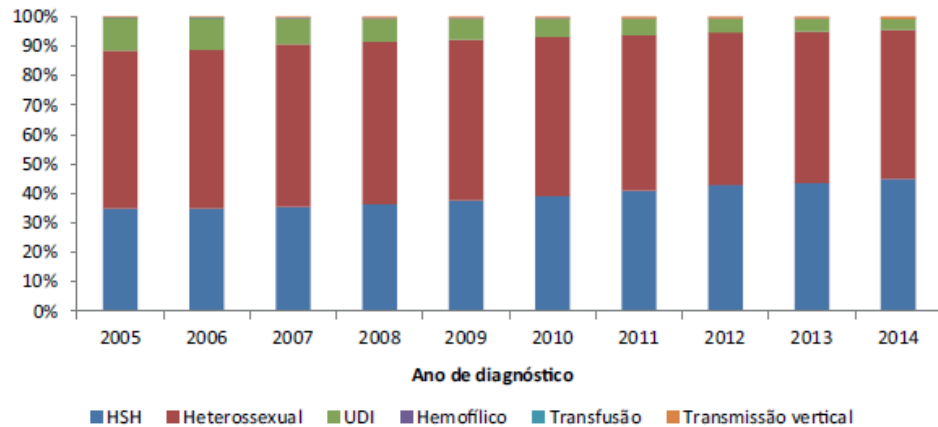


Figura 1. Distribuição percentual dos casos de aids em homens de 13 anos ou mais segundo categoria de exposição por ano de diagnóstico. Brasil, 2005 a 2014.

FONTE: BRASIL, 2015.

Em 2014, haviam 734.000 pessoas vivendo com HIV no país e a prevalência da infecção ficou estimada em 0,4% da população. Neste mesmo ano, estima-se que ocorreram 44.000 novas infecções pelo HIV e 16.000 mortes relacionadas à aids no Brasil. Desde o início da epidemia de aids até dezembro de 2014, foram registrados quase 300 mil óbitos tendo como causa básica a aids. Do total de óbitos por aids registrados, 71,2% ocorreram entre homens e

28,8% entre mulheres (BRASIL, 2015). No Paraná, a taxa de mortalidade por aids, mantém-se estável nos últimos 9 anos, oscilando entre 5,0 a 5,9 óbitos por aids por ano por 100.000 habitantes entre 2007 e 2015. Na 15ª Regional de Saúde foram registrados em 2015 registrados 4,5 óbitos por 100.000 habitantes (PARANÁ, 2015).

### 1.3 A ESTRUTURA DO HIV

O HIV é uma partícula esférica, com 100 a 120 nm de diâmetro, pertence ao gênero *Lentivirinae* e família *Retroviridae* e apresenta em seu núcleo duas cópias de RNA de cadeia simples, encapsuladas por uma camada proteica e um envelope externo composto por uma bicamada fosfolipídica (Figura 2). O genoma do HIV inclui três principais genes que codificam as proteínas estruturais e enzimas virais: *gag*, *env* e *pol* (STEFFY e STALL, 1991).

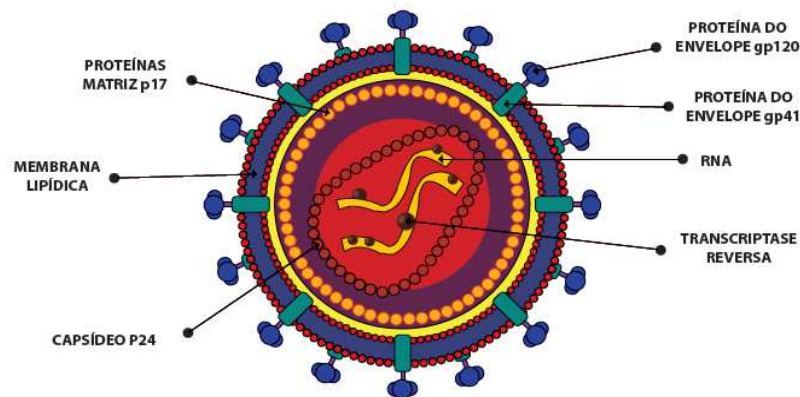


Figura 2. A estrutura do HIV-1.

FONTE: BRASIL, 2014.

O gene *gag* codifica as proteínas estruturais do núcleo, o gene *env* codifica as glicoproteínas, gp120 e gp41, que são encontradas no envelope viral e o gene *pol* codifica a enzima transcriptase reversa, a integrase e as enzimas da protease viral, necessárias à replicação do HIV. Além destes, o HIV possui outros 6 genes reguladores, os genes *tat*, *ver*, *vif*, *nef*, *vpr* e *vpu*, cujos produtos regulam a replicação viral e evasão do sistema imunológico (STEFFY e STALL, 1991).

Análises filogenéticas dividem o HIV em tipo 1 e 2. O tipo 1 é o responsável pela pandemia mundial. HIV-1 é subdividido em 4 grupos: grupo M, N, O e P. A maioria das infecções ocorre com HIV-1 do grupo M, o qual é diferenciado em 9 subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K). Os subtipos A e F, por sua vez, são subdivididos em A1, A2, A3, A4 e A5, e em F1 e F2, respectivamente. Quando ocorre transferência de material genético entre vírus de linhagens diferentes, no caso de um indivíduo com infecção mista, surgem as formas

recombinantes. Caso a transmissão de uma forma recombinante tenha sido documentada em mais de três indivíduos, passa a ser denominada como forma recombinante circulante. (ROBERTSON et al., 2000).

#### 1.4 RESPOSTA IMUNE

A defesa contra micro-organismos é mediada por reações iniciais da imunidade inata e tardias da imunidade adaptativa. A imunidade inata proporciona a primeira linha de defesa contra o HIV. Possui, como mediadores, barreiras físicas e químicas (epitélios e substâncias químicas produzidas pelas células epiteliais), células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos), células dendríticas e células Natural Killer (células NK), proteínas do sistema complemento e citocinas. Ao contrário da imunidade inata, que gera resposta sem uma sensibilização prévia, a imunidade adaptativa é estimulada pela exposição ao agente infeccioso. Dentre as células efetoras da imunidade adaptativa estão os linfócitos T CD4+, responsável pela produção de citocinas que tem a função de auxiliar a resposta imune; linfócitos T CD8+, que se diferenciam em linfócitos T citotóxicos (CTL) que destroem as células que contém o vírus em seu citoplasma e linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI 2012).

#### 1.5 CÉLULAS NK E HIV

Células NK são efetores que desempenham um papel relevante na imunidade inata, principalmente na vigilância tumoral e na defesa contra os vírus, pela sua capacidade de lise celular, sem sensibilização prévia, e pela produção de citocinas e quimiocinas que mediam a resposta inflamatória. São derivadas de precursores da medula óssea e apresentam-se como grandes linfócitos com numerosos grânulos citoplasmáticos. Pelo seu fenótipo de superfície e sua linhagem, não são linfócitos T nem B, constituem de 5 a 15% das células mononucleares do sangue e baço e são raras em outros órgãos linfóides (TRINCHIERI, 1989).

Durante a resposta imune inata, várias alterações ocorrem sobre as células NK provocadas pelo HIV, como alterações na distribuição dos seus subconjuntos e da expressão de receptores NK, que prejudicam a sua atividade (MAVILIO et al., 2005; MARTIN E CARRINGTON, 2013; LUGLI E MAVILIO, 2014). Essas células podem ser divididas em duas subpopulações, de acordo com o nível de expressão de CD56 e CD16 em sua superfície: os linfócitos CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>neg</sup> e os linfócitos CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>pos</sup> (LANIER et al., 1986a; LANIER et al., 1986b; COOPER, FEHNIGER, E CALIGIURI, 2001). Os linfócitos CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>neg</sup> definem-se por possuírem uma capacidade elevada de produção de citocinas e quimiocinas

reguladoras, exibindo simultaneamente uma baixa citotoxicidade e baixa expressão de CD16. Os linfócitos CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>pos</sup> definem-se por manifestarem uma baixa capacidade de produção de citocinas e quimiocinas, porém alta citotoxicidade e, ainda, por expressarem níveis elevados de CD16 (LUGLI E MAVILIO, 2014). No sangue periférico de indivíduos saudáveis, células NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>pos</sup> são maioria, representam 90% das células NK circulantes, enquanto que as células NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>neg</sup> são um menor grupo (LANIER et al., 1986b).

Após a infecção pelo HIV-1 ocorrem alterações nos subconjuntos das células NK, ocorrendo um aumento do subconjunto das células CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>pos</sup> e diminuição do subconjunto CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>neg</sup>. Com a progressão da infecção ocorre um declínio do subconjunto CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>pos</sup> e simultâneo acúmulo do subconjunto CD56<sup>neg</sup>CD16<sup>pos</sup>, que não demonstrou capacidade de produção e secreção de citocinas (ROBERTSON et al., 2000; MARTIN E CARRINGTON, 2013). Embora as células NK CD56<sup>neg</sup> CD16<sup>pos</sup> existam em indivíduos saudáveis, são raras e representam um pequeno percentual do total de células NK do sangue (MAVILIO et al., 2005; BJORKSTROM, LJUNGGREN e SANDBERG, 2010).

Durante a infecção crônica pelo HIV-1, a citotoxicidade das células NK, assim como a sua produção de citocinas, estão diminuídas (BRUNETTA, HUDSPETH, e MAVILIO, 2010). Esta perda da atividade pode estar associada com o aumento dos subconjuntos das células NK que expressam níveis de CD56 relativamente baixos (CD56<sup>neg</sup> CD16<sup>pos</sup>). Além disso, o aumento desse subconjunto de células pode influenciar a população total das células NK (MAVILIO et al., 2005).

## 1.6 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

O complexo principal de histocompatibilidade (do inglês: *major histocompatibility complex* –MHC), que no ser humano é denominado sistema antígeno leucocitário humano (do inglês: *Human leukocyte antigen* - HLA), está localizado no braço curto do cromossomo 6. A região do MHC contém mais de duzentos genes, muitos dos quais codificam proteínas que apresentam funções imunológicas. Estas funções imunológicas incluem o processamento e apresentação de antígenos, inflamação, maturação de leucócitos, cascata do sistema complemento, imunologia materno-fetal e regulação imunológica (MASSEY e McPHERSON, 2006).

O MHC é classificado em MHC de classe I, II e III. Na região de classe I estão localizados os locos *HLA-A, B e C*, responsáveis pela produção de glicoproteínas clássicas, bem como os locos *HLA* não clássicos, *HLA-E, F, G e HFE, MICA* e *MICB*. Na região de classe II estão os locos *HLA-DRA, DRB1-5, DQA1-3, DQB1-2, DPA1, DPB1, DOA, DOB, DMA e DMB*.

Também nesta região estão localizados vários pseudogenes e os genes *LMP1*, *LMP2*, *TAP1*, *TAP2*. A região de classe III contém os locos que codificam para componentes do sistema complemento (C2, C4), fator B e para a enzima 21-hidroxilase. Também é nessa região que estão os locos de algumas citocinas, dentre elas linfotoxina-alfa ( $LT\alpha$ ), linfotoxina-beta ( $LT\beta$ ) e Fator de Necrose Tumoral (TNF) (Figura 3) (MASSEY e McPHERSON, 2006).

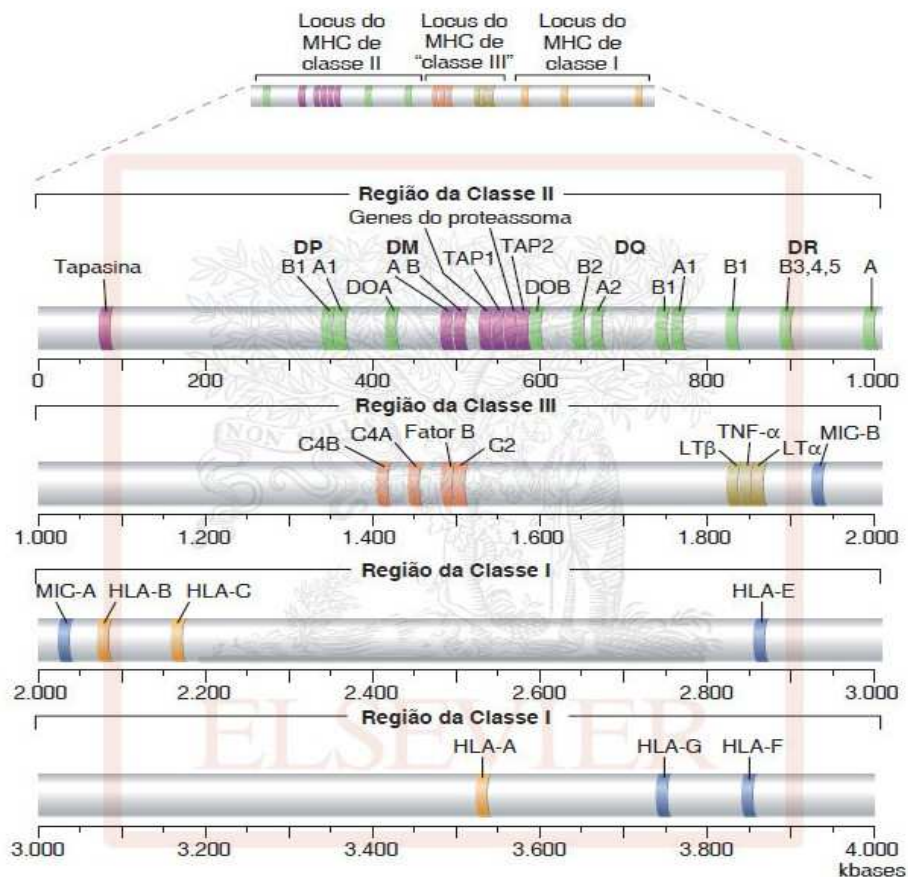


Figura 3. Locos do MHC classes I, II e III.

Fonte: ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012.

O sistema *HLA* apresenta um extenso polimorfismo para os genes de classe I e II, caracterizado por um número muito elevado de alelos. Dados do site <http://hla.alleles.org/> indicam que até janeiro de 2016 foram descritos 14.232 alelos HLA, sendo 10.574 alelos de classe I e 3.658 alelos de classe II. O *HLA-B* é o loco mais polimórfico do sistema *HLA* até hoje identificado, com 4.179 alelos já identificados.

A nomenclatura de um determinado alelo do *HLA* pode ser composta por quatro, seis ou oito dígitos. Os dois primeiros dígitos descrevem o grupo alélico, que frequentemente corresponde com a sua especificidade sorológica. O terceiro e quarto dígitos correspondem à ordem em que a sequência do alelo foi descoberta. Os alelos cujos números diferem nos quatro primeiros dígitos devem diferir por uma ou mais substituições de nucleotídeos que altera a

sequência de aminoácidos na proteína codificada. Os alelos que diferem somente por substituições sinônimas devem ser distinguidos pelo uso do quinto e sexto dígitos. Já os alelos que diferem entre si somente por diferenças nos íntrons e nas regiões não traduzidas são distinguidos pelo uso do sétimo e oitavo dígitos (Figura 4) (MARSH et al., 2010).



Figura 4. Nomenclatura do sistema HLA.

Fonte: IPD. Disponível em <<http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>>.

Existem alguns sufixos que podem ser adicionados ao nome do alelo para indicar seu *status* de expressão. O sufixo 'N' indica alelos nulos, que não são expressos. O sufixo 'L' indica alelos que apresentam baixa expressão na superfície celular. O sufixo 'S' é utilizado para designar um alelo que codifica uma proteína que se expressa como uma molécula solúvel/secretada, não estando presente na superfície celular. Alelos com os sufixos 'C', 'A' e 'Q', são mais incomuns e indicam expressão citoplasmática, aberrante e questionável, respectivamente (TAIT, 2011).

As moléculas HLA de classe I se expressam constitutivamente em todas as células nucleadas e nas plaquetas, e sua função primordial é se ligar a antígenos estranhos e apresentá-los aos linfócitos T CD8+ específicos, pela interação do HLA associado ao peptídeo antigênico com o receptor de células T (TCR). Na apresentação de antígenos via HLA de classe I, as moléculas HLA de classe I se ligam a peptídeos resultantes da fragmentação de proteínas endógenas localizadas no citosol. Os peptídeos fragmentados são transportados do citoplasma para o retículo endoplasmático pela proteína denominada transportador associado ao processamento de antígeno (TAP), onde ocorre ligação do peptídeo com a fenda da molécula HLA de classe I. Em seguida, o complexo HLA/peptídeo é transportado através do aparelho de Golgi para a superfície celular, onde será exposto aos receptores dos linfócitos T CD8+ (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI 2012).

## 1.7 GENES *KIR*

As células NK reconhecem moléculas HLA de classe I por meio de receptores de superfície que inibem a sua função e matam células alvo que tenham perdido moléculas de HLA de classe I, o que ocorre em tumores ou células infectadas por vírus (MORETTA et al., 2014).

Para ação efetiva sobre as células-alvo, as células NK dependem de sua habilidade em reconhecer a expressão anormal, que pode ser a diminuição ou a ausência, de moléculas HLA na superfície dessas células, diferenciando-as das células normais ou próprias do organismo que expressam constitutivamente moléculas HLA. Esse mecanismo é conhecido como teoria do *missing self* (perda do próprio) e depende dos receptores de células NK, capazes de detectar a variabilidade de expressão das moléculas HLA (VIVIER e ROMAGNE, 2007).

Receptores KIR (*killer immunoglobulin-like receptor*) representam uma das famílias de receptores que são expressos em células NK. Pertencem à superfamília de imunoglobulinas e reconhecem moléculas HLA classe I como seus ligantes. A região codificadora desses receptores compreende 15 genes e dois pseudogenes. Abrangem 100-200 kb no complexo receptor de leucócitos no cromossomo humano 19q13.4 (KAUR, TROWSDALE e FUGGER, 2013).

A expressão destes receptores da superfície celular regulamenta as atividades dessas células e a integração dos sinais recebidos por estes receptores que podem determinar o seu estado de ativação (VIVIER, et al., 2008; ORR e LANIER, 2010). Uma vez ativadas, essas células produzem citocinas que regulam o desenvolvimento de uma resposta imune, assim como a morte de células alvo (VIVIER, et al., 2008).

A nomenclatura para os genes *KIR* é baseada na estrutura das moléculas que eles codificam. Na denominação, após a expressão *KIR*, o primeiro dígito corresponde ao número de domínios extracelulares na molécula, seguido pela letra D que denota “domínio.” As moléculas podem ter dois ou três domínios, sendo, portanto, 2D ou 3D, respectivamente. As caudas citoplasmáticas podem ser designadas pela letra “L” (do inglês *long*), indicando que são caudas longas, ou pela letra “S” (do inglês *short*), demonstrando ser de cauda curta ou, ainda, pela letra “P”, se forem pseudogenes. O dígito final indica o número do gene que codifica a proteína com essa estrutura. Sendo assim, *KIR2DL3* codifica receptor contendo dois domínios extracelulares e cauda citoplasmática longa. Caso dois ou mais genes codifiquem estruturas moleculares e sequências semelhantes, deverão ser designados pelo mesmo número, seguido de uma letra final, por exemplo, *KIR2DL5A* e *KIR2DL5B* (VILCHES e PARHAM, 2002; GOMEZ-LOZANO et al., 2002).

As porções citoplasmáticas e transmembrana das moléculas estão relacionadas à atividade funcional dos receptores KIR. Os de cauda longa são inibitórios porque possuem um ou dois motivos denominados ITIM (motivos de inibição à base de tirosina do imunorreceptor) que liberam sinais inibitórios. Após a interação do ligante com o receptor inibidor, os resíduos de tirosina são fosforilados, o que leva ao recrutamento e ativação de fosfatases que removem fosfatos de uma série de proteínas ou lipídeos envolvidos nas vias de sinalização gerados durante a ativação de receptores de células NK. O resultado final é o bloqueio das funções de sinalização dos receptores de ativação. Os de cauda curta possuem um aminoácido no domínio transmembrana que permite associação com a molécula acessória denominada proteína de ativação do DNAX de 12kDa (DAP-12) que libera sinais de ativação por meio de ITAM (motivos de ativação à base de tirosina do imunorreceptor). Após a interação entre o ligante e os receptores de ativação das células NK, os resíduos de tirosina dos ITAM são fosforilados por cinases citoplasmáticas e outras proteínas cinases são recrutadas, interagem com os ITAM fosforilados e são ativadas, resultando em morte da célula-alvo e produção de citocinas (Figura 5) (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI 2012).

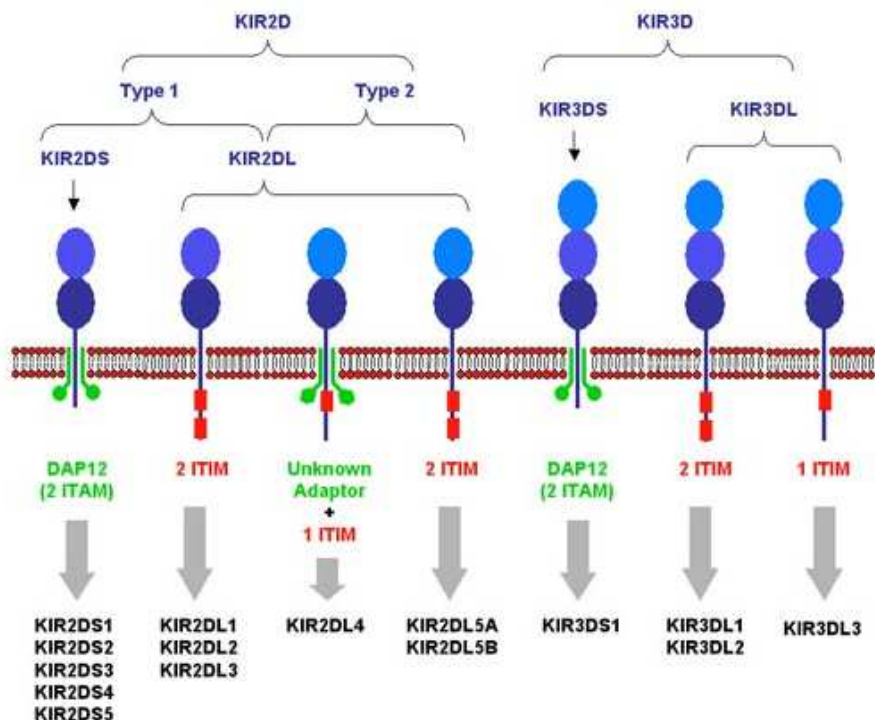


Figura 5. Estrutura dos receptores KIR.

Fonte: IPD. Disponível em [http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/images/figure\\_06.jpg](http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/images/figure_06.jpg).

Dois grupos de haplótipos *KIR* foram descritos. O haplótipo B é caracterizado pela presença de um ou mais dos seguintes genes: *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*,



*KIR2DS5* e *KIR3DS1* e o haplótipo A é caracterizado pela ausência desses genes. Dessa forma, os haplótipos do grupo A contém sete genes *KIR* e dois pseudogenes, que são todos inibidores, exceto para o gene *KIR2DS4*, que codifica um receptor de ativação. O haplótipo B possui genes que codificam receptores de ativação e inibidores. Possui entre dois a cinco receptores de ativação e apresenta extrema diversidade em termos de conteúdo gênico, porém possui menor variabilidade alélica (UHRBERG et al., 1997; HSU et al., 2002; MARANGON et al., 2009; MARTIN e CARRINGTON, 2013).

### 1.8 *HLA* e HIV

Entre os diferentes fatores genéticos do hospedeiro que afetam a infecção pelo HIV, as moléculas *HLA* de classe I apresentam os efeitos mais significativos no controle da replicação do vírus, afetando assim, a progressão para aids (MARTIN e CARRINGTON, 2013).

Há relatos de associações de proteção e suscetibilidade entre os genes *HLA* de classe I e o HIV. As principais associações de suscetibilidade incluem os grupos alélicos *A\*23*, *B\*35*, *B\*53*, *B\*58:02*, *C\*07* e *C\*16*. Já as associações de proteção relatadas com maior frequência incluem os grupos *A\*32*, *B\*14*, *B\*27*, *B\*57*, *B\*58:01*, *C\*08*, *C\*14* e *C\*18*. Alguns grupos alélicos, como *B\*51*, *B\*52* e *C\*04* apresentam associações, ora de proteção, ora de suscetibilidade. Os relatos envolvendo os grupos *B\*27*, *B\*57* e *B\*35* constituem as associações mais consistentes envolvendo genes *HLA* de classe I e o HIV, tendo sido constantemente relatadas em diferentes estudos envolvendo pacientes de diferentes etnias (STEPHENS, 2012).

Estudos indicam uma associação significativa entre a homozigose nos genes *HLA* de classe I e rápida progressão para aids, tanto em caucasianos quanto em afro-americanos. Os três locos de classe I contribuem de modo independente para a associação, e a progressão para aids é mais pronunciada em indivíduos homozigotos para os três locos de classe I. A heterozigose para os genes *HLA* de classe I é considerada uma vantagem seletiva contra o HIV, pois permite a apresentação de uma grande variedade de antígenos virais aos linfócitos T CD8+, gerando uma resposta imunológica mais ampla e diversificada (MARTIN e CARRINGTON, 2013).

Diferentemente dos genes *HLA* de classe I, os alelos *HLA* de classe II não apresentam associações consistentes com a infecção pelo HIV e progressão para aids (MARTIN e CARRINGTON, 2013).

### 1.9 JUSTIFICATIVA

A resposta imune inata é a primeira barreira imunológica para o combate a infecções e as células NK fazem parte dessa linha de defesa. O número de células NK de indivíduos

portadores do vírus HIV-1 parece estar alterado em indivíduos com a infecção, porém essa informação não está confirmada na literatura, uma vez não foi observado alteração no quantitativo de células NK por alguns autores.

Além do número, a função dessas células pode depender de seus receptores KIR de membrana e de suas interações com ligantes HLA. Algumas associações da infecção pelo HIV e os genes *HLA* e *KIR* já estão bem estabelecidas, outras ainda merecem ser investigadas.

Dessa forma, identificar o comportamento das células NK em relação ao número, confirmar associações estabelecidas dos genes *HLA* e *KIR* e investigar outras possíveis, poderiam ser úteis para prever as taxas de progressão da doença e auxiliar no delineamento de estudos que podem levar ao desenvolvimento de novas opções terapêuticas e de vacinas.

## **1.10 OBJETIVOS**

### **1.10.1 Objetivo geral:**

O objetivo desse estudo foi investigar a contagem de células NK e a associação dos genes *KIR* e *HLA* de classe I com a infecção pelo HIV-1 e progressão da aids em indivíduos infectados e não infectados pelo HIV-1 acompanhados pelo Serviço de Assistência Especializado em DST/Aids (SAE) da Secretaria de Saúde do Município de Maringá e atendidos no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá, no período de abril a dezembro de 2015.

### **1.10.2 Objetivos Específicos:**

- Determinar o número de células NK de indivíduos infectados e não infectados pelo HIV-1 acompanhados pelo SAE e atendidos no LEPAC.
- Genotipar as variantes *HLA* dos indivíduos infectados e não infectados pelo HIV-1.
- Genotipar os genes *KIR* dos indivíduos infectados e não infectados pelo HIV-1.
- Comparar o grupo HIV com o grupo controle em relação ao número de células NK, genes *HLA* de classe I, genes *KIR* e a combinação *KIR* com seu respectivo ligante *HLA* de classe I.
- Comparar o grupo aids com o grupo sem aids em relação ao número de células NK, genes *HLA* de classe I, genes *KIR* e a combinação *KIR* com seu respectivo ligante *HLA* de classe I.

## 1.11 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S., *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier Brasil: 2012.

BJORKSTROM, N. K.; LJUNGGREN, H. G.; SANDBERG, J. K., CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease. *Trends Immunol* 2010, 31 (11), 401-6.

BLATTNER, W.; GALLO, R. C.; TEMIN, H. M., HIV Causes Aids. *Science* 1988, 241 (4865), 515-516.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. *Boletim epidemiológico HIV/aids.*, ed. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. *Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV.*, ed. 2014.

BRUNETTA, E.; HUDSPETH, K. L.; MAVILIO, D., Pathologic natural killer cell subset redistribution in HIV-1 infection: new insights in pathophysiology and clinical outcomes. *J Leukoc Biol* 2010, 88 (6), 1119-30.

COOPER, M. A.; FEHNIGER, T. A.; CALIGIURI, M. A., The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001, 22 (11), 633-40.

GOMEZ-LOZANO, N. *et al.* Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. *Immunogenetics* 2002, 54 (5), 314-9.

HSU, K. C. *et al.* The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002, 190, 40-52.

JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON, H. A., *Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic. 2010.* UNAIDS: 2015.

KAUR, G.; TROWSDALE, J.; FUGGER, L., Natural killer cells and their receptors in multiple sclerosis. *Brain* 2013, *136* (Pt 9), 2657-76.

KLIMAS, N. *et al.* *Psychosom Med* 2008, *70* (5), 523-30; Levy, J. A., HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. In *Aids*, England, 2009; Vol. 23, pp 147-60.

LANIER, L. L. *et al.* The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986b, *136* (12), 4480-6.

LANIER, L. L. *et al.* Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol* 1986a, *137* (9), 2735-9.

LIMA, A. C. M., Polimorfismo dos genes HLA de Classe I em pacientes HIV positivos do Hospital de Clínicas-UFPR, de Curitiba, Estado do Paraná. 2012.

LUGLI, E.; MAVILIO, D., Editorial: NK cell immune activation in HIV-1 infection: flipping the bad and good side of the same coin. In *J Leukoc Biol*, United States, 2014; Vol. 96, pp 1-3.

MARANGON, A. V. *et al.* Receptores ker de células natural killer-DOI: 10.4025/ciencucuidaude.v7i0.6588. *Ciência, Cuidado e Saúde* 2009, *7*, 153-160.

MARSH, S. G. *et al.* Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* 2010, *75* (4), 291-455.

MARTIN, M. P.; CARRINGTON, M., Immunogenetics of HIV Disease. *Immunol Rev* 2013, *254* (1), 245-64.

MASSEY, H.D.; McPHERSON, R.A. Human Leukocyte Antigen: The Major Histocompatibility Complex of Man. In: McPHERSON, R.A.; PINCUS, M.R. (Ed.). *McPherson & Pincus: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 21st Ed. [S.L.]: W. B. Saunders Company, 2006.

MAVILIO, D. et al. Characterization of CD56<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup> natural killer (NK) cells: A highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102 (8), 2886-2891.

MILLER, L. E. Laboratory Diagnosis of HIV Infection. In: STEVENS, C.D. *Clinical immunology and serology: a laboratory perspective*. Philadelphia: F.A. Davis Company, 2010. 476 p. 3. ed.

MORETTA, L. et al. Human natural killer cells: origin, receptors, function, and clinical applications. *Int Arch Allergy Immunol* 2014, 164 (4), 253-64.

ORR, M. T.; LANIER, L. L., Natural killer cell education and tolerance. *Cell* 2010, 142 (6), 847-56.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde. Departamento de DST, Aids e. Hepatites Virais. *Boletim epidemiológico HIV/aids.*, ed. 2015.

ROBERTSON, D. L. et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 2000, 288 (5463), 55-55.

STEFFY, K; STALL, F. W. Genetic regulation of human immunodeficiency virus. *American Society for Microbiology*, v. 55, n. 2, p 193-205, 1991.

STEPHENS, H. A., Immunogenetic surveillance of HIV/AIDS. *Infect Genet Evol* 2012, 12 (7), 1481-91.

TAIT, B. D., The ever-expanding list of HLA alleles: changing HLA nomenclature and its relevance to clinical transplantation. *Transplant Rev (Orlando)* 2011, 25 (1), 1-8.

TRINCHIERI, G., Biology of natural killer cells, *Adv Immunol*, 1989, 47, 187-376

UHRBERG, M. et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 1997, 7 (6), 753-63;

VILCHES, C.; PARHAM, P., KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002, 20, 217-51.

VIVIER, E.; ROMAGNE, F., Good news, bad news for missing-self recognition by NK cells: autoimmune control but viral evasion. *Immunity* 2007, 26 (5), 549-51.

VIVIER, E. et al. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008, 9 (5), 503-10.

## CAPÍTULO II

### **Artigo: Influência dos genes *KIR* e *HLA* de classe I na patogênese do HIV-1/aids em pacientes da região noroeste do Estado do Paraná, Brasil.**

Autores: Fernanda Formaggi Lara Armi<sup>1</sup>

Colaboradores: Sonia Kaori Miyamoto<sup>2</sup>, Hellen Capellari Menezes<sup>2</sup>, Maria Ferreira dos Santos Neta<sup>2</sup>, Hugo Vicentin Alves<sup>3</sup>, Jeane Eliete Laguila Visentainer<sup>3</sup>.

Orientador: Dennis Armando Bertolini<sup>2</sup>

1. Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PCS, Universidade Estadual de Maringá – UEM.

2. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina – DAB – Universidade Estadual de Maringá – UEM.

3. Laboratório de Imunogenética, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

Palavras chave: Human immunodeficiency virus 1; MHC Class I Genes, Major Histocompatibility Complex; Genetic Polymorphism; KIR Receptors; Natural Killer Cells.

Endereço do autor:

Prof. Dr. Dennis Armando Bertolini. Laboratório de Virologia Clínica/Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina/UEM. Avenida Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, PR, Brasil.

**Phone:** 55 44 3011-5394; **Fax:** 55 44 3011-4860

**e-mail:** dabertolini@uem.br

## RESUMO:

**Introdução:** O objetivo desse estudo foi investigar a contagem de células NK e a associação dos genes *KIR* e *HLA* de classe I com a infecção pelo HIV-1 e progressão da aids. **Métodos:** Foram coletadas 99 amostras de sangue de indivíduos para o grupo controle e 99 para o grupo HIV. A quantificação das células NK foi realizada pela metodologia de citometria de fluxo e as tipificações dos genes *HLA* de classe I e *KIR* pelo método de PCR-SSOR. A análise estatística foi realizada pelo teste do Qui-quadrado com correção de Yates ou Teste de Fisher, para as variáveis categóricas, e o teste de Mann Whitney para variáveis contínuas. **Resultados:** A contagem de células NK foi menor no grupo HIV em relação ao controle e no grupo aids em relação ao sem aids. O alelo *HLA-A\*68:02* e o haplótipo *HLA-A\*68\_C\*07* foram mais frequentes no grupo HIV em relação ao grupo controle. O alelo *A\*01:01* e alguns haplótipos formados por esse alelo foram mais frequentes no grupo aids em relação ao sem aids. A frequência da combinação *KIRD3L1-Bw4/Bw4* foi maior no grupo HIV em relação ao controle. **Conclusões:** O presente estudo mostrou que a contagem de células NK foi menor no grupo de pacientes HIV em relação ao controle e no grupo aids em relação ao sem aids. Em relação ao polimorfismo genético, houve susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 na presença do alelo *HLA-A\*68:02* e do haplótipo *HLA-A\*68\_C\*07*. O alelo *A\*01:01* foi associado à progressão para a aids, assim como alguns haplótipos formados por esse alelo. Os grupos alélicos *B\*35*, *B\*51*, *B\*44* e *B\*08* se mostraram importantes na progressão para a doença apenas quando associados formando haplótipos. Em relação aos genes *KIR*, houve associação do gene *KIR3DL1* com seu ligante *HLA-Bw4* em homozigose com a infecção pelo HIV-1. **Palavras-chave:** Vírus da imunodeficiência humana 1; Genes MHC classe I; Polimorfismo genético; Receptores *KIR*; Células natural killer.



### **ABSTRACT**

**Introduction:** The aim of this study was to investigate the NK cell count and the association of KIR and HLA class I genes with HIV infection and progression to AIDS. **Methods:** 99 blood samples from individuals were collected for the control group and 99 for the HIV group. The quantitation of NK cells was performed by flow cytometric methodology and classifying the KIR and HLA genes by PCR-SSOR. Statistical analysis was performed by Chi-square test with Yates correction or Fisher's exact test for categorical variables and the Mann-Whitney test for continuous variables. **Results:** The NK cell count was lower in the HIV group compared to the control group and aids group in relation to without aids. The *HLA-A\*68:02* allele and the *HLA-A\*68\_C\*07* haplotype were more frequent in HIV group compared to the control group. The *A\*01:01* allele and some haplotypes formed by this allele were more frequent in the aids group in relation to without aids. The frequency of KIRD3L1-Bw4 / Bw4 combination was higher in the HIV group compared to the control. **Conclusions:** This study showed that NK cell count was lower in the group of HIV patients in the control group and AIDS in relation to without aids. In relation to genetic polymorphism, there was susceptibility to HIV-1 infection in the *HLA-A\*68:02* and *HLA-A\*68\_C\*07* presence. The *A\*01:01* allele was associated with progression to aids, as well as some haplotypes formed by this allele. The *B\*35*, *B\*51*, *B\*44* and *B\*08* allelic groups proved to be important in disease progression associated only when forming haplotypes. Regarding *KIR* genes, there was association of the *KIR3DL1* gene with its *HLA-Bw4* ligand in homozygous with HIV-1.

**Keywords:** Human immunodeficiency virus 1; MHC Class I Genes; Genetic Polymorphism; KIR Receptors; Natural Killer Cells

## Introdução

Nos últimos anos, têm-se prestado especial atenção ao papel do sistema imune inato no combate à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), com o intuito de compreender melhor qual a importância da resposta das células Natural Killer (NK) no impedimento da progressão da doença e no combate à infecção [1].

As células NK constituem uma população heterogênea de linfócitos citotóxicos e produtores de citocinas com origem na medula óssea e representam cerca de 5 a 15% do total de células mononucleares na circulação sanguínea em condições normais. Sua função é proporcionar uma resposta defensiva de primeira linha, com capacidade de detectar e lisar células tumorais ou infectadas por vírus sem que seja necessária uma sensibilização prévia [2, 3].

Essas células podem ser divididas em duas subpopulações, os linfócitos  $CD56^{\text{bright}} CD16^{\text{neg}}$  e os linfócitos  $CD56^{\text{dim}} CD16^{\text{pos}}$  [4-6]. Os linfócitos  $CD56^{\text{bright}} CD16^{\text{neg}}$  possuem capacidade elevada de produção de citocinas e quimiocinas reguladoras, e os linfócitos  $CD56^{\text{dim}} CD16^{\text{pos}}$  manifestam baixa capacidade de produção de citocinas e quimiocinas, porém alta citotoxicidade [4-6]. Durante a resposta imune inata, várias alterações ocorrem sobre as células NK provocadas pelo HIV, podendo ocorrer acúmulo de um terceiro subconjunto,  $CD56^{\text{neg}} CD16^{\text{pos}}$ , que são raras em indivíduos saudáveis e não apresentam capacidade de produção e secreção de citocinas [7, 8]. Alguns autores propuseram que o aumento desse subconjunto de células pode influenciar a população total das células NK [7], que parece estar aumentada ou com o mesmo número de indivíduos sem a infecção [7, 9].

Além destes, a atividade da célula NK depende da interação entre os receptores KIR (do inglês: *Killer Immunoglobulin-like Receptors*) de membrana e seus ligantes *HLA* (do inglês: *Human Leucocyte Antigen*) presentes nas células-alvo [10]. Esses receptores, são membros de um grupo de moléculas regulatórias presentes na superfície de células NK e o balanço entre a ativação e inibição da célula NK se dá pela ligação de KIR com as moléculas *HLA* de classe I presentes em todas as células nucleadas de um indivíduo [8]. Para ação efetiva sobre as células-alvo, as células NK dependem de sua habilidade em reconhecer a expressão anormal, que pode ser a diminuição ou a ausência, de moléculas *HLA* na superfície dessas células, diferenciando-as das células normais ou próprias do organismo que expressam constitutivamente moléculas *HLA* [11].

Essa interação foi associada com a susceptibilidade ou proteção contra doenças infecciosas, inclusive com a aids. Todas as evidências disponíveis apontam para o *HLA* como o mais significativo no controle diferencial do HIV em humanos [8].

O número de células NK parece estar alterado em indivíduos com a infecção pelo HIV-1, porém essa informação não está confirmada na literatura, uma vez que nenhuma alteração no quantitativo de células NK, foi encontrada por alguns autores. Além do número, a função dessas células depende de seus receptores KIR de membrana e de suas interações com ligantes HLA. Algumas associações da infecção pelo HIV e os genes *HLA* e *KIR* já estão bem estabelecidas, outras ainda merecem ser investigadas. Dessa forma, identificar o comportamento das células NK em relação ao número, confirmar associações estabelecidas dos genes *HLA* e *KIR* e investigar outras possíveis, poderiam ser úteis para prever as taxas de progressão da doença e auxiliar a delinear modos que podem levar ao desenvolvimento de novas opções terapêuticas e de vacinas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a contagem de células NK e a associação dos genes *KIR* e *HLA* de classe I com a infecção pelo HIV e progressão para aids.

## **Materiais e Métodos**

### **Grupos de Estudo**

Os indivíduos participantes do presente estudo foram incluídos a partir da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (COPEP) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) (Parecer nº 1.022.484/2015).

As informações para caracterização epidemiológica (Idade, sexo, carga viral, CD4+, CD8+) foram coletadas por meio de investigação em prontuários no Serviço de Atendimento Especializado (SAE) em DST/AIDS do município de Maringá, Estado do Paraná, e por meio de aplicação de questionário no momento da abordagem do paciente no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá, quando da realização da quantificação da carga viral e linfócitos T CD4+/CD8+, no período de abril a dezembro de 2015.

Este foi um estudo transversal com obtenção de amostras de forma consecutiva e seriada, por conveniência de tempo e local. A amostra foi constituída por 99 pacientes infectados com HIV-1, atendidos no SAE, que também atende aos pacientes provenientes dos

outros 29 municípios pertencentes a 15ª Regional de Saúde do Estado do Paraná. O grupo controle foi composto por 99 indivíduos que compareceram ao LEPAC para a realização de exames não relacionados a infecção pelo HIV-1 após serem convidados a participar da pesquisa, sendo que, foi realizada a consulta dos nomes dos pacientes do grupo controle no Sistema de Controle Logístico de Medicamentos (SICLOM) e no Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4+/CD8+ e Carga Viral (SISCEL), ambos do Ministério da Saúde, para confirmação de não se tratar de um paciente infectado pelo HIV-1.

Foram incluídos pacientes maiores de 18 anos de idade, ambos os sexos, e que apresentaram sorologia não reagente para as hepatites virais B e C, conforme consultado nos prontuários dos pacientes infectados pelo HIV-1 ou que alegaram não serem portadores, para os pacientes do grupo controle. Além disso, os pacientes de origem oriental não foram incluídos no estudo. Os grupos de pacientes com HIV-1 (grupo HIV) e controle foram pareados conforme sexo e idade. O grupo HIV foi classificado em dois grupos: O grupo aids, constituído por 19 indivíduos que apresentaram contagem de linfócitos T CD4+ < 350 células/mm<sup>3</sup>, e o grupo sem aids, com 80 indivíduos que apresentaram contagem de linfócitos T CD4+ > 350 células/mm<sup>3</sup> [12].

### **Quantificação de Células NK**

A quantificação de células NK foi realizada a partir do sangue periférico, coletado em tubo a vácuo de 5 mL contendo EDTA, com o emprego de citometria de fluxo utilizando o kit Tritest CD3 FITC/CD16 + CD56 PE/CD45 PerCP Reagent (BD Biosciences, San Jose, CA) usando o aparelho FACSCalibur (Becton-Dickinson, New Jersey, USA), conforme as instruções do fabricante, e os resultados expressos em células/mm<sup>3</sup>.

### **Extração do DNA**

Foi coletado sangue periférico em tubo a vácuo de 5 mL contendo EDTA. O DNA genômico foi extraído da camada leucocitária, pelo Kit de extração DNA BIOPUR® (Biometrix, Curitiba, Paraná, Brasil). Em seguida, a concentração e a pureza das amostras de DNA foram determinadas por NanoDrop® 2000 UV-Vis espectrofotômetro e a concentração e integridade do DNA foram confirmadas em gel de agarose a 2%. As concentrações foram ajustadas para 20 ng/μL.

### Técnicas de genotipagem

As amostras foram tipificadas para os genes *KIR* e *HLA-A, B e C* pela metodologia PCR-SSOR (*Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotide Reverse*), empregando-se a tecnologia Luminex® (One Lambda®, Canoga Park, CA, USA), utilizando o kit LABType SSO TYPING TESTS (One Lambda®, Canoga Park, CA, USA), de acordo com instruções do fabricante. Resumidamente, o DNA alvo foi amplificado por PCR com iniciadores do loco específico, o produto foi biotilado e detectado pela R-ficoeritrina conjugada com estreptavidina (SAPE). O produto de PCR foi desnaturado e hibridizado com sondas de DNA complementares conjugadas a microesferas (*beads*) fluorescentes. O citômetro de fluxo LABScan 100 (Luminex® 100/200), identificou a intensidade de fluorescência em cada microesfera e os resultados foram analisados pelo programa HLA Fusion™ versão 3.0. Para genotipagem do gene *KIR*, foi utilizado o Kit LABType® SSO (One Lambda®, Canoga Park, CA, USA), para *HLA-A e HLA-B* foi utilizado um Kit LABType® higherresolution (HD) alta resolução (One Lambda®, Canoga Park, CA, USA) e para o locus *HLA-C* foi utilizado o Kit LABType® SSO (One Lambda®, Canoga Park, CA, USA). Quando não foi possível determinar o alelo específico dos genes *HLA-A, HLA-B e HLA-C* por meio de dos Kits, este foi determinado utilizando o site Allele Frequencies disponível no link: <http://www.allelefrequencies.net/>.

Para análise da influência dos genes *KIR* com seus respectivos ligantes, os pacientes e controles foram classificados em pacientes Bw4, quando este epítipo se apresentou em heterozigose, ou em Bw4/Bw4, em homozigose. Foram, ainda, classificados em indivíduos que possuem ligante *HLA-C* do grupo C1 (-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8, -Cw12, -Cw14, -Cw16) e grupo C2 (-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6, -Cw15, -Cw17, -Cw18) [13].

### Análise Estatística

As frequências alélicas para o *HLA* de classe I foram obtidas pelo software Arlequin 3.5.1.2 – *Population Genetics CMPG lab* [14] e as frequências dos genes *KIR* e dos seus ligantes de *HLA* de classe I foram obtidos através de contagem direta.

Para verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as frequências alélicas de cada grupo das amostras de pacientes e controles e para comparar variáveis categóricas foram realizados o teste de qui-quadrado com correção de Yates ou teste exato de Fisher bicaudal, utilizando-se a tabela de contingência 2x2, com intervalo de confiança (IC) de 95%.

O risco de desenvolver aids foi calculado por meio da determinação de *Odds Ratio* (OR ou razão de probabilidade) para valores de  $p < 0,05$ , usando-se o programa *OpenEpi* versão 3.03a (<http://www.openepi.com/TwoByTwo/TwoByTwo.htm>).

Para comparar os dados contínuos o teste de Mann Whitney foi utilizado por meio do programa Bioestat [15]. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Para *HLA* de classe I, a correção de Bonferroni ( $P_c$ ) foi realizada quando os alelos apresentaram valores de  $p$  significativos.

Para verificar se as frequências genóticas do *HLA* de classe I estavam em equilíbrio segundo o Teorema de Hardy-Weinberg se utilizou o *software* Arlequin 3.5.1.2 – *Population Genetics CMPG lab*, o qual aplica o método de Guo e Thompson [14]. Considerando que *KIR2DL2* e *KIR2DL3* segregam como alelos do mesmo loco [16], o equilíbrio de Hardy-Weinberg para os genes *KIR* também foi calculado por meio deste método.

## Resultados

Os grupos HIV e controle foram pareados em relação ao sexo e idade, portanto, não houve diferença entre essas variáveis em ambos os grupos ( $p > 0,05$ ). A idade variou entre 21 a 72 anos para o grupo HIV, que apresentou idade mediana de 45 anos, com quartil inferior ( $Q_{25\%}$ ) de 35 anos e superior ( $Q_{75\%}$ ) de 53 anos. Entre o grupo controle, variou entre 18 e 71 anos, apresentando mediana de 46 anos, com  $Q_{25\%} = 30$  anos e  $Q_{75\%} = 58$  anos. Para os indivíduos do grupo aids, a mediana foi de 46 anos, com  $Q_{25\%} = 34$  de e  $Q_{75\%} = 51$ , e entre o grupo Sem aids, a mediana foi de 44,5 anos, com  $Q_{25\%} = 35,5$   $Q_{75\%} = 53$ .

### Contagem de células NK e carga viral

Os dados referentes à contagem de células NK e carga viral estão apresentados na Tabela 1.

O número absoluto de células NK, sua porcentagem em relação aos linfócitos totais e a contagem de linfócitos totais foram maiores no grupo controle (333 células/mm<sup>3</sup>; 14,51%; 2.316 células/mm<sup>3</sup>, respectivamente) em relação ao grupo HIV (266 células/mm<sup>3</sup>; 13,18%; 2.144 células/mm<sup>3</sup>, respectivamente) e no grupo sem aids (291 células/mm<sup>3</sup>; 13,03%; 2.243 células/mm<sup>3</sup>, respectivamente) em relação ao grupo aids (174 células/mm<sup>3</sup>; 12,88%; 1.381 células/mm<sup>3</sup>, respectivamente).

No grupo aids a carga viral foi detectada em 52,6% dos indivíduos, enquanto que o grupo sem aids apresentou 15,0% de detecção.

### Genes *KIR*

A distribuição de frequências dos genes *KIR* para os grupos estudados está apresentada na Tabela 2. Não houve diferença na distribuição de frequência desses genes entre os grupos estudados, assim como para os haplótipos A e B, que estão distribuídos igualmente nos grupos.

Os dados da distribuição dos genes *KIR* juntamente com seus ligantes HLA classe I estão apresentados na Tabela 3. Para a combinação KIRD3L1-Bw4/Bw4, o grupo HIV apresentou maior frequência em relação ao controle ( $p = 0,03$ ; OR = 2,36; IC = 1,13 – 4,915).

### Genes *HLA*

A análise da distribuição dos alelos do *HLA* das amostras dos pacientes infectados pelo HIV-1 e controles indica que a população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os três locos analisados (*HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*) e para os genes *KIR*.

Os alelos, grupos alélicos e haplótipos associados ao grupo HIV comparado ao controle estão descritos na Tabela 4. Os alelos, grupos alélicos e haplótipos associados ao grupo aids comparado ao sem aids estão descritos na Tabela 5. Após a Correção de Bonferroni, todos os valores de P foram maiores que 0,05.

### HIV vs. controle

O alelo A\*68:02 apresentou uma frequência maior no grupo HIV em relação ao grupo controle ( $p = 0,015$ ; OR = 13,41; IC = 0,2814 – indefinido; Pc = 0,082). Porém, quando foi considerado somente o grupo alélico, o alelo A\*68 não mostrou diferença (Tabela 4). O alelo A\*23:01 foi mais frequente no grupo controle em relação ao HIV ( $p = 0,05$ ; OR = 0,26; IC = 0,07 – 0,95).

Observou-se que os haplótipos A\*02\_B\*44\_C\*05 ( $p = 0,003$ ; OR = 17,72; IC = 2,029 – indefinido), A\*32\_B\*35\_C\*04 ( $p = 0,015$ ; OR = 13,41 IC = 1,468 – indefinido; Pc = 0,015), A\*32\_B\*35 ( $p = 0,03$ ; OR = 11,29; IC = 1,19 – Indefinido), A\*30\_C\*06 ( $p = 0,01$ ; OR = 11,29; IC = 1,19 – indefinido), A\*68\_C\*07 ( $p = 0,01$ ; OR = 11,29; IC = 1,19 – indefinido) foram mais frequentes no grupo HIV em relação ao grupo controle (Tabela 4).

Os haplótipos A\*03:01\_C\*04:01 ( $p = 0,01$ ; OR = 0,05; IC = 0,002 – 0,78) e A\*03\_C\*04 ( $p = 0,01$ ; OR = 0,09; IC = 0,002 – 0,68) foram mais frequentes no grupo controle em relação ao Grupo HIV.

### aids vs. sem aids

Observou-se que os alelos *A\*01:01* ( $p < 0,05$ ; OR = 3,612; IC = 1,34 – 9,73;  $p_c = 0,342$ ), *A\*33:01* ( $p < 0,05$ ; OR = 22,46; IC = 1,794 – indefinido;  $p_c = 0,247$ ) foram mais frequentes no grupo aids em relação ao sem aids (Tabela 5).

Os haplótipos *A\*01\_B\*51\_C\*15*, *A\*01\_B\*53\_C\*04*, *A\*68\_B\*44\_C\*15*, *A\*01:01\_B\*51:01\_C\*15:02*, *A\*68:01\_B\*44:02\_C\*05:01* apresentaram maior frequência no grupo aids em relação ao sem aids ( $p = 0,015$ ; OR = 21,27; IC = 1,701 – indefinido). Essa mesma associação foi encontrada para o haplótipos *A\*01:01\_B\*08:01\_C\*07:01* ( $p = 0,002$ ; OR = 32,36; IC = 2,927 – indefinido), *A\*29:02\_B\*15:01*, *A\*01\_B\*51*, *A\*01\_B\*53*, *A\*23\_B\*44*, *A\*30\_B\*58*, *A\*68:01\_C\*05:01*, *A\*01\_C\*15*, *A\*68\_C\*05* ( $p = 0,01$ ; OR = 22,46; IC = 1,79 – Indefinido) e *A\*01\_C\*07* ( $p = 0,03$ ; OR = 4,69; IC = 1,28 – 17,15).

### Discussão

Os principais resultados do presente estudo em relação às células NK foram que essas células, em indivíduos infectados pelo HIV, mostraram-se com número reduzido em relação ao grupo controle, e no grupo aids em relação ao grupo sem aids. No grupo aids, que possui a contagem de células NK inferior aos indivíduos do grupo sem aids, a carga viral foi detectada em 52,6% dos indivíduos, enquanto que o grupo sem aids apresentou 15,0% de detecção. Esses dados corroboram a importância das células NK na replicação do HIV e controle da carga viral.

Na infecção por HIV-1, as células NK têm demonstrado potencial controle da replicação viral. Durante a fase aguda da doença, essas células se expandem em decorrência da infecção [7, 9]. Durante a fase crônica pelo HIV-1, a citotoxicidade das células NK, assim como a produção de citocinas, estão diminuídas [17]. Mavilio et al. (2005) propuseram que as suas subpopulações ( $CD56^{dim}$ ,  $CD56^{bright}$  e  $CD56^{neg}$ ) podem influenciar a população total de células NK. Alter et al. (2005) sugeriram que as células  $CD56^{dim}$  e  $CD56^{bright}$  estão significativamente em menor número na infecção crônica pelo HIV, mas que o número total de células NK não está alterado em relação aos indivíduos que não possuem o vírus. Essa diferença foi associada com o aumento da subpopulação de células NK  $CD56^{neg}$  [7, 9]. Em nosso estudo, verificou-se que as células NK estão diminuídas em relação a indivíduos do grupo controle, havendo a necessidade de melhor se avaliar, em estudos posteriores, a relação dessas células  $CD56^{neg}$  em indivíduos HIV positivo em que a população total de células NK está diminuída, uma vez que essa relação não foi encontrada na literatura consultada.



Outro importante resultado do presente estudo foi em relação a combinação KIR3DL1 – Bw4/Bw4 em homozigose, onde esteve presente em maior número nos indivíduos com a infecção pelo HIV do que em indivíduos do grupo controle, indicando maior vulnerabilidade para os indivíduos infectados pelo HIV-1.

Em inúmeros estudos, os genes KIR têm sido associados à suscetibilidade ou à proteção contra o HIV [17-21]. Ao estudarem a expressão de *KIR3DL1*, produção de citocinas e degranulação das células NK em pacientes com HIV positivo e HIV negativo, Parsons et al. (2012) encontraram efeito protetor para a infecção pelo HIV. O mecanismo proposto é que o *KIR3DL1* com o ligante *HLA Bw4* seja inibitório, mas o HIV diminui a expressão do HLA-B na superfície celular e, dessa forma, há um reconhecimento pela célula NK (não ocorre a inibição dessa célula) e ela medeia a sua citotoxicidade sobre a célula infectada [20]. Porém, não fizeram a diferenciação se o ligante Bw4 se apresentava em homozigose ou heterozigose.

Hernandez-Ramirez et al. (2015) propuseram que o efeito protetor é observado tanto quando o KIR3DL1 é ligante de Bw4 em homozigose quanto em heterozigose [21], diferindo do encontrado nesse estudo.

Diferente do encontrado por Parsons et al. (2012) e Hernandez-Ramirez et al. (2015), nesse estudo, a associação do ligante KIR3DL1 – Bw4/Bw4 apresentou susceptibilidade a infecção pelo HIV. Dessa forma, seria necessário, em estudos futuros, avaliar se a expressão do ligante Bw4 realmente está diminuída nos pacientes, pois se não estiver alterada, seria esperado que a interação do ligante Bw4 com o receptor inibitório 3DL1, inibiria a célula NK e essa poderia ter suas funções sobre a célula alvo prejudicadas.

Em relação ao grupo aids comparado ao grupo sem aids, os genes *KIR*, com seus respectivos ligantes, não mostraram influenciar a progressão da doença, nenhuma diferença foi encontrada em relação ao KIR3DL1-Bw4 e a progressão para aids. O fato de não se encontrar significância estatística pode ter ocorrido pelo número reduzido de participantes. Em estudos futuros poderia se aumentar o número de indivíduos participantes no grupo aids para confirmar a associação do KIR3DL1 com seu ligante *HLA-Bw4* com a progressão para a doença, considerando que muitos estudos têm mostrado que essa combinação controla a replicação viral do HIV-1 e gera proteção contra infecções oportunistas [18, 20, 22-24].

Sabe-se que o HIV diminui a expressão do *HLA*. Isso faz com que as células NK fiquem ativadas para efetuar a lise das células alvo. Entretanto, também é de conhecimento que o vírus diminui a expressão das moléculas *HLA-A* e *B*, mas pode manter a expressão do *HLA-C*, auxiliando a evasão do reconhecimento pelas NK [8].

Em relação a distribuição de frequência *KIR* entre os grupos, não houve associação entre esses genes e a infecção pelo HIV ou progressão para a doença. Os haplótipos A e B se mostraram distribuídos igualmente nos grupos de estudo dessa pesquisa.

Outro resultado importante foi a associação do alelo *HLA-A\*68:02* à infecção pelo HIV, do alelo *A\*23:01* à proteção a infecção e do alelo *A\*01:01* à progressão para a aids.

Em relação ao alelo *A\*68:02* que, nesse estudo, foi associado à infecção pelo HIV, esse resultado também foi observado por Song *et al.* (2011), que conduziram um estudo onde foi avaliado o impacto dos genes do *HLA* classe I na aquisição do HIV por casais heterossexuais sorodiscordantes [25]. Além do alelo, nós também demonstramos que o haplótipo *HLA-A\*68\_C\*07* estava associado à infecção pelo HIV. A predisposição deste haplótipo sugere ser fornecida pelo alelo *A\*68:02*, pois mesmo associado ao grupo alélico *C\*07*, que é protetor [26, 27], foi associado à infecção pelo HIV.

Em um estudo realizado no Peru com a participação de 246 indivíduos HIV-positivos e 222 HIV-negativos, o alelo de *HLA-A\*23:01* foi associado à predisposição para a infecção [26]. Diferente disso, nesse estudo, a presença do alelo *A\*23:01* sugeriu proteção à infecção pelo HIV.

Além disso, em nosso estudo, enquanto o haplótipo *A\*03:01\_C\*04:01* foi associado à proteção contra a infecção pelo HIV, os haplótipos *A\*32\_B\*35* e *A\*32\_B\*35\_C\*04* foram associados à susceptibilidade contra a doença. A associação do grupo alélico *B\*35* com a infecção pelo HIV já foi observada [28]. Nesse estudo, quando esse grupo alélico foi analisado isoladamente, não houve associação com a infecção pelo HIV e progressão para aids, contudo, quando nos haplótipos *A\*32\_B\*35* e *A\*32\_B\*35\_C\*04*, indicou influenciar na infecção pelo HIV.

Na literatura, o grupo alélico *A\*01* está associado ora à proteção [26, 27], ora à progressão para aids [28]. Nesse estudo, além de estar isoladamente associado à progressão para a doença, a presença desse grupo alélico pode ser averiguada em haplótipos que mostraram suscetibilidade, como *HLA-A\*01\_B\*51*, *A\*01\_B\*53*, *A\*01\_C\*15*, *A\*01\_C\*07*, *A\*01:01\_B\*51:01\_C\*15:02*, *A\*01\_B\*53\_C\*04*, indicando forte associação deste na progressão para a doença. Da mesma forma que para o grupo alélico *A\*68*, a presença do grupo alélico *A\*01*, mesmo na presença do grupo alélico *C\*07*, que está associado à proteção para a progressão para a aids [26, 27], gerou suscetibilidade.

Vários estudos mostraram que os grupos alélicos *B\*51*, *B\*44*, *B\*08* foram associados com a progressão para aids [28]. Nesse estudo, esses alelos não se mostraram associados ao desenvolvimento da doença quando analisados isoladamente, porém quando associados ao

haplótipo, mostraram-se importantes no desenvolvimento da doença. A presença do haplótipo *A\*01\_B\*51* foi associado à susceptibilidade ao desenvolvimento da aids. Na literatura, a presença do grupo alélico *B\*51* foi associada à maior vulnerabilidade ao desenvolvimento da aids; porém, nesse estudo, embora não tenha sido possível detectar a influência do grupo alélico *B\*51* isoladamente, o mesmo, associado ao alelo *A\*01*, conseguiu mostrar sua força no desenvolvimento da doença. O grupo alélico *A\*01* foi isoladamente associado ao desenvolvimento da aids, assim como quando associado aos haplótipos contendo este alelo. A presença do grupo alélico *B\*44* é indicativo de progressão para aids [28]. Nesse estudo, esse alelo não foi associado ao desenvolvimento da aids quando avaliado isoladamente, porém, quando associado aos haplótipos *A\*23\_B\*44*, *A\*68:01\_B\*44:02\_C\*05:01*, essa associação foi evidenciada. Da mesma forma, o grupo alélico *B\*08* não foi associado com a doença quando analisado isoladamente, somente quando no haplótipo *A\*01:01\_B\*08:01\_C\*07:01*.

Na literatura, o grupo alélico *C\*15* não foi associado ao desenvolvimento da aids. Porém, nesse estudo, este grupo alélico, quando analisado em haplótipos, pôde ser associado ao desenvolvimento da aids (*A\*01\_C\*15*, *A\*01:01\_B\*51:01\_C\*15:02*).

O grupo alélico *A\*29* que já foi associado ao desenvolvimento da aids [28], nesse estudo, se mostrou importante apenas quando presente no haplótipo *A\*29:02\_B\*15:01*.

Embora o grupo alélico *B\*57* seja o mais evidente protetor contra a infecção pelo HIV [8], a associação entre esse alelo e proteção para a progressão para o HIV não foi evidenciada nesse estudo. Este grupo alélico está presente em maior frequência em pacientes chamados “controladores de elite”, estimados em 1% dos indivíduos infectados pelo HIV, com sorologia positiva, que apresentam consistentemente (por pelo menos 1 ano) carga viral inferior ao limite de detecção, sem utilizarem a medicação antirretroviral [29]. Todos os pacientes infectados pelo HIV desse estudo faziam uso da medicação antirretroviral e, portanto, não são considerados “controladores de elite”. Dessa forma, nesse estudo, esse grupo alélico foi encontrado na mesma frequência que a observada na população em geral, em aproximadamente 10% dos indivíduos [8, 30, 31].

Outro grupo alélico importante na patogênese do HIV é o *B\*27*, o qual está envolvido na supressão da replicação viral e atraso no início da doença [32-34]. Embora essa associação não tenha sido evidenciada nesse estudo, esse grupo alélico foi encontrado em 3,0% dos infectados e em 6,0% dos controles. Talvez, aumentando o número de participantes na pesquisa, o efeito protetor do *B\*27* poderia ser evidenciado.

Sampathkumar et al. (2014) encontraram rápida progressão para aids em pacientes que possuíam o haplótipo *B\*53\_C\*04*, corroborando com os dados obtidos nesse estudo, onde a

presença do haplótipo *A\*01\_B\*53\_C\*04* indicou suscetibilidade ao desenvolvimento da doença.

## Conclusões

O presente estudo mostrou que a contagem de células NK foi menor no grupo de pacientes HIV em relação aos controles e no grupo aids em relação ao sem aids.

Em relação ao polimorfismo genético, houve associação do gene *KIR3DL1* com seu ligante *HLA-Bw4* em homozigoze com a infecção pelo HIV-1.

A suscetibilidade à infecção pelo HIV foi verificada na presença do alelo *HLA-A\*68:02* e do haplótipo *HLA-A\*68\_C\*07*. A presença do grupo alélico *A\*23* foi associada à proteção contra a infecção. O alelo *A\*01:01* foi associado à progressão para a aids, assim como quando presente em haplótipos. Os grupos alélicos *B\*35*, *B\*51*, *B\*44* e *B\*08* se mostraram importantes na progressão para a doença apenas quando associados a outros grupos alélicos, formando haplótipos.

## **Agradecimentos**

Ao Laboratório de Imunogenética – UEM. Ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) e aos seus técnicos, pela assistência na coleta das amostras. Ao Serviço de Atendimento Especializado (SAE) em DST/AIDS do município de Maringá – PR. A empresa o LabCompany Produtos e Serviços para Laboratórios pela cessão dos Kits para quantificação de células NK. Aos pacientes que participaram desse estudo, sem os quais seria impossível a realização dessa pesquisa.

## **Financiamento e recursos**

Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá (LIG-UEM).

**Divulgação de conflitos de interesse**

Os autores não apresentam conflitos de interesse.



## REFERÊNCIAS

- [1] R.N. Correia, Qual o papel das células natural killer na infecção por VIH-SIDA, (2013).
- [2] E. Vivier, D.H. Raulet, A. Moretta, M.A. Caligiuri, L. Zitvogel, L.L. Lanier, W.M. Yokoyama, S. Ugolini, Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells, *Science*, 331 (2011) 44-49.
- [3] A.K. Abbas, A.H.H. Lichtman, S. Pillai, *Imunologia Celular e Molecular*, Elsevier Brasil, 2012.
- [4] M.A. Cooper, T.A. Fehniger, M.A. Caligiuri, The biology of human natural killer-cell subsets, *Trends Immunol*, 22 (2001) 633-640.
- [5] L.L. Lanier, J.H. Phillips, J. Hackett, Jr., M. Tutt, V. Kumar, Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function, *J Immunol*, 137 (1986) 2735-2739.
- [6] L.L. Lanier, A.M. Le, C.I. Civin, M.R. Loken, J.H. Phillips, The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes, *J Immunol*, 136 (1986) 4480-4486.
- [7] D. Mavilio, G. Lombardo, J. Benjamin, D. Kim, D. Follman, E. Marcenaro, M.A. O'Shea, A. Kinter, C. Kovacs, A. Moretta, Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: A highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (2005) 2886-2891.
- [8] M.P. Martin, M. Carrington, Immunogenetics of HIV disease, *Immunol Rev*, 254 (2013) 245-264.
- [9] G. Alter, N. Teigen, B.T. Davis, M.M. Addo, T.J. Suscovich, M.T. Waring, H. Streeck, M.N. Johnston, K.D. Staller, M.T. Zaman, X.G. Yu, M. Lichterfeld, N. Basgoz, E.S. Rosenberg, M. Altfeld, Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection, *Blood*, 106 (2005) 3366-3369.
- [10] M. Jobim, L.F.J. Jobim, Células natural killer e vigilância imunológica, *Jornal de Pediatria*, 84 (2008) S58.
- [11] E. Vivier, F. Romagne, Good news, bad news for missing-self recognition by NK cells: autoimmune control but viral evasion, *Immunity*, 26 (2007) 549-551.
- [12] S. Ministério da, Critérios de definição de casos de AIDS em adultos e crianças, in, Ministério da Saúde Brasília, 2004.
- [13] H. Park, E.Y. Rho, J.W. In, I. Kim, S.S. Yoon, S. Park, S. Shin, K.U. Park, E.Y. Song, The impact of HLA and KIR ligand mismatching on unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Korean adult patients, *Ann Lab Med*, 35 (2015) 111-117.
- [14] L. Excoffier, H.E.L. Lischer, Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows, *Molecular ecology resources*, 10 (2010) 564-567.
- [15] M. Ayres, BioEstat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas (Software). Version 5.3, in, 2009.
- [16] J.A. Hollenbach, M.B. Ladner, K. Saeteurn, K.D. Taylor, L. Mei, T. Haritunians, D.P. McGovern, H.A. Erlich, J.I. Rotter, E.A. Trachtenberg, Susceptibility to Crohn's disease is mediated by KIR2DL2/KIR2DL3 heterozygosity and the HLA-C ligand, *Immunogenetics*, 61 (2009) 663-671.
- [17] E. Brunetta, K.L. Hudspeth, D. Mavilio, Pathologic natural killer cell subset redistribution in HIV-1 infection: new insights in pathophysiology and clinical outcomes, *J Leukoc Biol*, 88 (2010) 1119-1130.
- [18] G. Alter, M.P. Martin, N. Teigen, W.H. Carr, T.J. Suscovich, A. Schneidewind, H. Streeck, M. Waring, A. Meier, C. Brander, J.D. Lifson, T.M. Allen, M. Carrington, M. Altfeld, Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes, *J Exp Med*, 204 (2007) 3027-3036.

- [19] A.M. Merino, A.S. Dugast, C.M. Wilson, P.A. Goepfert, G. Alter, R.A. Kaslow, J. Tang, KIR2DS4 promotes HIV-1 pathogenesis: new evidence from analyses of immunogenetic data and natural killer cell function, *PLoS One*, 9 (2014) e99353.
- [20] M.S. Parsons, L. Wren, G. Isitman, M. Navis, I. Stratov, N.F. Bernard, S.J. Kent, HIV infection abrogates the functional advantage of natural killer cells educated through KIR3DL1/HLA-Bw4 interactions to mediate anti-HIV antibody-dependent cellular cytotoxicity, *J Virol*, 86 (2012) 4488-4495.
- [21] D. Hernandez-Ramirez, M.A. Esparza-Perez, J.L. Ramirez-Garcialuna, J.R. Arguello, P.B. Mandeville, D.E. Noyola, C.A. Garcia-Sepulveda, Association of KIR3DL1/S1 and HLA-Bw4 with CD4 T cell counts in HIV-infected Mexican mestizos, *Immunogenetics*, 67 (2015) 413-424.
- [22] J.D. Barbour, U. Sriram, S.J. Caillier, J.A. Levy, F.M. Hecht, J.R. Oksenberg, Synergy or independence? Deciphering the interaction of HLA Class I and NK cell KIR alleles in early HIV-1 disease progression, *PLoS Pathog*, 3 (2007) e43.
- [23] K. Zipperlen, M. Gallant, S. Stapleton, J. Heath, L. Barrett, M. Grant, Protective genotypes in HIV infection reflect superior function of KIR3DS1+ over KIR3DL1+ CD8+ T cells, *Immunol Cell Biol*, 93 (2015) 67-76.
- [24] H.A. Stephens, Immunogenetic surveillance of HIV/AIDS, *Infect Genet Evol*, 12 (2012) 1481-1491.
- [25] W. Song, D. He, I. Brill, R. Malhotra, J. Mulenga, S. Allen, E. Hunter, J. Tang, R.A. Kaslow, Disparate Associations of HLA Class I Markers with HIV-1 Acquisition and Control of Viremia in an African Population, *PLoS ONE*, 6 (2011) e23469.
- [26] A. Olvera, S. Pérez-Álvarez, J. Ibarrondo, C. Ganoza, J.R. Lama, A. Lucchetti, S. Cate, W. Hildebrand, N. Bernard, L. Gomez, The HLA-C\* 04: 01/KIR2DS4 gene combination and human leukocyte antigen alleles with high population frequency drive rate of HIV disease progression, *AIDS*, 29 (2015) 507-517.
- [27] T.A. Peterson, J. Kimani, C. Wachihi, T. Bielawny, L. Mendoza, S. Thavaneswaran, M.J. Narayansingh, T. Kariri, B. Liang, T.B. Ball, E.N. Ngugi, F.A. Plummer, M. Luo, HLA class I associations with rates of HIV-1 seroconversion and disease progression in the Pumwani Sex Worker Cohort, *Tissue Antigens*, 81 (2013) 93-107.
- [28] G. Kaur, N. Mehra, Genetic determinants of HIV-1 infection and progression to AIDS: immune response genes, *Tissue antigens*, 74 (2009) 373-385.
- [29] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. *Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV.*, ed. 2014.
- [30] S.A. Migueles, M.S. Sabbaghian, W.L. Shupert, M.P. Bettinotti, F.M. Marincola, L. Martino, C.W. Hallahan, S.M. Selig, D. Schwartz, J. Sullivan, M. Connors, HLA B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (2000) 2709-2714.
- [31] F. Pereyra, M.M. Addo, D.E. Kaufmann, Y. Liu, T. Miura, A. Rathod, B. Baker, A. Trocha, R. Rosenberg, E. Mackey, P. Ueda, Z. Lu, D. Cohen, T. Wrin, C.J. Petropoulos, E.S. Rosenberg, B.D. Walker, Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy, *J Infect Dis*, 197 (2008) 563-571.
- [32] J. Brener, A. Gall, R. Batorsky, L. Riddell, S. Buus, E. Leitman, P. Kellam, T. Allen, P. Goulder, P.C. Matthews, Disease progression despite protective HLA expression in an HIV-infected transmission pair, *Retrovirology*, 12 (2015) 55.
- [33] A. Bansal, T. Mann, S. Sterrett, B.J. Peng, A. Bet, J.M. Carlson, P.A. Goepfert, Enhanced Recognition of HIV-1 Cryptic Epitopes Restricted by HLA Class I Alleles Associated With a Favorable Clinical Outcome, *J Acquir Immune Defic Syndr*, 70 (2015) 1-8.
- [34] H.N. Klooverpris, A. Leslie, P. Goulder, Role of HLA Adaptation in HIV Evolution, *Front Immunol*, 6 (2015) 665.

## TABELAS

Tabela 1. Contagem de células NK e Carga Viral dos indivíduos dos grupos HIV, aids, sem aids e controle.

Variáveis	Grupos de Indivíduos			
	HIV	aids	sem aids	controle
	N = 99 (%)	N = 19 (%)	N = 80 (%)	N = 99 (%)
Linfócitos NK (mediana) <sup>a</sup> :				
Células/mm <sup>3</sup>	266	174	291	333
%	13,18	12,88	13,03	14,51
Linfócitos Totais (mediana) <sup>a</sup>	2.144	1.381	2.243	2.316
Carga Vira (cópias/mL):				
Detectada <sup>b</sup>	22 (22,2)	10 (52,6)	12 (15,0)	NR
Indetectada ou < Limite Detecção <sup>c</sup>	77 (77,8)	9 (47,4)	68 (85,0)	

N = total de indivíduos. NR = Não Realizada.

NOTA:

**a)**  $p < 0,05$  quando comparados os grupos HIV vs. Controle, Aids vs. Sem Aids.

**b)** Para Aids vs. Sem aids:  $p = 0,001$ ; OR = 6,30; IC = 2.11 – 18.72.

**c)** Para Aids vs. Sem aids:  $p = 0,001$ ; OR = 0,16; IC = 0,05 – 0,47.

Tabela 2. Distribuição de frequência dos genes *KIR* e haplótipos A e B nos grupos HIV, aids, sem aids e controle.

Genes <i>KIR</i> e Haplótipos	Grupos de Indivíduos			
	HIV	aids	sem aids	controle
	N = 99	N = 19	N = 80	N = 99
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>2DL1</i>	97 (98,0)	19 (100,0)	78 (97,5)	95 (95,9)
<i>2DL2</i>	57 (57,6)	9 (47,4)	48 (60,0)	53 (53,5)
<i>2DL3</i>	88 (88,9)	17 (89,5)	71 (88,7)	92 (92,9)
<i>2DL4</i>	98 (99,0)	18 (94,7)	80 (100,0)	98 (99,0)
<i>2DL5</i>	58 (58,6)	11 (57,9)	47 (58,7)	59 (59,6)
<i>3DL1</i>	90 (90,9)	15 (78,9)	75 (93,7)	94 (94,9)
<i>3DL2</i>	99 (100,0)	19 (100,0)	80 (100,0)	99 (100,0)
<i>3DL3</i>	99 (100,0)	19 (100,0)	80 (100,0)	98 (99,0)
<i>2DS1</i>	48 (48,5)	10 (52,6)	38 (47,5)	38 (38,4)
<i>2DS2</i>	55 (55,5)	9 (47,4)	46 (60,0)	54 (54,5)
<i>2DS3</i>	24 (24,2)	3 (15,8)	21 (26,2)	35 (35,3)
<i>2DS4</i>	88 (88,9)	15 (78,9)	73 (91,2)	94 (94,9)
<i>2DS5</i>	45 (45,4)	9 (47,4)	36 (45,0)	38 (38,4)
<i>3DS1</i>	46 (46,5)	9 (47,4)	37 (46,2)	38 (38,4)
<i>2DP1</i>	97 (98,0)	19(100,0)	78 (97,5)	96 (97,0)
<i>3DP1</i>	98 (99,0)	18 (94,7)	80 (100,0)	99 (100,0)
Haplótipo A	24 (24,2)	5 (26,3)	19 (23,8)	27 (27,3)
Haplótipo B	75 (75,8)	14 (73,4)	61 (73,2)	72 (72,7)

N = número de indivíduos; n = número de indivíduos que possuem o gene *KIR* indicado. Não houve diferenças na distribuição de frequência dos genes *KIR* e dos haplótipos A e B nos grupos estudados.

Tabela 3. Distribuição de frequência dos genes *KIR* com seus ligantes *HLA* classe I.

Genes <i>KIR</i> com ligantes <i>HLA</i> classe I	Grupos de Indivíduos			
	HIV	aids	sem aids	controle
	N = 99 n (%)	N = 19 n (%)	N = 80 n (%)	N = 99 n (%)
<i>2DL1 – C2</i>	51/97(52,6)	10/19 (52,6)	41/78 (52,6)	50/95 (52,6)
<i>2DL1 – C2/C2</i>	24/97 (24,7)	5/19 (26,3)	19/78 (24,4)	18/95 (18,9)
<i>2DL2 – C1</i>	30/57 (52,6)	4/9 (44,4)	26/48 (54,2)	30/53 (56,6)
<i>2DL2 – C1/C1</i>	13/57 (22,8)	4/9 (44,4)	9/48 (18,8)	15/53 (28,3)
<i>2DL3 – C1</i>	45/88 (51,1)	9/17 (52,9)	36/71 (50,7)	48/92 (52,2)
<i>2DL3 – C1/C1</i>	20/88 (22,7)	3/17 (17,6)	17/71 (23,9)	26/92 (28,3)
<i>3DL1 – Bw4</i>	47/90 (52,2)	6/15 (40,0)	41/75 (54,7)	59/94 (62,8)
<i>3DL1 – Bw4/Bw4</i>	26/90 (28,9) <sup>a</sup>	6/15 (40,0)	20/75 (26,7)	13/94 (13,8)
<i>3DL2 – A*03/A*11</i>	23/99 (23,2)	4/19 (21)	19/80 (23,7)	32/99 (32,3)
<i>2DS1 – C2</i>	21/48 (43,7)	5/10 (50,0)	16/38 (42,1)	17/38 (44,7)
<i>2DS1 – C2/C2</i>	13/48 (27,1)	3/10 (30,0)	10/38 (26,3)	9/38 (23,7)
<i>2DS2 – C1</i>	31/55 (56,4)	4/9 (44,4)	27/46 (58,69)	29/54 (53,7)
<i>2DS2 – C1/C1</i>	10/55 (18,2)	4/9 (44,4)	6/46 (13,0)	15/54 (27,7)
<i>3DS1 – Bw4</i>	27/46 (58,7)	5/9 (55,5)	22/37 (59,45)	23/38 (60,5)
<i>3DS1 – Bw4/Bw4</i>	10/46 (21,7)	3/9 (33,3)	7/37 (18,9)	8/38 (21,0)

N = número de indivíduos. n: número de pacientes que possuem o receptor *KIR* associados ao seu ligante de *HLA* de classe I; p: p valor; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança

NOTA:

<sup>a</sup> Para os grupos HIV vs. Controle: p = 0,020; OR = 2,531; IC = 1,205 – 5,316.

Tabela 4. Alelos e haplótipos dos genes *HLA* de classe I associados ao grupo HIV comparado ao grupo controle.

Alelos e haplótipos dos genes <i>HLA</i> de classe I	Grupos de Indivíduos				
	HIV	controle	p	OR	IC
	N = 99 n (%)	N = 99 N (%)			
<i>A*23</i>	3 (1,5)	11 (5,5)	0,05	0,26	0,07 – 0,95
<i>A*23:01</i>	3 (1,5)	11 (5,5)	0,05	0,26	0,07 – 0,95
<i>A*68:02</i>	6 (3,0)	0	0,01	13,41	1,46 – I
<i>A*32_B*35</i>	6 (2,5)	0	0,01	13,41	1,47 – I
<i>A*03:01_C*04:01</i>	0	9 (4,5)	0,01	0,05	0,002 – 0,78
<i>A*03_C*04</i>	1 (0,5)	10 (5,1)	0,01	0,09	0,002 – 0,78
<i>A*30_C*06</i>	5 (2,5)	0	0,03	11,29	1,19 – I
<i>A*68_C*07</i>	5 (2,5)	0	0,03	11,29	1,19 – I
<i>A*02_B*44_C*05</i>	8 (4,0)	0	0,003	17,72	2,03 – I
<i>A*32_B*35_C*04</i>	6 (3,0)	0	0,01	13,41	1,47 – I

N = número de indivíduos; n: número de alelos/haplótipos; p: valor de p; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; I : indefinido.

Tabela 5. Alelos e haplótipos dos genes *HLA* de classe I associados ao grupo aids comparado ao grupo sem aids.

Alelos e haplótipos dos genes <i>HLA</i> de classe I	Grupos de Indivíduos				
	aids	sem aids	p	OR	IC
	N = 19 n (%)	N = 80 N (%)			
<i>A*01:01</i>	8 (21,1)	11 (6,9)	0,02	3,61	1,34 – 9,74
<i>A*33:01</i>	2 (5,3)	0	0,01	22,46	1,79 – I
<i>A*29:02_B*15:01</i>	2 (5,3)	0	0,01	22,46	1,79 – I
<i>A*01_B*51</i>	2 (5,3)	0	0,01	22,46	1,79 – I
<i>A*01_B*53</i>	2 (5,3)	0	0,01	22,46	1,79 – I
<i>A*23_B*44</i>	2 (5,3)	0	0,01	22,46	1,79 – I
<i>A*30_B*58</i>	2 (5,3)	0	0,01	22,46	1,79 – I
<i>A*68:01_C*05:01</i>	2 (5,3)	0	0,01	22,46	1,79 – I
<i>A*01_C*15</i>	2 (5,3)	0	0,01	22,46	1,79 – I
<i>A*01_C*07</i>	5 (13,2)	5 (3,1)	0,03	4,70	1,29 – 17,15
<i>A*68_C*05</i>	2 (5,3)	0	0,01	22,46	1,79 – I
<i>B*53:01_C*07:01</i>	2 (5,3)	0	0,01	22,46	1,79 – I
<i>B*15_C*16</i>	2 (5,3)	0	0,01	22,46	1,79 – I
<i>B*53_C*07</i>	2 (5,3)	0	0,01	22,46	1,79 – I
<i>A*01_B*51_C*15</i>	2 (5,3)	0	0,01	21,27	1,70 – I
<i>A*01_B*53_C*04</i>	2 (5,3)	0	0,01	21,27	1,70 – I
<i>A*68_B*44_C*05</i>	2 (5,3)	0	0,01	21,27	1,70 – I
<i>A*01:01_B*08:01_C*07:01</i>	3 (7,9)	0	0,002	32,36	2,93 – I
<i>A*01:01_B*51:01_C*15:02</i>	2 (5,3)	0	0,01	21,27	1,70 – I
<i>A*68:01_B*44:02_C*05:01</i>	2 (5,3)	0	0,01	21,27	1,70 – I

N = número de indivíduos; n: número de alelos/haplótipos; p: valor de p; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; I : indefinido.

## CAPÍTULO III

### CONCLUSÕES

Neste trabalho, as análises das frequências dos genes *HLA* de classe I, assim como de genes *KIR* com seus ligantes *HLA* de classe I, somadas à quantificação de células NK dos indivíduos infectados pelo HIV e indivíduos do grupo Controle, permitiram algumas conclusões:

- A contagem de células NK foi menor no grupo de pacientes HIV em relação aos controles e no grupo Aids em relação ao Sem aids.
- Em relação ao polimorfismo genético, a associação do gene *KIR3DL1* com seus ligantes *HLA* de classe I Bw4/Bw4 sugeriu suscetibilidade à infecção pelo HIV-1.
- A suscetibilidade à infecção pelo HIV foi associada à presença do alelo *HLA-A\*68:02* e do haplótipo *HLA-A\*68\_C\*07*. A presença do grupo alélico *A\*23* sugeriu proteção à infecção. O alelo *A\*01:01* está associado à progressão para a aids, assim como quando presente nos haplótipos *A\*01\_B\*51*, *A\*01\_B\*53*, *A\*01\_C\*15*, *A\*01\_C\*07*, *A\*01:01\_B\*51:01\_C\*15:02* e *A\*01\_B\*53\_C\*07*. Os grupos alélicos *B\*35*, *B\*51*, *B\*44* e *B\*08* se mostraram significantes na progressão para a doença apenas quando associados a outros grupos alélicos, formando haplótipos.



## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Considerando a possibilidade de subpopulações de células NK estarem alteradas e, com isso, poderem manter a contagem de células NK normal, sugere-se a investigação das subpopulações de células NK (CD56<sup>dim</sup>, CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>neg</sup>), principalmente nesta população onde a contagem de células NK está diminuída em indivíduos infectados pelo HIV-1 em relação aos não infectados.

Poderia se verificar a expressão de receptores KIR nas células NK, expressão de moléculas HLA-Bw4 e se essa expressão está realmente diminuída nos pacientes com HIV.

Avaliar a expressão de moléculas HLA de classe I e realizar ensaios de citotoxicidade para averiguar se as células NK, que estão presentes no paciente, são realmente citotóxicas.

Além disso, sugere-se ampliar o número de indivíduos participantes da pesquisa para melhor caracterizar a influência desses genes da resposta imune, uma vez que algumas associações foram evidenciadas, porém sem significância estatística.

## LIMITAÇÕES

Merece ser relatado como limitação o fato de não ter sido realizado o exame sorológico para o grupo controle para confirmação de não se tratar de um indivíduo infectado pelo HIV-1. Porém, foi realizada a consulta dos nomes dos pacientes do grupo controle no Sistema de Controle Logístico de Medicamentos (SICLOM) e no Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4+/CD8+ e Carga Viral (SISCEL), ambos do Ministério da Saúde, para essa confirmação. Além disso, em estudos futuros poderia se aumentar o número de indivíduos participantes no grupo Aids para confirmar a associação do KIR3DL1 com seu ligante HLA-Bw4 com a progressão para a doença, considerando que muitos estudos têm mostrado que essa combinação controla a replicação viral do HIV-1, baixa carga viral e gera proteção contra infecções oportunistas.

Ainda, para determinar as ambiguidades, seria necessário realizar sequenciamento ou genotipagem em alta resolução (SSP), porém, quando não foi possível determinar o alelo específico dos genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* através dos Kits, este foi determinado por meio das frequências alélicas presentes em nossa população disponíveis no site *Allele Frequencies*, disponível no link: <http://www.allelefrequencies.net/>.

## ANEXOS

### Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos - COPEP



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA EM INDIVÍDUOS PORTADORES E NÃO PORTADORES DO HIV

**Pesquisador:** Dennis Armando Bertolini

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 38566214.2.0000.0104

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual de Maringá

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.022.484

**Data da Relatoria:** 13/04/2015

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa proposto por pesquisador vinculado à Universidade Estadual de Maringá.

##### Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar a resposta imune inata em indivíduos portadores do HIV-1 atendidos no Serviço de Atendimento Especializado em DST/AIDS da Secretaria de Saúde do Município de Maringá e em indivíduos não portadores do vírus.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Avalia-se que os possíveis riscos a que estarão sujeitos os participantes da pesquisa serão suplantados pelos benefícios apontados.

##### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão coletadas amostras de sangue periférico com anticoagulante EDTA de todos os pacientes para a quantificação das células NK CD56neg e para a genotipagem de genes KIR e HLA, quando comparecerem ao LEPAC para a realização de exames laboratoriais rotineiros, no período de janeiro a agosto de 2015. Os genótipos de HLA e KIR serão analisados pela metodologia da reação em cadeia da polimerase utilizando-se oligonucleotídeos (sondas) sequência-específicos, do inglês: Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide Probes (PCR-SSOP),

**Endereço:** Av. Colombo, 5790, UEM-PPG

**Bairro:** Jardim Universitário

**CEP:** 87.020-900

**UF:** PR **Município:** MARINGÁ

**Telefone:** (44)3011-4444

**Fax:** (44)3011-4518

**E-mail:** copep@uem.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
MARINGÁ



Continuação do Parecer: 1.022.484

empregando-se a tecnologia Luminex. Esta tecnologia consiste em um sistema de multianálise que trabalha com um conjunto de microesferas codificadas por cores que representam diferentes comprimentos de onda, as quais são analisadas num avançado Citômetro de Fluxo. Microesferas codificadas por uma determinada cor contêm em sua superfície apenas oligonucleotídeos-sonda de mesma sequência. Primeiramente, a região alvo do DNA será amplificada e desnaturada, seguindo-se a hibridização com sondas marcadas e de sequência conhecida. Sendo que a região alvo do DNA será amplificada com o uso de oligonucleotídeos iniciadores biotinilados, então, os produtos marcados são desnaturados e hibridizados em um único tubo com as sondas acopladas às microesferas. Por último, faz-se a marcação com estreptoavidina conjugada com ficoeritrina e a leitura da reação em citômetro de fluxo. A interpretação dos testes será realizada no programa de computador Fusion. A quantificação das células NK CD56neg será realizada pela metodologia de Citometria de Fluxo (BD Trucount™ Tubes) usando o aparelho FACSCalibur (Becton-Dickinson, New Jersey, USA) e os resultados expressos em células/mm<sup>3</sup>. Nos pacientes infectados com HIV-1 será feita a subtipagem do vírus conforme descrito abaixo. Extração do RNA e obtenção do cDNA: A extração do RNA do HIV-1 será realizada utilizando-se o kit de extração QIAmp® Viral RNA Mini Handbook (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Amplificação do gene pol: Para a primeira etapa da reação de nested-PCR será amplificada a região do gene pol utilizando os iniciadores K1 (CAGAGCCAACAGCCCCACCA) e K2 (TTTCCCCACTAATTCTGTATGTCATTGACA) obtendo-se um fragmento de 1,2 Kb do gene da polimerase. A segunda amplificação permitirá a obtenção dos genes codificadores da PR e TR, com 400 pb e 800 pb, respectivamente. Serão utilizados os iniciadores DP10 (TAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCG) e DP11 (CCATTCCCTGGCTTTAATTTTACTGGTA) para a região da PR e os iniciadores F1 (GTTGACTCAGATTGGTTGCAC) e F2 (GTATGTCATTGACAGTCCAGC) para a região da TR. Sequenciamento: Os produtos de PCR serão submetidos à reação de sequenciamento conforme descrita anteriormente, utilizando-se os iniciadores DP10 e DP11 para o gene da PR e, F1 e F2 para o gene da TR e dideoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o Kit ABI Prism® BigDye™ Terminator version 3.1 cycle sequencing ready reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA). Após precipitação do produto da reação, as amostras serão desnaturadas e sequenciadas utilizando o sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Análise das sequências: A análise da qualidade das sequências obtidas, bem como sua edição, serão realizados no programa SeqMan LaserGene DNASTar v7.0 (SWINDELL & PLASTERER, 1997). Os subtipos serão inicialmente determinados utilizando o Rega HIV Subtyping Tool v. 2.0 (disponível em <http://www.bioafrica.net/subtypetool/html/subtypinghiv.html>) e então confirmados com base

**Endereço:** Av. Colombo, 5790, UEM-PPG

**Bairro:** Jardim Universitário

**CEP:** 87.020-900

**UF:** PR **Município:** MARINGÁ

**Telefone:** (44)3011-4444

**Fax:** (44)3011-4518

**E-mail:** copep@uem.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
MARINGÁ



Continuação do Parecer: 1.022.484

na árvore filogenética produzida no programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011). Para construção da árvore serão utilizadas sequências de referência obtidas do Los Alamos HIV Database ([www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov)). A análise filogenética será feita pelo algoritmo de neighbor-joining usando o modelo de substituição de nucleotídeos de Tamura-Nei, com 1000 replicatas. Os perfis de recombinação serão confirmados por análise bootscanning feita pelo RecombinantIdentificationProgram v. 3.0 - RIP 3.0.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresenta Folha de Rosto devidamente preenchida e assinada pelo responsável institucional. O cronograma de execução é compatível com a proposta enviada. Descreve gastos sob a responsabilidade do pesquisador. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido contempla as garantias mínimas preconizadas. Apresenta as autorizações necessárias. Sanadas as pendências apontadas.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá é de parecer favorável à aprovação do protocolo de pesquisa apresentado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Face ao exposto e considerando a normativa ética vigente, este Comitê se manifesta pela aprovação do protocolo de pesquisa em tela.

MARINGÁ, 14 de Abril de 2015

---

**Assinado por:**  
**Ricardo Cesar Gardiolo**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Colombo, 5790, UEM-PPG  
**Bairro:** Jardim Universitário **CEP:** 87.020-900  
**UF:** PR **Município:** MARINGÁ  
**Telefone:** (44)3011-4444 **Fax:** (44)3011-4518 **E-mail:** [copep@uem.br](mailto:copep@uem.br)

## APÊNDICE

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa intitulada “CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA EM INDIVÍDUOS PORTADORES E NÃO PORTADORES DO HIV”, que faz parte do curso de Mestrado em Ciências da Saúde e é orientada pelo Prof. Dennis Armando Bertolini, da Universidade Estadual de Maringá. **O objetivo desse estudo é caracterizar a resposta imune inata em indivíduos portadores do HIV-1 atendidos no Serviço de Atendimento Especializado em DST/AIDS da Secretaria de Saúde do Município de Maringá e em indivíduos não portadores do vírus.** Para isto a sua participação é muito importante, e ela se daria da seguinte forma: será realizada a coleta de um volume de sangue suficiente para a realização do estudo. Desta forma, informamos que os desconfortos e riscos a que o participante será exposto serão decorrentes quando da coleta de sangue para a realização da pesquisa, de modo que os mesmos serão controlados e minimizados ao máximo, tendo em vista que serão adotadas todas as providências e cautelas para evitar e reduzir efeitos e condições adversas, como: material asséptico e descartável; locais para coleta também assépticos; utilização de equipamentos de proteção individual e coletiva durante a coleta das amostras de sangue. Esse procedimento já é realizado de forma padronizada nos locais de coleta, independentemente de ser uma pesquisa ou não. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa, e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. As amostras biológicas restantes serão armazenadas no laboratório e, para utilização futura, um novo termo de consentimento será solicitado ao participante após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Os resultados esperados são o de caracterizar alterações na estrutura de células fundamentais para a resposta contra a infecção pelo HIV. Caso você tenha alguma dúvida ou necessite maiores esclarecimentos, pode nos contatar nos endereços abaixo ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da UEM, cujo endereço consta deste documento. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Eu,.....(nome por extenso do sujeito de pesquisa)  
 declaro que fui devidamente esclarecido e concordo em participar VOLUNTARIAMENTE da  
 pesquisa coordenada pelo Prof. Dennis Armando Bertolini.

\_\_\_\_\_ Data:.....  
 Assinatura ou impressão datiloscópica

Eu,.....(nome do pesquisador ou do membro da  
 equipe que aplicou o TCLE), declaro que forneci todas as informações referentes ao projeto  
 de pesquisa supra-nominado.

\_\_\_\_\_ Data:.....  
 Assinatura do pesquisador

Qualquer dúvida com relação à pesquisa poderá ser esclarecida com o pesquisador, conforme o endereço abaixo:

Nome: Dennis Armando Bertolini

Endereço: Av. Colombo, 5.790, Bloco T20 – Sala 302.

Telefone: (44) 3011-5394

e-mail: [dabertolini@uem.br](mailto:dabertolini@uem.br)

Qualquer dúvida com relação aos aspectos éticos da pesquisa poderá ser esclarecida com o Comitê Permanente de Ética em Pesquisa (COPEP) envolvendo Seres Humanos da UEM, no endereço abaixo:

COPEP/UEM

Universidade Estadual de Maringá.

Av. Colombo, 5790. Campus Sede da UEM.

Bloco da Biblioteca Central (BCE) da UEM.

CEP 87020-900. Maringá-PR. Tel: (44) 3261-4444

E-mail: [copep@uem.br](mailto:copep@uem.br)

Tabela suplementar 1. Frequência dos alelos HLA de classe I nos indivíduos dos grupos HIV, aids, sem aids e controle.

Alelos HLA de classe I	Grupos de indivíduos			
	HIV	aids	sem aids	controle
	N = 99 n (%)	N = 19 n (%)	N = 80 n (%)	N = 99 n (%)
A*01:01	19 (9,6)	8 (21,0)	11 (6,9)	16 (8,1)
A*01:02	1 (0,5)	1 (2,6)	0	1 (0,5)
A*02:01	47 (23,7)	7 (18,4)	40 (25)	45 (22,7)
A*02:02	4 (2)	0	4 (2,5)	1 (0,5)
A*02:05	3 (1,5)	0	3 (1,9)	3 (1,5)
A*02:11	1 (0,5)	0	1 (0,6)	1 (0,5)
A*02:22	1 (0,5)	0	1 (0,6)	0
A*02:33	1 (0,5)	1 (2,6)	0	0
A*03:01	14 (7,1)	1 (2,6)	13 (8,1)	22 (11,1)
A*03:02	2 (1,0)	0	2 (1,2)	0
A*11:01	10 (5,0)	3 (7,9)	7 (4,4)	11 (5,5)
A*23:01	3 (1,5)	2 (5,3)	1 (0,6)	11 (5,5)
A*24:02	13 (6,6)	1 (2,6)	12 (7,5)	24 (12,1)
A*24:03	1 (0,5)	0	1 (0,6)	1 (0,5)
A*25:01	1 (0,5)	0	1 (0,6)	3 (1,5)
A*26:01	8 (4,0)	1 (2,6)	7 (4,4)	6 (3,0)
A*29:02	5 (2,5)	2 (5,3)	3 (1,9)	8 (4,0)
A*30:01	11 (5,5)	2 (5,3)	9 (5,6)	8 (4,0)
A*30:02	6 (3,0)	2 (5,3)	4 (2,5)	1 (0,5)
A*30:04	1 (0,5)	0	1 (0,6)	1 (0,5)
A*31:01	11 (5,5)	2 (5,3)	9 (5,6)	9 (4,5)
A*32:01	10 (5,0)	0	10 (6,2)	8 (4,0)
A*33:01	2 (1,0)	2 (5,3)	0	0
A*33:03	3 (1,5)	0	3 (1,9)	0
A*33:50	0	0	0	3 (1,5)
A*34:01	0	0	0	1 (0,5)
A*34:02	1 (0,5)	0	1 (0,6)	1 (0,5)
A*36:01	1 (0,5)	0	1 (0,6)	0
A*66:20	0	0	0	1 (0,5)
A*68:01	11 (5,5)	3 (7,9)	8 (5,0)	8 (4,0)
A*68:02	6 (3,0)	0	6 (3,8)	0
A*69:01	1 (0,5)	0	1 (0,6)	3 (1,5)
A*74:01	0	0	0	1 (0,5)
B*07:02	8 (4,0)	0	8 (5,0)	8 (4,0)
B* 07:05	1 (0,5)	0	1 (0,6)	2 (1,0)
B* 07:14	1 (0,5)	0	1 (0,6)	0
B* 07:50	1 (0,5)	0	1 (0,6)	0



B* 08:01	9 (4,5)	4 (10,5)	5 (3,1)	10 (5,0)
B* 13:02	4 (2,0)	1 (2,63)	3 (1,9)	3 (1,5)
B* 14:01	0	0	0	3 (1,5)
B* 14:02	6 (3,0)	3 (7,9)	3 (1,9)	9 (4,5)
B* 14:03	0	0	0	1 (0,5)
B* 15:01	6 (3,0)	2 (5,3)	4 (2,5)	9 (4,5)
B* 15:03	1 (0,5)	0	1 (0,6)	1 (0,5)
B* 15:04	2 (1,0)	0	2 (1,2)	3 (1,5)
B* 15:08	0	0	0	1 (0,5)
B* 15:10	2 (1,0)	0	2 (1,2)	1 (0,5)
B* 15:15	0	0	0	1 (0,5)
B* 15:16	1 (0,5)	0	1 (0,6)	0
B* 15:17	2 (1,0)	0	2 (1,2)	1 (0,5)
B* 15:18	2 (1,0)	1 (2,63)	1 (0,6)	1 (0,5)
B* 15:20	1 (0,5)	0	1 (0,6)	1 (0,5)
B* 18:01	11 (5,5)	2 (5,3)	9 (5,6)	9 (4,5)
B* 18:50	1 (0,5)	0	1 (0,6)	0
B* 27:05	3 (1,5)	1 (2,63)	2 (1,2)	6 (3,9)
B* 35:01	12 (6,1)	1 (2,63)	11 (6,9)	12 (6,1)
B* 35:02	7 (3,5)	0	7 (4,4)	8 (4,0)
B* 35:03	3 (1,5)	2 (5,3)	1 (0,6)	5 (2,5)
B* 35:04	1 (0,5)	0	1 (0,6)	1 (0,5)
B* 35:05	2 (1,0)	1 (2,63)	1 (0,6)	1 (0,5)
B* 35:08	2 (1,0)	0	2 (1,2)	5 (2,5)
B*35:19	0	0	0	1 (0,5)
B* 37:01	4 (2,0)	0	4 (2,5)	4 (2,0)
B* 38:01	3 (1,5)	0	3 (1,9)	3 (1,5)
B* 39:01	1 (0,5)	0	1 (0,6)	3 (1,5)
B* 39:02	1 (0,5)	0	0	0
B* 39:03	0	0	0	1 (0,5)
B* 39:05	1 (0,5)	0	1 (0,6)	0
B* 39:06	0	0	0	2 (1,0)
B* 39:13	1 (0,5)	0	1 (0,6)	0
B* 40:01	2 (1,0)	0	2 (1,2)	2 (1,0)
B* 40:02	3 (1,5)	0	3 (1,9)	5 (2,5)
B* 40:04	1 (0,5)	1 (2,63)	0	1 (0,5)
B* 41:01	3 (1,5)	0	3 (1,9)	1 (0,5)
B* 41:02	1 (0,5)	0	1 (0,6)	0
B* 42:01	4 (2,0)	1 (2,63)	3 (1,9)	2 (1,0)
B* 42:02	1 (0,5)	1 (2,63)	1 (0,6)	0
B* 44:02	13 (6,6)	3 (7,9)	10 (6,2)	8 (4,0)
B* 44:03	12 (6,1)	3 (7,9)	9 (5,6)	13 (6,6)
B* 45:01	5 (2,5)	1 (2,63)	4 (2,5)	3 (1,5)
B* 49:01	5 (2,5)	1 (2,63)	4 (2,5)	7 (3,5)

B* 50:01	2 (1,0)	0	2 (1,2)	6 (3,0)
B* 50:02	0	0	0	1 (0,5)
B* 51:01	16 (9,6)	2 (5,3)	14 (8,7)	8 (4,0)
B* 51:07	0	0	0	2 (1,0)
B* 52:01	2 (1,0)	0	2 (1,2)	3 (1,5)
B* 53:01	6 (3,0)	2 (5,3)	4 (2,5)	2 (1,0)
B* 55:01	4 (2,0)	1 (2,63)	3 (1,9)	3 (1,5)
B* 57:01	7 (3,5)	2 (5,3)	5 (3,1)	7 (3,5)
B* 57:03	3 (1,5)	0	3 (1,9)	2 (1,0)
B* 58:01	5	2 (5,3)	3 (1,9)	2 (1,0)
B*58:02	0	0	0	1 (0,5)
B*78:01	1 (0,5)	0	1 (0,6)	0
B*78:02	1 (0,5)	1 (2,63)	0	0
B*81:01	1 (0,5)	0	1 (0,6)	3 (1,5)
C*01:02	4 (2,0)	1 (2,63)	3 (1,9)	5 (2,5)
C*01:50	4 (2,0)	1 (2,63)	3 (1,9)	3 (1,5)
C*02:02	1 (0,5)	0	1 (0,6)	2 (1,0)
C*02:50	7 (3,5)	0	7 (4,4)	6 (3,0)
C*03:02	1 (0,5)	1 (2,63)	0	2 (1,0)
C*03:03	8 (4,0)	2 (5,3)	6 (3,7)	8 (4,0)
C*03:04	9 (4,5)	1 (2,63)	8 (5,0)	9 (4,5)
C*04:01	28 (14,1)	5 (13,1)	23 (14,4)	38 (19,2)
C*04:50	7 (3,5)	2 (5,3)	5 (3,1)	0
C*04:51	1 (0,5)	1 (2,63)	0	0
C*05:01	18 (9,1)	5 (13,1)	13 (8,1)	10 (5,0)
C*06:02	21 (10,6)	4 (10,5)	17 (10,6)	19 (9,6)
C*06:03	0	0	0	1 (0,5)
C*07:01	27 (13,6)	6 (15,8)	21 (13,1)	28 (14,1)
C*07:02	14 (7,1)	0	14 (8,7)	13 (6,6)
C*07:04	3 (1,5)	1 (2,63)	2 (1,2)	2 (1,0)
C*08:01	0	0	0	1 (0,5)
C*08:02	6 (3,0)	3 (7,9)	3 (1,9)	10 (5,0)
C*12:02	1 (0,5)	0	1 (0,6)	3 (1,5)
C*12:03	5 (2,5)	0	5 (3,1)	10 (5,0)
C*12:50	0	0	0	1 (0,5)
C*14:02	4 (2,0)	0	4 (2,5)	3 (1,5)
C*14:03	0	0	0	1 (0,5)
C*15:02	6 (3,0)	2 (5,3)	4 (2,5)	6 (3,0)
C*15:04	0	0	0	1 (0,5)
C*15:05	1 (0,5)	0	1 (0,6)	0
C*15:50	0	0	0	2 (1,0)
C*16:01	9 (4,5)	1 (2,63)	8 (5,0)	6 (3,0)
C*16:02	1 (0,5)	1 (2,63)	0	1 (0,5)
C*16:50	0	0	0	1 (0,5)

C*17:01	11 (5,5)	1 (2,63)	10 (6,2)	4 (2,0)
C*17:50	0	0	0	1 (0,5)
C*18:01	1 (0,5)	0	1 (0,6)	1 (0,5)

---

N = número de indivíduos; n: número de alelos; p: valor de p; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; I: indefinido.