

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

PÂMELA GUIMARÃES REIS ROSINI

Associação do gene MICA com a doença de Chagas em uma população do Sul
do Brasil

Maringá
2012

PÂMELA GUIMARÃES REIS ROSINI

Associação do gene MICA com a doença de Chagas em uma população do Sul
do Brasil

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

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof^aDr^a Jeane Eliete Laguila Visentainer

Co-Orientador: Prof^a Dr^a Márcia Machado de Oliveira
Dalalio

Maringá
2012

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

R821a Rosini, Pâmela Guimarães Reis
Associação do gene MICA com a doença de chagas em
uma população do sul do Brasil / Pâmela Guimarães
Reis Rosini. -- Maringá, 2012.
51 f. : il. col., figs., tabs.

Orientador: Prof.a Dr.a Jeane Eliete Laguila
Visentainer.

Coorientadora: Prof.a Dr.a Márcia Machado de
Oliveira Dalalio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento
de Análises Clínicas e Biomedicina, Programa de Pós-
Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, 2012.

1. Gene MICA. 2. Polimorfismo genético. 3. Doença
de Chagas. I. Visentainer, Jeane Eliete Laguila,
orient. II. Dalalio, Márcia Machado de Oliviera,
coorient. III. Universidade Estadual de Maringá.
Centro de Ciências da Saúde. Departamento de
Análises Clínicas e Biomedicina. Programa de Pós-
Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.
Título.

CDD 21.ed. 616.0796
616.9363

ECSL-00680

FOLHA DE APROVAÇÃO

PÂMELA GUIMARÃES REIS ROSINI

Associação do gene MICA com a doença de Chagas em uma população do Sul do Brasil

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

COMISSÃO JULGADORA

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

Prof^a Dr^a Luiza Tamie Tsuneto
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a Dr^a Silvana Marques de Araújo
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a Dr^a Maria da Graça Bicalho
Universidade Federal de Curitiba

Prof^a Dr Marcelo Távora Mira
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Aprovada em: 20 de Dezembro de 2012.

Local de defesa: Bloco 106, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, a minha avó Dinat e ao meu querido esposo Valter Henriqui, por todo amor, apoio e paciência que me tem ofertado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me amparar e fortalecer nos momentos mais difíceis pelos quais passei e por não me deixar desanimar, nem desistir de meus objetivos.

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais, Ivan e Francisca, por todo amor, apoio, ajuda, paciência e motivação, pois, sem eles eu não chegaria tão longe. E não poderia esquecer a minha querida avó Dinat, que não está mais entre nós, mas que sempre será referência em minha vida.

Agradeço ao meu esposo querido Valter Henriqui pelo carinho, confiança e, principalmente, pela imensa paciência que tem me dedicado todos esses anos.

Agradeço também à professora Doutora Jeane Eliete Laguila Visentainer, pela oportunidade e orientação. Obrigada pelos conhecimentos, paciência e confiança transmitidos a mim durante estes cinco anos de dedicação.

À minha co-orientadora, Doutora Márcia Machado de Oliveira Dalalio, por todo carinho e atenção dispensada.

A todos os membros do laboratório de Imunogenética, professores, funcionários, amigos, meus sinceros agradecimentos.

Às minhas fiéis escudeiras, Tarsila e Priscila, por estarem sempre ao meu lado, independente da situação.

Sou ternamente grata a todos aqueles que estiveram direta e indiretamente ligados a esta minha jornada. Para com esses, tenho um carinho muito especial.

Obrigada.

Associação do gene MICA com a doença de Chagas em uma população do Sul do Brasil

RESUMO

A doença de Chagas é uma antropozoonose frequente nas Américas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e descrita como a mais grave doença parasitária na América Latina, com impacto socioeconômico consideravelmente maior do que os efeitos combinados de todas as outras infecções parasitárias. Este estudo investigou a associação do gene MICA (do inglês, *major histocompatibility complex class I chain-related genes A*) na susceptibilidade e/ou resistência à doença de Chagas numa população da região sul do Brasil. Cento e setenta e um (171) pacientes chagásicos crônicos e 159 controles saudáveis participaram deste estudo. A genotipagem dos alelos MICA e HLA-B foi realizada a partir do DNA genômico por PCR-SSOP (*polymerase chain reaction - sequence-specific oligonucleotide probing*). As frequências alélicas, haplotípicas e as comparações estatísticas entre os grupos foram calculadas e os resultados foram significativos para o alelo *MICA*007*, que estava mais frequente no grupo controle do que em pacientes (0,3 vs. 2,8%, $P = 0,015$; OR = 0,10; IC 95% = 0,002-0,74; $P_c = 0,18$). Em pacientes com cardiopatia (N=44), *MICA*008* estava mais frequente em relação aos pacientes sem cardiopatia (N=85) (35,2 vs. 21,8%; $P = 0,029$; OR = 1,95; IC 95% = 1,10-3,46; $P_c = 0,522$) e ao controle (35,2 vs. 23,0%; $P = 0,028$; OR = 1,82; IC 95% = 1,09-3,03; $P_c = 0,504$). O haplótipo *MICA*008_HLA-B*08* apresentou uma frequência mais elevada em pacientes em relação ao controle (7,0 vs. 1,6%; $P = 0,028$; OR = 4,69; IC 95% = 1,14-30,25; $\Delta' = 0,6517$, $P = 0,07$). Em conclusão, nossos dados sugerem que *MICA*007* está ligado à proteção contra a doença de Chagas, enquanto que o haplótipo *MICA*008_HLA-B*08* está associado à susceptibilidade e, que *MICA*008* tem influência no desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica. Desta forma, este estudo pode servir para a compreensão dos mecanismos imunopatológicos que estão associados ao gene MICA e ao desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica.

Palavras-chave: Gene MICA. Polimorfismo genético. Doença de Chagas.

Association of MICA gene with Chagas' disease in a population from Southern Brazil

ABSTRACT

Chagas disease is a frequent anthroponosis of the Americas, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and described as the most serious parasitic disease in Latin America, with socioeconomic impact considerably larger than the combined effects of all other parasitic infections. This study investigated the association of the gene related to the major histocompatibility complex class I (MICA) in susceptibility and/or resistance to Chagas' disease in a population in Southern Brazil. 171 patients with chronic Chagas' disease and 159 healthy controls participated in this study. The genotyping of MICA allele HLA-B was performed by polymerase chain reaction and sequence specific oligonucleotide probes (PCR-SSOP). Allele frequencies, haplotype and statistical comparisons between groups were calculated and the results were significant for allele *MICA*007* allele which was more frequent in the control group than in patients (0.3 vs. 2.8%; $P = 0.015$, OR = 0.10, 95% CI = 0.002-0.74), In patients with heart disease (N = 44), *MICA*008* was more frequent compared to patients without heart disease (N = 85) (35.2 vs. 21.8%, $P = 0.029$, OR = 1.95, 95% = 1.10 to 3.46, $P_c = 0.522$) and control group (35.2 vs. 23.0%, $P = 0.028$, OR = 1.82, 95% CI = 1.09 to 3.03; $p_c = 0.504$). The haplotype *MICA*008_HLA-B*08* showed a higher frequency in patients than in control (7.0 vs. 1.6%, $P = 0.028$, OR = 4.69, 95% CI = 1.14-30.25; $\Delta' = 0.6517$, $P = 0.07$). In conclusion, our data suggest that *MICA*007* is linked to protection against Chagas disease, whereas the haplotype *MICA*008_HLA-B*08* is associated with susceptibility, and *MICA*008* has influence on the development of chronic heart Chagas' disease. Thus, this study may serve the purpose of understanding the immunopathological mechanisms that are associated with MICA gene and the development of chronic heart Chagas' disease.

Keywords: MICA gene. Genetic polymorphism. Chagas' disease.

Dissertação elaborada e formatada conforme as
normas das publicações científicas: *Immunobiology*

Disponível em:

<http://www.elsevier->

[data.de/journals/imbio_instructions_.pdf](http://www.elsevier-data.de/journals/imbio_instructions_.pdf)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	8
Introdução.....	8
Epidemiologia.....	8
Ciclo de Vida do <i>Trypanossoma cruzi</i>	10
Características e Manifestações Clínicas.....	11
Imunopatologia da Doença de Chagas.....	12
Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC).....	15
Justificativa.....	19
Objetivos.....	20
Referências Bibliográficas.....	21
CAPÍTULO II.....	25
Associação de alelos MICA e HLA-B com a doença de Chagas no sul do Brasil.....	25
Introdução.....	29
Materiais e Métodos.....	31
Resultados.....	33
Discussão.....	36
Conclusão.....	39
Referências.....	39
Tabela 1.....	49
Tabela 2.....	50
Tabela 3.....	51
CAPÍTULO III.....	52
Conclusões.....	52
Perspectivas Futuras.....	52

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é uma antropozoonose grave e frequente nas Américas, principalmente na América Latina. No entanto, nas últimas décadas, devido à mobilidade da população entre a América Latina e o resto do mundo, a doença tem sido cada vez mais detectada nos Estados Unidos, Canadá, muitos países europeus e alguns países ocidentais do Pacífico (WHO, 2012). A doença foi descrita pela primeira vez em 1909, pelo médico e cientista brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas (CHAGAS, 1909). É uma doença endêmica causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e transmitida ao homem por um inseto vetor hematófago pertencente à subfamília *Triatominae*, conhecido no Brasil como “barbeiro”, entre outros nomes, dependendo da área geográfica (MONCAYO, 2003).

EPIDEMIOLOGIA

Na década de 90, a doença de Chagas foi classificada pelo Banco Mundial como a mais grave doença parasitária na América Latina, com impacto socioeconômico consideravelmente maior do que os efeitos combinados de todas as outras infecções parasitárias (DIAS *et al.*, 2002). Neste mesmo período, o número de indivíduos infectados era de 16 – 18 milhões e 100 milhões de pessoas consideradas em risco de infecção, com uma incidência total estimada de 800.000 novos casos por ano. Atualmente, as estimativas de prevalência da infecção estão progressivamente diminuindo, com um valor atual de aproximadamente dez milhões de indivíduos infectados no mundo e cerca de 25 milhões em

potencial risco de se tornarem infectadas (DIAS *et al.*, 2002; MONCAYO, 2003; ORTIZ YANINE, 2006; PISSETTI *et al.*, 2009, WHO, 2012). Esse sucesso é devido às iniciativas regionais de interromper a transmissão vetorial através da eliminação do seu vetor principal, juntamente com a seleção melhorada de doadores de sangue para reduzir a probabilidade de transmissão transfusional com a melhor detecção e tratamento dos casos congênitos e também com a migração do homem de áreas endêmicas rurais para as cidades, onde a probabilidade de transmissão vetorial é muito baixa (DIAS *et al.*, 2002).

Graças a um programa coordenado pelos países do Cone Sul, a transmissão da Doença de Chagas por vetores e através de transfusões de sangue, foi interrompida no Uruguai no ano de 1997, no Chile, em 1999 e, em 8 de 12 estados endêmicos do Brasil, em 2000 (MONCAYO, 2003). Devido ao sucesso deste programa, a incidência de novas infecções por *T. cruzi* têm diminuído em mais de 70% em todo o continente. Um controle semelhante foi adotado nos países Andinos e da América Central, onde rápido progresso foi registrado para garantir a interrupção da transmissão da doença de Chagas em 2005, conforme solicitado por uma Resolução da Assembleia Mundial de Saúde aprovada em 1998. É importante ressaltar que a prevalência e a incidência da doença, bem como a mortalidade, estão em constante mudança, devido ao impacto dos programas de controle, a migração do homem e mudanças nas condições socioeconômicas da população (MONCAYO, 2003).

O impacto social da doença de Chagas pode ser facilmente demonstrado pelo desaparecimento dos casos agudos e da diminuição de novos casos entre as faixas etárias mais jovens, bem como a redução progressiva da mortalidade e da morbidade em áreas controladas. Em termos econômicos, a relação custo-benefício entre a intervenção (aplicação de inseticida, sorologia em bancos de sangue) e a redução da doença de Chagas (em termos de assistência médica, social e melhoria da produtividade) é altamente positiva. Em 2006, a Organização Pan Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) declarou o Brasil livre da transmissão vetorial pelo seu principal agente – o *Triatoma infestans*, entretanto, estima-se que, no momento, exista 2.500.000 indivíduos infectados pelo *T. cruzi* [NETO, 2009]. Podemos então afirmar que a doença não deixou de existir, pois, enquanto persistirem o agente causal, os transmissores vetoriais alternativos e os reservatórios animais domésticos e silvestres, em associação com as condições sócio epidemiológicas capazes de permitir a infecção humana, ela sempre estará latente (DIAS *et al.*, 2002; MONCAYO, 2003; JUNQUEIRA JR, 2006).

CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* apresenta um complexo ciclo de vida que envolve várias fases de desenvolvimento e que são encontradas em hospedeiros invertebrados e vertebrados, bem como na corrente sanguínea e dentro de células do hospedeiro vertebrado. Geralmente a infecção humana ocorre através da inoculação das formas infectantes do parasito através da mucosa ocular ou pele lesionada após a picada do inseto. Outros mecanismos menos frequentes, mas também importantes de infecção são a transfusão de sangue, transmissão congênita, transplantes de órgãos, via oral e acidentes de laboratório (SOUZA *et al.*, 2010).

Sob condições naturais, o ciclo de vida do *T. cruzi* alterna entre um hospedeiro invertebrado da família *Reduviidae* e, um hospedeiro vertebrado, que pode ser qualquer espécie de mamífero de diferentes ordens. A distribuição geográfica dos triatomíneos e dos hospedeiros vertebrados está associada às preferências dos insetos para fontes específicas de sangue e define qual será dos dois ciclos de transmissão do *T. cruzi*: um ciclo silvestre, envolvendo diferentes espécies de insetos e animais selvagens e um ciclo doméstico/peridoméstico em que os animais domésticos e os seres humanos servem como reservatórios (MACEDO *et al.*, 2004).

Após a picada do triatomíneo, as formas tripomastigotas eliminadas nas fezes e urina do inseto, durante ou logo após o repasto sanguíneo, penetram no local da picada e invadem as células no local da inoculação (por exemplo, fibroblastos, macrófagos e células epiteliais). Uma vez dentro do citoplasma, as formas tripomastigotas se transformam na forma replicativa amastigota, que então se multiplica por divisão binária simples e se transforma novamente em tripomastigotas antes da lise celular. Posteriormente, ocorre a liberação de centenas de tripomastigotas que invadem novas células e que através de repetidos ciclos se espalham pelo sangue e tecido (**Figura 1**). Os macrófagos têm um importante papel na resposta imune inicial e também na disseminação do parasito, pois essas células carregam os parasitos para outros órgãos e tecidos (NEVES *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2010).

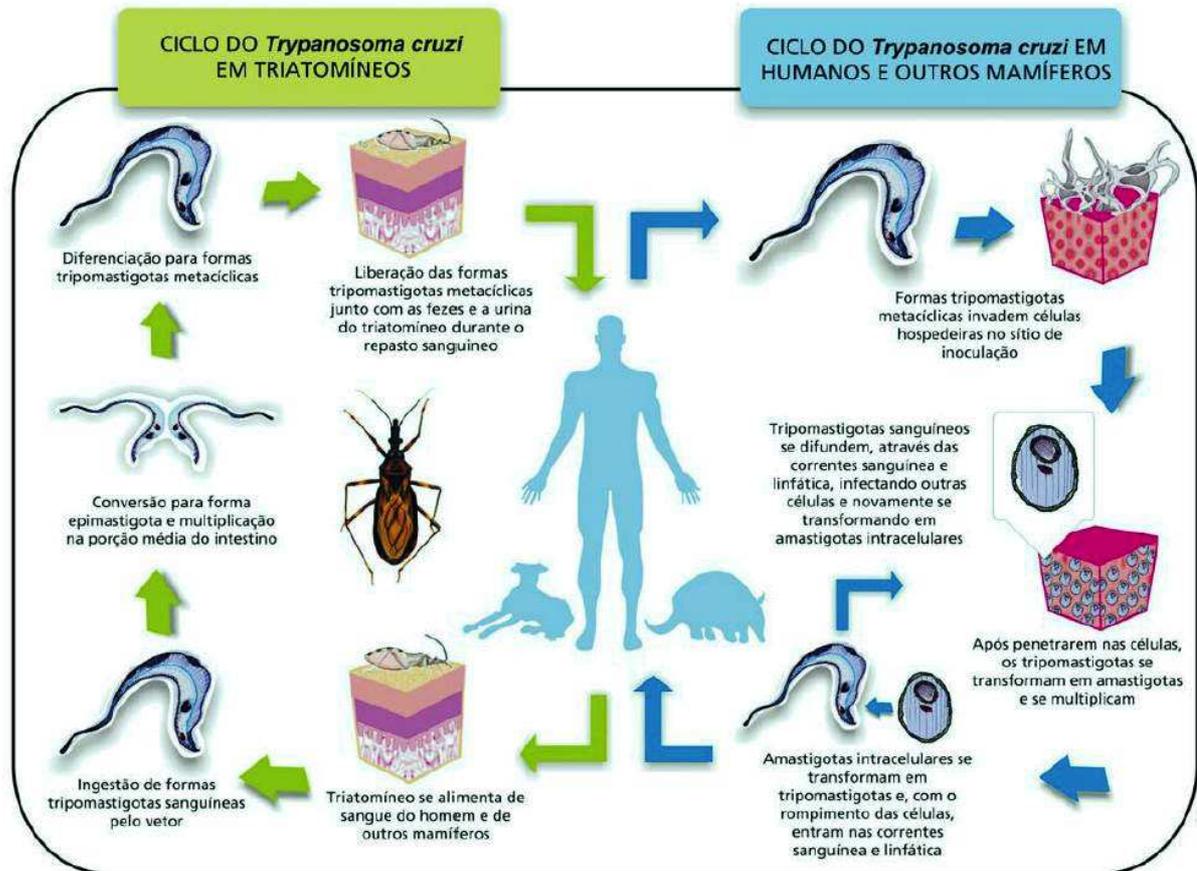


Figura 1. Ciclo de vida do *T. cruzi* mostrando as várias formas do protozoário em invertebrados (triatomíneos) e hospedeiros vertebrados (mamíferos).

Fonte: Instituto de Comunicação e Informação Científica (ICICT/Fiocruz)

<http://miriamsalles.info/wp/wp-content/uploads/ciclotrypanosomacruz.jpg>

CARACTERÍSTICAS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A doença humana tem uma apresentação clínica variável e é dividida nas fases aguda e crônica. A fase aguda aparece logo após a infecção e caracteriza-se por uma parasitemia mais elevada. Esta fase dura geralmente de 6 a 8 semanas, podendo ocorrer morte do hospedeiro, principalmente em crianças, mas, comumente transcorre sem sintomas aparentes. Em geral as manifestações clínicas quando ocorrem são representadas por febre, edema localizado e generalizado, poliadenia, hepatomegalia, esplenomegalia e, às vezes, insuficiência cardíaca e

perturbações neurológicas. No entanto, a maioria dos pacientes infectados recupera um estado de saúde aparente quando desenvolve uma resposta imune eficaz, diminuindo assim a parasitemia. A maioria dos pacientes entra numa fase crônica da infecção em que nenhum dano aos órgãos pode ser demonstrado pelos métodos padrão de diagnósticos clínicos atuais e a infecção só pode ser verificada por testes sorológicos ou parasitológicos. Essa fase crônica da doença é assintomática e chamada de forma indeterminada e, atualmente, a maioria dos pacientes encontra-se nesta fase (MONCAYO, 2003; NEVES *et al.*, 2003; MACEDO *et al.*, 2004).

Após vários anos do início da fase crônica assintomática, 20 a 35% dos indivíduos infectados desenvolvem manifestações clínicas decorrentes de alterações cardíacas e/ou digestivas, conhecidas como as formas clínicas cardíaca, digestiva e mista, isto devido ao fato de mudar inteiramente a fisionomia anatômica do miocárdio e do tubo digestório (esôfago e cólon, principalmente). Aproximadamente, 25% dos pacientes desenvolvem sintomas cardíacos que podem levar à insuficiência cardíaca crônica e morte súbita, 6% desenvolvem danos ao sistema digestório, principalmente, megaesôfago e megacólon e, 3% podem apresentar o comprometimento do sistema nervoso periférico. Na forma cardíaca, o principal fato clínico é a insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e, isto se deve à diminuição da massa muscular que se encontra muito destruída, entre outras alterações. A forma digestiva é caracterizada pela formação dos megas, onde aparecem alterações morfológicas e funcionais importantes, como por exemplo, a falta de coordenação motora (aperistalse, discinesia), caracterizando o megaesôfago e megacólon (MONCAYO, 2003; NEVES *et al.*, 2003; MACEDO *et al.*, 2004; BRENER, 1987).

No Brasil, a forma indeterminada é a mais comum (60-70%), seguida pelas formas cardíaca (20-30%) e digestiva (8-10%); a forma mista da doença é menos frequente. A doença de Chagas representa a primeira causa de lesões cardíacas em jovens e adultos economicamente produtivos, em países endêmicos da América Latina (MONCAYO, 2003; MACEDO, 2004).

IMUNOPATOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS

Os fatores que influenciam o variável curso clínico da doença ainda não foram elucidados, mas é provável que a variabilidade genética e uma combinação de fatores ambientais, nutricionais e imunológicos, possam estar relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro, podendo ser os responsáveis pela patogênese da fase crônica da doença (MACEDO *et al.*, 2004; PISSETTI *et al.*, 2009). Dentre os fatores relacionados ao hospedeiro, a resposta imunológica desperta um interesse especial.

A infecção com o *T. cruzi* pode ativar múltiplas vias do sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro. Durante as fases iniciais da doença, o contato com as formas tripomastigotas do *T. cruzi* favorecem a síntese de moléculas reguladoras e efetoras do sistema imune, tais como citocinas, quimiocinas e óxido nítrico. Durante a fase aguda da infecção, a presença do parasita induz um rápido aumento na produção, maturação e ativação de monócitos e macrófagos na tentativa de controlar a sua replicação. A interação do *T. cruzi* com macrófagos e outras células envolvidas na resposta imune inata é mediada por receptores específicos de reconhecimento de padrões do patógeno, como os receptores *Toll-like* (TLRs). Estes receptores são ativados por moléculas presentes na superfície do patógeno e induzem a síntese de várias citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e IL-12. A interação de citocinas, macrófagos e outras células do sistema imune inato são essenciais para a evolução da infecção e permite a eliminação do microrganismo numa fase precoce ou orienta o organismo para uma resposta imune adaptativa (REZENDE-OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A ativação da resposta imune inata durante o início da doença de Chagas, através do recrutamento de células NK (CD16⁺CD56⁻) e da ativação de monócitos, pode ser uma ponte importante entre eventos imunológicos inatos e adaptativos no início da infecção por *T. Cruzii* (SATHLER-AVELAR *et al.*, 2009). Durante a infecção experimental com *T. cruzi*, as células NK têm emergido como uma importante população de células associadas com a defesa contra a propagação da infecção parasitária. Modelos experimentais mostraram que antígenos derivados do *T. cruzi* são capazes de ativar as células NK antes do desenvolvimento da imunidade mediada por células T (BRENER; GAZZINELLI, 1997). O mecanismo clássico proposto para a fase aguda da infecção envolve a síntese de IL-12 por macrófagos, a qual induz a síntese de IFN- γ por células NK. Esta citocina, por sua vez, aumenta a síntese de IL-12 e TNF- α , bem como a produção de óxido nítrico por macrófagos e monócitos que contribuem para a eliminação do parasito (SATHLER-AVELAR *et al.*, 2009).

No entanto, a ativação descontrolada das células NK e de monócitos pró-inflamatórios pode também conduzir a danos no tecido, o que leva ao desenvolvimento da doença crônica grave. Desta forma, o estabelecimento de mecanismos imunorreguladores é de suma importância para controlar a atividade imunológica e prevenir os efeitos deletérios associados à estimulação excessiva do sistema imunitário. Neste contexto, as citocinas produzidas por estas células podem constituir um mecanismo regulador fundamental (SATHLER-AVELAR *et al.*, 2009). Apesar do fato da resposta imune adaptativa ser considerada há anos como o mecanismo protetor mais importante durante a infecção crônica da doença de Chagas, estudos recentes sugerem a importância da resposta imune inata como um mecanismo regulador relevante. Vitelli-Avelar *et al.* (2005) demonstraram que, apesar de se observar um aumento na frequência das células NK circulantes em todos os pacientes crônicos, o percentual de subpopulações de células NK CD3⁻CD16⁺CD56⁺ e CD3⁻CD16⁺CD56^{dim} é particularmente elevado em pacientes com a forma indeterminada da doença, sugerindo um possível papel protetor destas células no controle da morbidade durante a doença de Chagas crônica.

As citocinas produzidas por células NK e monócitos, são importantes biomarcadores da morbidade da doença. A análise do perfil de citocinas anti e pró-inflamatórias produzidas por células NK e monócitos circulantes têm sido relatada. Estudo realizado por Gomes *et al.* (2003), demonstrou que os monócitos de pacientes com a forma indeterminada produzem mais IL-10 do que os de pacientes portadores da forma cardíaca da doença, o que sugere que, estas células desempenham um papel determinante na regulação da resposta imunológica durante a doença de Chagas crônica. Por outro lado, Vitelli-Avelar *et al.* (2008) observaram que os pacientes com a forma cardíaca apresentavam maior capacidade de produção de TNF- α , sugerindo um papel imprescindível de monócitos pró-inflamatórios no desenvolvimento da forma cardíaca da doença de Chagas.

Os pacientes que desenvolvem a doença de Chagas exibem uma variedade de alterações imunológicas consistentes com uma resposta imune Th1 exacerbada. A infecção pelo *T. cruzi* induz a um desvio da resposta imunológica para um perfil pró-inflamatório com produção de citocinas tipo Th1 e supressão de citocinas anti-inflamatórias do tipo Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10 (GOMES *et al.*, 2003; CUNHA-NETO *et al.*, 2009). Em pacientes portadores da forma cardíaca, quando comparados aos pacientes com a forma indeterminada, o aumento da produção de IFN- γ sugere uma associação com a diminuição da produção de

IL-10, demonstrando que a IL-10 desempenha um papel significativo no controle da morbidade da doença de Chagas (CORRÊA-OLIVEIRA *et al.*, 1999; GOMES *et al.*, 2003).

Os mecanismos imunológicos relevantes tanto para resistência, como para patogênese da doença de Chagas são numerosos e envolvem vários tipos de células e mediadores do sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro, no entanto, tais mecanismos ainda não foram completamente compreendidos, especialmente em seres humanos.

COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC)

O sistema gênico HLA (*Human Leukocyte Antigen*) constitui um subconjunto de genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade ou MHC (do inglês, *major histocompatibility complex*) que está localizado no braço curto do cromossomo seis. O MHC é dividido em três regiões: classe I, II e III. Os genes de classe I codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade HLA-A, -B e -C, os genes de classe I não clássicos as moléculas HLA-E, -F e -G e os genes MIC (*MHC class I chain-related genes*) relacionados ao HLA, codificam as moléculas MICA e MICB; os de classe II as moléculas clássicas HLA-DR, -DQ e -DP. Os genes de classe III, embora estejam incluídos dentro do MHC, não codificam moléculas de histocompatibilidade, e sim outras moléculas, tais como, as proteínas C4 e C2 da via clássica e o fator B da via alternativa do complemento, os fatores de necrose tumoral (TNF- α e TNF- β), a proteína de choque térmico (Hsp 70) e as enzimas 21-hidroxilase (RAMMENSEE; BACHMANN; STEVANOVIĆ, 1997; HORTON *et al.*, 2004).

Os genes polimórficos de classe I e II codificam dois grupos de proteínas estruturalmente distintas, porém homólogas. As moléculas de classe I apresentam os peptídeos para as células T CD8⁺ que são por estas reconhecidas, estas moléculas são expressas na superfície de todas as células nucleadas e plaquetas; e, as moléculas de classe II, presentes principalmente na superfície de células especializadas na apresentação de antígenos, tais como as células dendríticas, os macrófagos e linfócitos B, apresentam os peptídeos para as células T CD4⁺ (RAMMENSEE; BACHMANN; STEVANOVIĆ, 1997). Estas moléculas

pelo éxon 5) e uma cauda citoplasmática carboxi-terminal (codificada pelo éxon 6) (BAHRAM *et al.*, 1994, GROH *et al.*, 1996).

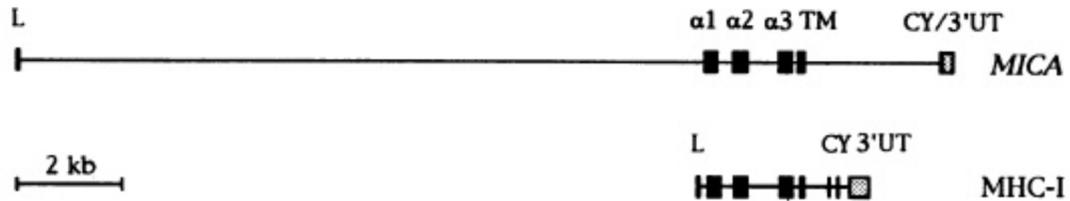


Figura 3. Organização éxon-íntron de MICA em comparação com a estrutura de genes MHC de classe I. As caixas sombreadas em preto indicam os éxons. L: sequência líder; α1-α3: domínio extracelular; TM: região transmembrana; CY: cadeia citoplasmática; 3'UT: sequência não traduzida na extremidade 3'.

Fonte: Bahram, S. *et al.* A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, p. 6259-6263, 1994.

A expressão de MICA é induzida em resposta ao estresse celular em muitos tipos de células, incluindo epitélio, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, e monócitos (BAHRAM *et al.*, 1994; STEPHENS, 2001; ZWIRNER *et al.*, 1998; ZWIRNER *et al.*, 1999). As moléculas MICA são reconhecidas pelos linfócitos T $\gamma\delta$, linfócitos T $\alpha\beta$ CD8⁺ e células NK, através de seus receptores NKG2D presentes em suas superfícies em associação com a molécula DAP10, uma proteína adaptadora de membrana (BAUER *et al.*, 1999; PARDOLL, 2001). Este complexo NKG2D-MICA (**Figura 4**) ativa a fosforilação dos resíduos de tirosina da molécula DAP10, desencadeando uma cascata de sinalização celular que termina com o processo de lise celular da célula-alvo (PARDOLL, 2001). Entretanto, um estudo realizado por Steinle *et al.* (2001) demonstrou que a alteração de um único aminoácido, uma metionina para uma valina, na posição 129 do domínio da cadeia pesada α 2, categoriza os alelos MICA em forte (MICA-129met) e fracos (MICA-129val) ligantes do receptor NKG2D, muito provavelmente afetando a ativação das células NK.

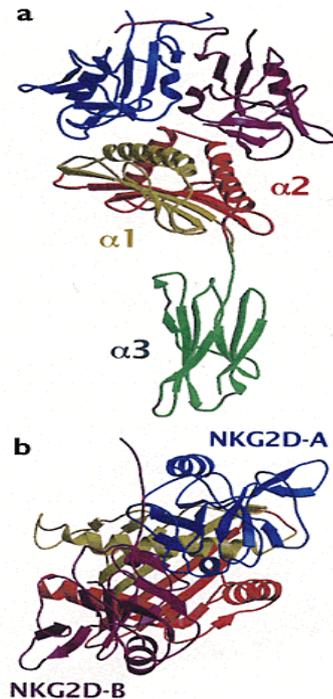


Figura 4. Estrutura do complexo NKG2D-MICA a) Diagrama em fitas do complexo MICA-NKG2D (vista lateral), b) Diagrama em fitas do complexo MICA-NKG2D (vista de cima).

FONTE: LI, P. *et al.* Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nature Immunology*, v. 2, n. 5, p. 443-451, 2001.

Recentemente, vários estudos de polimorfismos únicos de nucleotídeos (SNPs, do inglês, *single nucleotide polymorphisms*) foram realizados na busca de associações com doenças. Eles são considerados a mais abundante fonte de variação no genoma humano. A associação de SNPs com fenótipos de doenças humanas tem grande potencial para a aplicação clínica direta e, pode fornecer novos e mais precisos marcadores genéticos para fins de diagnóstico e prognóstico (SUH; VIJG, 2005). A maior parte da diversidade alélica de MICA provavelmente é devida a mutações de ponto seguidas por recombinação, uma vez que muitos desses alelos diferem um do outro por um único nucleotídeo.

O mais polimórfico gene de classe I não clássico, MICA, tem 84 alelos identificados até o momento e divulgados pelo banco de dados IMGT/HLA (*MICA*001-MICA*071*, <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>, acesso em 04/03/2013), sendo um número de 76 alelos referentes à tipagem dos éxons 2-4 do gene que codificam os três domínios extracelulares da molécula MICA. MICA possui também um polimorfismo microsatélite no éxon 5 que codifica a região transmembrana, conhecido como repetições curtas em *tandem* (STR). Este polimorfismo é constituído por trincas de nucleotídeos GCT, que resulta em uma

sequência de polialaninas de tamanhos variáveis, designadas como A4, A5, A5.1, A6, A9 [MIZUKI *et al.*, 1997], A7 [RUEDA *et al.*, 2002], A8 [GAMBELUNGHE *et al.*, 2006] e A10 [PEREZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2000].

O alelo A5.1 difere do A5 pela inserção de um nucleotídeo guanina após a segunda repetição GCT (GGCT), levando a uma mudança da matriz de leitura que causa um códon de término prematuro dentro do éxon, o qual codifica o domínio transmembrana resultando em uma forma solúvel da proteína (MIZUKI *et al.*, 1997).

Vários estudos de associação analisaram a diversidade MICA em algumas doenças, como artrite reumatóide (MOK *et al.*, 2003), espondilite anquilosante (AMROUN *et al.*, 2005), doença de Behçet (MIZUKI *et al.*, 1997), periodontite crônica (FOLWACZNY *et al.*, 2010), hanseníase (SACRAMENTO *et al.*, 2011), tuberculose (SOUZA *et al.*, 2012), esquistossomose (GONG *et al.*, 2012), câncer de mama (VALLIAN *et al.*, 2010), hepatite C e B (KARACHI *et al.*, 2004), entre outras. O polimorfismo do gene MICA pode estar envolvido na susceptibilidade a diversas doenças, porém, foi sugerido que esta associação pode ser secundária, devido ao forte desequilíbrio de ligação com alelos HLA-B.

A caracterização de genes de susceptibilidade e suas mutações tem implicações importantes, não só para uma melhor compreensão da patogênese da doença, mas também para o controle e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para doenças infecciosas (MARQUET; SCHURR, 2001).

JUSTIFICATIVA

Na doença de Chagas, são inúmeros os fatores que atuam direta ou indiretamente no aparecimento das lesões produzidas pelo *T. cruzi*. Alguns são devidos ao parasito, outros são inerentes ao hospedeiro, tais como a constituição genética e a resposta imunitária. Isso demonstra, a exemplo de outras doenças parasitárias, que também na doença de Chagas, os mecanismos pelos quais o *T. cruzi* determina as lesões devem ser multifatoriais e que deles depende o aparecimento ou não das formas anatomoclínicas da doença: forma indeterminada, cardíaca e digestiva, além da forma mista. Sabendo-se que, a variabilidade genética

juntamente com a resposta imunológica podem ser responsáveis pela patogênese da fase crônica da doença, é de especial interesse a investigação de genes de resposta imune, entre eles o polimorfismo do gene MICA nesses pacientes.

OBJETIVOS

GERAL

Investigar a associação do gene MICA na susceptibilidade e/ou resistência à doença de Chagas numa população da região sul do Brasil.

ESPECÍFICOS

Em uma população de indivíduos com a doença de Chagas e em uma população saudável da região sul do Brasil:

- Identificar os alelos do gene MICA;
- Determinar as frequências alélicas para o gene MICA;
- Comparar as frequências alélicas do gene MICA entre os grupos;
- Verificar o desequilíbrio de ligação entre os alelos MICA e os alelos HLA-B;
- Verificar a conformidade das proporções genotípicas, com respeito às expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMROUN, H.; DJOUDI, H.; BUSSON, M.; ALLAT, R.; SHERBINI, S. M.; SLOMA, I.; RAMASAWMY, R.; BRUN, M.; DULPHY, N. KRISHNAMOORTHY, R. TOUBERT, A.; CHARRON, D.; ABBADI, M. C.; TAMOUZA, R. Early-Onset Ankylosing spondylitis is associated with a functional MICA polymorphism. **Human Immunology**, New York, v. 66, p. 1057-1061, 2005.
- BAHRAM, S.; BRESNAHAN, M.; GERAGHTY, D. E.; SPIES, S. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 91, p. 6259-6263, 1994.
- BAUER, S.; GROH, V.; WU, J.; STEINLE, A.; PHILLIPS, J.H.; LANIER, L.L.; SPIES, T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. **Science**, v. 285, p. 727-729, 1999.
- BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas's disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Suppl. v. 82, p. 205-213, 1987.
- BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 114, n. 2, p. 103-110, 1997.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.1, p. 159-218, 1909.
- CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GOMES, J. A. S.; LEMOS, E. M.; CARDOSO, G. M.; REIS, D. D.; ADAD, S.; CREMA, E.; MARTINS-FILHO, O. A.; COSTA, M. O. R.; GAZZINELLI, G.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, Suppl. I, p. 253-255, 1999.
- CUNHA-NETO, E.; NOGUEIRA, L. G.; TEIXEIRA, P. C.; RAJENDRANATH RAMASAWMY, SANDRA A DRIGO, S. A.; GOLDBERG, A. C.; FONSECA, S. G.; BILATE, A. M.; KALIL, J. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, Suppl. I, p. 252-258, 2009.
- DIAS, J. C.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 603-612, 2002.
- FOLWACZNY, M.; HENNINGER, M.; J. GLAS, J. Impact of MICA-TM, MICB-C1_2_A and C1_4_1 microsatellite polymorphisms on the susceptibility to chronic periodontitis in Germany. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 77, p. 298-304, 2011.
- GAMBELUNGHE, G.; BROZZETTI, A.L.; GHADERI, M.; TORTOIOLI, C.; FALORNI, A. MICA A8: a new allele within MHC class I chain-related a transmembrane region with eight GCT repeats. **Human Immunology**, New York, v. 67, n. 12, p. 1005-1007, 2006.

GOMES, J. A.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; ROCHA, M. O.; MARTINS-FILHO, O. A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, p. 1185-1193, 2003.

GONG, Z.; LUO, Q.; LIN, L.; SU, Y.; PENG, H.; DU, K.; YU, P.; WANG, S. Association of MICA gene polymorphisms with liver fibrosis in schistosomiasis patients in the Dongting Lake region. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 45, n. 3, p. 222-229, 2012.

GROH, V.; BAHRAM, S.; BAUER, S.; HERMAN, A.; BEAUCHAMP, M. Cell stress regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. **Immunology**, Oxford, v. 93, p. 12445-12450, 1996.

HORTON, R.; WILMING, L.; RAND, V.; LOVERING, R. C.; BRUFORD, E. A.; KHODIYAR, V. K.; LUSH, M. J.; POVEY, S.; TALBOT, C. C. JR.; WRIGHT, M. W.; WAIN, H. M.; TROWSDALE, J.; ZIEGLER, A.; BECK, S. Gene map of the extended human MHC. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 5, p. 889-899, 2004.

The International Immunogenetics Information System (IMGT/HLA Database)
Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>, Acesso em: 04/03/2013.

JUNQUEIRA JUNIOR, L. F. Ecos da XXII reunião anual de pesquisa aplicada em doença de Chagas e X reunião anual de pesquisa aplicada em leishmanioses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, n. 6, p. 565-566, 2006.

KARACKI, P.S.; GAO, X.; THIO, C.L.; THOMAS, D.L.; GOEDERT, J.J.; VLAHOV, D.; KASLOW, R.A.; STRATHDEE, S.; HILGARTNER, M.W.; O'BRIEN, S.J.; CARRINGTON, M. MICA and recovery from hepatitis C virus and hepatitis B virus infections. **Genes and Immunity**, Basingstoke, v. 5, p. 261-266, 2004.

LEELAYUWAT, C.; TOWNEND, D. C.; DEGLI-ESPOSTI, M. A.; ABRAHAM, L. J.; DAWKINS, R. L. A new polymorphic and multi-copy MHC gene family related to nonmammalian class I. **Immunogenetics**, New York, v. 40, n. 5, p. 339-351, 1994.

LI, P.; MORRIS, D.L, WILLCOX, B.E.; STEINLE, A.; SPIES, T.; STRONG, R.K. Complex structure of activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. **Nature Immunology**, New York, v. 2, n. 5, 2001.

MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.99, p. 1-12, 2004.

MARQUET, S.; SCHURR, E. Genetics of susceptibility to infectious diseases: tuberculosis and leprosy as examples. **Biometrics**, Washington, v. 29, n. 4, p. 479-483, 2001.

MIZUKI, N.; OTA, M.; KIMURA, M.; OHNO, S.; ANDO, H.; KATSUYAMA, Y.; YAMAZAKI, M.; WATANABE, K.; GOTO, K.; NAKAMURA, S.; BAHRAM, S.; INOKO H. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the *MICA* gene: A strong

association of six GCT repetitions with Behçet disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 94, p. 1298-1303, 1997.

MOK, J.W.; LEE, Y. J.; KIM, J. Y.; LEE, E. B.; SONG, Y. W.; PARK, M. H.; PARK, K. S. Association of MICA polymorphism with rheumatoid arthritis patients in Koreans. **Human Immunology**, Washington, v. 64, p. 1190–1194, 2003.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, p. 577-591, 2003.

MONCAYO A, ORTIZ YANINE MI. An update Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 100, p. 663-677, 2006.

NETO VA. Centenário da doença de Chagas. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, p. 381-382, 2009.

NEVES, D. P.; MELO, A. L. de; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 10. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

PARDOLL, D. M. Stress, NK receptors, and immune surveillance. **Science**, v.294, p. 534-536, 2001.

PEREZ-RODRIGUEZ, M.; CORELL, A.; ARGUELLO, J.R.; COX, S.T.; MCWHINNIE, A.; MARSH, S.G.; MADRIGAL, J.A. A new MICA allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 55, n. 2, p. 162-165, 2000.

PISSETTI, C. W.; CORREIA, D.; BRAGA, T. T.; FARIA, G. E. L.; OLIVEIRA, R. F. DE; RIBEIRO, B. M.; RODRIGUES, D. B. R.; E RODRIGUES, V. Associação entre os níveis plasmáticos de TNF- α , IFN- γ , IL-10, óxido nítrico e os isotipos de IgG específicos nas formas clínicas da doença de Chagas crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 42, n.4, p. 425-430, 2009.

RAMMENSEE, H.G.; BACHMANN, J.; STEVANOVIĆ, S. *MHC ligands and peptide motifs*. Austin: Landes Bioscience, 1997.

REZENDE-OLIVEIRA, K.; SARMENTO, R. R.; RODRIGUES JUNIOR, V. Production of cytokine and chemokines by human mononuclear cells and whole blood cells after infection with *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 45, n. 1, p. 45-50, 2012.

RUEDA, B.; PASCUAL, M.; LOPEZ-NEVOT, M. A.; GONZALEZ, E.; MARTIN, J. A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GCT repeats. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 60, n. 6, p. 526-528, 2002.

SACRAMENTO, W. S.; MAZINI, P. S.; FRANCESCHI, D. A. S.; DE MELO, F. C.; BRAGA, M. A.; SELLL, A. M.; TSUNETO, L. T.; VISENTAINER, J. E. L. Frequencies of MICA alleles in patients from southern Brazil with multibacillary and paucibacillary leprosy. **International Journal of Immunogenetics**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 210-215, 2012.

SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104 (Suppl. I), p. 246-251, 2009.

SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2010: 295394. Published online 2010 July 29. doi: [10.1155/2010/295394](https://doi.org/10.1155/2010/295394).

SOUZA, C. F.; NOGUTI, E. N.; VISENTAINER, J. E. L.; CARDOSO, R. F.; PETZLER-ERLER, M.L.; TSUNETO, L. T. *HLA* and *MICA* genes in patients with tuberculosis in Brazil. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 79, n. 1, p.58-63, 2012.

STEINLE, A.; LI, P.; MORRIS, D.L.; GROH, V.; LANIER, L.L.; STRONG, R.K.; SPIES, T. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. **Immunogenetics**, New York, v. 53, n. 4, p. 279-287, 2001.

STEPHENS, H. A. F. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? **Trends in Immunology**, v. 22, n. 7, p. 378-385, 2001.

SUH, Y.; VIJG, J. SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 573, n. 1-2, p. 41-53, 2005.

VALLIAN, S.; RAD, M. J.; TAVALLAEI, M.; TAVASSOLI, M. Correlation of major histocompatibility complex class I related A (MICA) polymorphism with the risk of developing breast cancer. **Medical Oncology**, n. 29, n. 1, p. 5-9, march, 2012.

VITELLI-AVELAR, D. M.; SATHLER-AVELAR, R.; DIAS, J. C.; PASCOAL, V. P.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; LAGE, P. S.; ELÓI-SANTOS, S. M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes, **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v. 62, p. 297-308, 2005.

VITELLI-AVELAR, D. M.; SATHLER-AVELAR, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; PINTO DIAS, J. C.; GONTIJO, E. D.; FARIA, A. M.; ELÓI-SANTOS, S. M.; MARTINS-FILHO, O. A. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease, **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v. 68, p. 516-525, 2008.

ZWIRNER, N. W.; FERNÁNDEZ-VIÑA, M. A.; STASTNY, P. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells and monocytes. **Immunogenetics**, New York, v. 47, n. 2, p. 139-148, 1998.

ZWIRNER, N. W.; DOLE, K.; STASTNY, P. Differential Surface Expression of MICA by Endothelial Cells, Fibroblasts, Keratinocytes, and Monocytes. **Human Immunology**, New York, v. 60, n. 4, p. 323-330, 1999.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis) – factsheet (revised in August 2012). **Weekly epidemiological record**, v. 87, n. 51/52, p. 519-522, 2012.

CAPÍTULO II

Artigo: “ASSOCIAÇÃO DE ALELOS MICA E HLA-B COM A DOENÇA DE CHAGAS NO SUL DO BRASIL”

ASSOCIAÇÃO DE ALELOS MICA E HLA-B COM A DOENÇA DE CHAGAS NO SUL DO BRASIL

ASSOCIAÇÃO DE MICA E HLA-B COM A DOENÇA DE CHAGAS

Pâmela Guimarães Reis Rosini^a, Márcia Machado de Oliveira Dalalio^a, Christiane Maria Ayo^a, Camila de Freitas Oliveira^a, Ana Maria Sell^a, Jeane Eliete Laguila Visentainer^{a*}

^aLaboratório de Imunogenética, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil.

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

*Autor correspondente: Profa. Dra. Jeane Eliete Laguila Visentainer, Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Av. Colombo, 5790. Zona 07. Maringá, PR, CEP: 87020-900, Brasil. Tel.: (44) 3011-5392.

E-mail: jelvisentainer@gmail.com

RESUMO

A doença de Chagas é uma antropozoonose frequente nas Américas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e descrita como a mais grave doença parasitária na América Latina, com impacto socioeconômico consideravelmente maior do que os efeitos combinados de todas as outras infecções parasitárias. O objetivo deste estudo foi investigar a associação entre o polimorfismo do gene MICA (*major histocompatibility complex class I chain-related gene A*) e a susceptibilidade à doença de Chagas. Cento e setenta e um pacientes foram comparados a 159 controles, do sul do Brasil. A genotipagem dos alelos MICA e HLA-B foi realizada por PCR-SSOP (*polymerase chain reaction - sequence-specific oligonucleotide probing*). *MICA**007 foi mais frequente em controles do que em pacientes (0,3 vs. 2,8%, $P = 0,015$; OR = 0,10; IC 95% = 0,002-0,74; $P_c = 0,18$). Em pacientes com cardiopatia (N=44), *MICA**008 estava mais frequente em relação aos pacientes sem cardiopatia (N=85) (35,2 vs. 21,8%, $P = 0,029$, OR = 1,95, IC 95% = 1,10-3,46; $P_c = 0,522$) e ao controle (35,2 vs. 23,0%, $P = 0,028$; OR = 1,82; IC 95% = 1,09-3,03; $P_c = 0,504$). O haplótipo *MICA**008_ *HLA-B**08 apresentou uma frequência mais elevada em pacientes em relação ao controle (7,0 vs. 1,6%, $P = 0,028$, OR = 4,69, IC 95% = 1,14-30,25, $\Delta' = 0,6517$, $P = 0,07$). Em conclusão, *MICA**007 está ligado à proteção contra a doença de Chagas, enquanto *MICA**008_ *HLA-B**08 está associado à susceptibilidade e, *MICA**008 tem influência no desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica.

Palavras-chave: Alelos MICA, Alelos HLA-B, Cardiopatia chagásica crônica, Doença de Chagas, Polimorfismo genético.

Abreviaturas: HLA-B, human leucocyte antigen-B; HW, Hardy-Weinberg; intervalo de confiança de 95%, IC 95%. MICA, major histocompatibility complex class I chain-related

gene A; NK, natural killer; OR, odds ratio; Pc, P corrigido; PCR-SSOP, polymerase chain reaction - sequence-specific oligonucleotide probing.

1. Introdução

A doença de Chagas é uma antroponose frequente nas Américas, principalmente na América Latina. É uma doença endêmica causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e transmitida ao homem por um inseto vetor hematófago pertencente à subfamília *Triatominae* (Moncayo, 2003). O número de indivíduos infectados na década de 90 era de 16 – 18 milhões e 100 milhões de pessoas consideradas em risco de infecção. Atualmente, as estimativas de prevalência da infecção estão progressivamente diminuindo, com um valor atual de aproximadamente dez milhões de indivíduos infectados no mundo e cerca de 25 milhões em potencial risco de se tornarem infectadas (Dias *et al.*, 2002; Pissetti *et al.*, 2009; WHO, 2012). Em 2006, a Organização Pan Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) declarou o Brasil livre da transmissão vetorial pelo seu principal agente – o *Triatoma infestans* (Dias *et al.*, 2002; Moncayo, 2003; Junqueira Jr, 2006), entretanto, estima-se que, no momento, exista 2.500.000 indivíduos infectados pelo *T. cruzi* (Neto, 2009).

A doença humana tem uma apresentação clínica variável e é dividida nas fases aguda e crônica. Após vários anos (10 a 20 anos) do início da fase crônica assintomática, 20% a 30% dos indivíduos infectados desenvolvem miocardiopatia de gravidade variável; 8% a 10% apresentam a forma digestiva, caracterizada por dilatações do esôfago e/ou cólon (megaesôfago e megacólon, respectivamente) e os demais pacientes apresentam a forma mista ou cardiodigestiva (Brener, 1987; Dias *et al.*, 1956; Macedo *et al.*, 2004; Moncayo, 2003), sendo que, a forma crônica cardíaca é a mais grave. Esta forma da doença apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, que varia de poucos sintomas, geralmente relacionados a distúrbios do ritmo e da condução, a miocardiopatia dilatada. As principais causas de morte em pacientes com a forma clínica cardíaca são a insuficiência cardíaca, eventos tromboembólicos, arritmias graves e morte súbita (Prata, 2001; Rassi *et al.*, 2000).

Algumas moléculas reconhecidas por linfócitos T $\gamma\delta$, linfócitos T $\alpha\beta$ CD8+ e células NK (*natural killer*) são conhecidas como proteínas MICA (*major histocompatibility complex class I chain-related gene A*), as quais interagem com os receptores NKG2D em associação com a molécula DAP10 (Bauer *et al.*, 1999; Pardoll, 2001) e são induzidas em resposta ao estresse celular em muitos tipos de células, incluindo epitélio, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, e monócitos (Bahram *et al.*, 1994; Stephens, 2001; Zwirner *et al.*, 1998; Zwirner *et al.*, 1999). O gene MICA (*major histocompatibility complex class I chain-related gene A*) está localizado no braço curto do cromossomo 6, próximo aos locos HLA-B e HLA-C (Bahram *et al.*, 1994; Leelayuwat *et al.*, 1994) e consiste de 6 éxons que codificam uma glicoproteína de superfície celular, com três domínios extracelulares ($\alpha 1$ - $\alpha 3$) (codificados pelos éxons 2, 3 e 4, respectivamente), um segmento transmembrana (codificado pelo éxon 5) e uma cauda citoplasmática carboxi-terminal (codificada pelo éxon 6) (Bahram *et al.*, 1994, Groh *et al.*, 1996).

Até o momento, foram identificados 84 alelos MICA (European Bioinformatic Institute), sendo um número de 76 alelos referentes à tipagem dos éxons 2-4. MICA possui também um polimorfismo microssatélite, também conhecido como repetições curtas em *tandem* (STR), no éxon 5. Este polimorfismo é constituído por trincas de nucleotídeos GCT, que resulta em uma sequência de polialaninas de tamanhos variáveis, designados como A4, A5, A5.1, A6, A9 (Mizuki *et al.*, 1997), A7 (Rueda *et al.*, 2002), A8 (Gambelunghe *et al.*, 2006) e A10 (Perez-Rodriguez *et al.*, 2000).

O gene MICA foi identificado como candidato associado com a susceptibilidade ou a progressão de várias doenças, como artrite reumatóide (Mok *et al.*, 2003), doença de Behçet (Mizuki *et al.*, 1997), hanseníase (Sacramento *et al.*, 2011), tuberculose (Souza *et al.*, 2012), câncer de mama (Vallian *et al.*, 2010), hepatite C e B (Karachi *et al.*, 2004), esquistossomose

(Gong *et al.*, 2012), entre outras. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a existência de associação entre os alelos MICA e a doença de Chagas e sua influência no desenvolvimento da cardiopatia chagásica em pacientes do sul do Brasil.

2. Materiais e Métodos

2.1. Pacientes e controles

Este estudo caso-controle foi realizado com uma população do sul do Brasil (região de Londrina e Maringá, localizadas na região norte/noroeste do estado do Paraná, Sul do Brasil: entre as latitudes 23° 20' - 23° 25' S e longitudes 51° 08' - 51° 57' W).

Foram selecionados, 171 pacientes portadores da doença de Chagas crônica, atendidos pelo Laboratório de Chagas da Universidade Estadual de Maringá e pelo Hospital Universitário da cidade de Londrina. O diagnóstico laboratorial para a doença de Chagas foi realizado por meio da reação de ELISA (ensaio imunoenzimático) em soro ou plasma, usando o ensaio imunoenzimático “Chagas” da Abbott Laboratories, seguindo as instruções do fabricante e, em casos de fraco reagente, pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI) no Hemocentro Regional de Maringá em 2011 e 2012. O diagnóstico cardiológico foi realizado através do eletrocardiograma convencional, em repouso, baseado nas alterações características da cardiopatia chagásica, como Bloqueio de Ramo Direito, Bloqueio Divisional Ântero-Superior, Alterações Difusas da Repolarização Ventricular e Extra-sístolia Ventricular e Supra Ventricular. Dos 171 pacientes, foi possível obter o diagnóstico cardiológico de apenas 129, sendo que, aqueles que apresentaram alterações no eletrocardiograma, foram classificados como pacientes com cardiopatia (N=44) e, aqueles com eletrocardiograma normal, em pacientes sem cardiopatia (N=85).

O grupo controle foi composto por 159 indivíduos saudáveis e não relacionados, cônjuge dos pacientes ou doadores de sangue selecionados no Hemocentro Regional de Maringá, provenientes da mesma área geográfica dos pacientes e com diagnóstico negativo para a doença de Chagas. Os grupos foram pareados de acordo com a idade, gênero e grupo étnico, pelo método qui-quadrado com correção de Yates. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (012/2010-COPEP) e após esclarecimentos, todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

2.2. Extração do DNA

O método de extração utilizado foi o *salting-out* modificado por Cardozo *et al.* (2009). O DNA genômico foi extraído de 250 µL de *buffy-coat* obtido a partir de 5 mL de sangue periférico coletado com EDTA. Após a hidratação do DNA com água ultrapura, a concentração e a pureza do material foram determinadas no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

2.3. Genotipagem dos alelos MICA e HLA-B

MICA e HLA-B (*antigen leucocyte human-B*) foram genotipados pela técnica PCR-SSOP (*polymerase chain reaction - sequence-specific oligonucleotide probing*) (One Lambda[®], Canoga Park, CA), com leituras no citômetro de fluxo LabScan[™] 100, pela tecnologia Luminex e as análises das genotipagens foram realizadas com o auxílio do *software HLA Fusion*, versão 2.0.

2.4. Análise estatística

A partir dos resultados das genotipagens MICA e HLA-B foi possível, por meio do *software* Arlequin, versão 3.11, disponível em <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>, calcular as frequências alélicas, e, através do método da máxima verossimilhança, também incluído no *software* Arlequin, versão 3.11, calcular a frequência haplotípica. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado pela comparação das frequências esperadas dos genótipos com as frequências observadas, usando o método descrito por Guo e Thompson (Guo e Thompson *et al.*, 1992) e o *software* Arlequin, versão 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

As comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas com o *software* estatístico OpenEpi: *Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health*, versão 2.3.1 (<http://www.openepi.com/OE2.3/Menu/OpenEpiMenu.htm>), pelo método qui-quadrado com correção de Yates ou teste exato de Fisher. A determinação de *odds ratio* (OR) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) foram calculados de acordo com o método de Woolf, com o *software* estatístico OpenEpi, versão 2.3.1, para determinar o risco de desenvolver a doença ou forma clínica em indivíduos portadores de determinados polimorfismos MICA.

A correção de Bonferroni para múltiplos testes foi utilizada para um P corrigido (P_c), multiplicando o valor de P pelo número de alelos determinados. Os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O desequilíbrio de ligação (Δ) entre MICA e HLA-B foi calculado de acordo com o método de Imanishi (Imanishi *et al.*, 1992) e o nível de significância foi avaliado pelo teste exato de Fisher.

3. Resultados

3.1 Características gerais e clínico-patológicas dos pacientes e controles

As características gerais e clínico-patológicas dos participantes deste estudo estão apresentadas na Tabela 1. Em relação ao gênero, o grupo de pacientes foi formado por mais indivíduos do sexo feminino (56,7%) do que no grupo controle (42,8%) e diferenças estatísticas foram observadas ($P = 0,015$). A distribuição dos grupos étnicos entre casos e controles não apresentou diferenças estatísticas significativas e foi formado por brancos, mulatos e negros, mas devido à grande miscigenação existente no Brasil (Parra *et al.*, 2003; Pena *et al.*, 2000), foi agrupado em grupo étnico misto, levando em consideração a composição da população do estado do Paraná, de acordo com Probst *et al.* (2000).

3.2. Frequência dos alelos MICA em pacientes com Chagas e controles saudáveis

As frequências dos alelos MICA estão apresentadas na Tabela 2. A distribuição desses genótipos na população saudável (controle) estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW). Foram identificados 16 alelos na amostra de pacientes e 18 no grupo controle. Os alelos *MICA**008, *002, *004 e *009 foram os mais frequentes em ambos os grupos, somando 72,2% em pacientes e 69,3% no grupo controle. *MICA**030 e *MICA**044 estavam presentes somente no grupo controle, em um indivíduo de cada grupo (0,3%). O único com diferença significativa entre os grupos foi *MICA**007 ($P = 0,015$; OR = 0,10; IC 95% = 0,002-0,74; $P_c = 0,18$) que ocorreu numa frequência maior no grupo controle quando comparado aos pacientes (2,8 vs. 0,3%).

A análise de associação entre pacientes com cardiopatia e controles saudáveis está apresentada na Tabela 2. Uma diferença estatística significativa foi observada apenas para o alelo *MICA**008 ($P = 0,028$; OR = 1,82; IC 95% = 1,10-3,03; $P_c = 0,504$), que apresentou uma frequência mais elevada em pacientes com cardiopatia quando comparados ao grupo controle (35,2 vs. 23,0%). Entre as frequências dos alelos MICA em pacientes sem cardiopatia

e o grupo controle, nenhuma diferença estatística significativa foi observada (dados não mostrados).

A Tabela 2 mostra a associação do polimorfismo MICA e o desenvolvimento da cardiopatia em pacientes chagásicos. O alelo *MICA**008 estava mais frequente nos pacientes portadores de cardiopatia do que nos pacientes sem cardiopatia (35,2 vs. 21,8%, $P = 0,029$, OR = 1,95, IC 95% = 1,10-3,46; $P_c = 0,522$).

3.3. Frequência dos haplótipos MICA_HLA-B em pacientes com Chagas e controles saudáveis.

Foram observados, aproximadamente, 162 haplótipos possíveis para pacientes e controles. Na Tabela 3, estão representados os haplótipos com frequência acima de 3%. *MICA**002_ *HLA-B**35 foi o haplótipo mais frequente na amostra de pacientes e no grupo controle (7,6 e 8,4%, respectivamente). O haplótipo *MICA**008_ *HLA-B**08 apresentou uma frequência mais elevada nos pacientes do que em controles (7,0 vs. 1,6%) e uma diferença significativa ($P = 0,028$, OR = 4,69, IC 95% = 1,14-30,25) foi observada entre os grupos. Um valor alto de desequilíbrio de ligação relativo (Δ') pôde ser observado entre *MICA**008 e *HLA-B**08, tanto para pacientes ($\Delta' = 0,6517$), como para controles ($\Delta' = 0,7668$), sendo que, resultado semelhante foi observado para este mesmo haplótipo por Rees, Downing e Darke em 2005 ($\Delta' = 0,9532$).

A comparação dos haplótipos MICA_HLA-B entre pacientes com cardiopatia e sem cardiopatia não mostrou nenhuma diferença significativa (dados não mostrados).

4. Discussão

A identificação de MICA como um gene candidato à susceptibilidade ou à proteção a uma doença têm implicações importantes, não só para uma melhor compreensão da patogênese da doença, mas também para o controle e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para doenças infecciosas. Neste estudo caso-controle, foi analisada a associação dos alelos MICA com a susceptibilidade à doença de Chagas e sua influência no desenvolvimento da cardiopatia chagásica em uma amostra de pacientes portadores da doença crônica e controles saudáveis em uma população do sul do Brasil.

A distribuição dos alelos MICA nesta população, tanto em pacientes quanto em controles, foi semelhante àquela encontrada por Ribas *et al.* (2008), em uma população da região sul do estado do Paraná e por Marin *et al.* (2004) em uma população do estado de São Paulo, ambas no Brasil, com os alelos *MICA**008, *002, *004 e *009 sendo os mais comuns.

Os fatores que influenciam o curso clínico variável da doença ainda não foram elucidados, mas é provável que a variabilidade genética e uma combinação de fatores ambientais, nutricionais e imunológicos possam estar relacionadas tanto ao parasito quanto ao hospedeiro, podendo ser os responsáveis pela patogênese da fase crônica da doença (Macedo *et al.*, 2004; Pissetti *et al.*, 2009). Dentre os fatores relacionados ao hospedeiro, a resposta imunológica desperta um interesse especial. Neste sentido, vários estudos têm associado à doença de Chagas a genes de resposta imune, como genes de citocinas (Costa *et al.*, 2009; Pissetti *et al.*, 2011; Ramasawmy *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2010), do sistema HLA classe I e II (Cruz-Robles *et al.*, 2004; Dalalio *et al.*, 2002; ; García *et al.*, 2009; Layrisse *et al.*, 2000) e, mais recentemente, o gene MICA (Aida *et al.*, 2000; del Puerto *et al.*, 2012), envolvidos na susceptibilidade e/ou resistência ao desenvolvimento da doença e suas formas clínicas.

Até o momento, foram realizados poucos estudos envolvendo a doença de Chagas e os alelos MICA. Na população da Guatemala, um estudo conduzido por Aida *et al.* (2000), entre

pacientes com cardiopatia chagásica e controles, mostrou que a presença dos alelos *HLA-B*35* e *MICA-A5* tem efeito sinérgico na susceptibilidade à forma cardíaca da doença e que os pacientes portadores de ambos os alelos possuem um risco aumentado de desenvolver a cardiopatia. Um estudo recente com pacientes bolivianos, classificados de acordo com a forma clínica da doença, demonstrou que o haplótipo *HLA-DRB1*01-B*14-MICA*01* estava associado com a proteção contra a doença de Chagas crônica (del Puerto *et al.*, 2012).

Neste estudo, o alelo *MICA*007* ocorreu numa frequência mais elevada no grupo controle, mostrando uma associação negativa com a doença de Chagas, o que sugere um fator de proteção contra a infecção por *T. cruzi*. Na análise de associação do alelo *MICA*008*, entre pacientes no geral e controles, nenhuma diferença foi encontrada, no entanto, quando analisamos o haplótipo *MICA*008_HLA-B*08* observamos uma associação positiva com a doença de Chagas, com um risco de 4,69 vezes para o desenvolvimento da doença para os portadores deste haplótipo. O desequilíbrio de ligação relativo entre esses alelos ($\Delta' = 0,6517$, $P = 0,07$) apareceu com uma tendência, refletindo a proximidade física relativamente pequena entre os locos *MICA* e *HLA-B*. Segundo Stephens (2001), é comum que os alelos *MICA* estejam associados com muitos alelos *HLA-B* e, desta forma, exerçam efeito sinérgico quando combinados.

A associação entre *MICA* e a doença de Chagas só ficou evidente quando analisamos o grupo com cardiopatia, no qual, observamos uma frequência aumentada do alelo *MICA*008*, o que indica uma associação com o desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica. Esse alelo difere do alelo *MICA*027* por um único STR, localizado no éxon 5. Enquanto *MICA*008* carrega o microsatélite A5.1, caracterizado pela inserção de um nucleotídeo guanina após a segunda repetição GCT (GGCT), o que gera um códon de término no éxon que codifica o domínio transmembrana da proteína e resulta em uma forma solúvel

da proteína, o alelo *MICA*027* carrega o microssatélite A5 que gera uma cauda transmembranar normal (Fodil et al., 1999; Mizuki *et al.*, 1997). Sabendo disto, sugerimos que a susceptibilidade à forma cardíaca da doença esteja relacionada com a expressão da proteína mutada, A5.1, presente na variante *MICA*008*, o que dificultaria o seu reconhecimento pelo receptor NKG2D, levando a uma menor atividade das células NK e portanto, menor controle da forma indeterminada da doença.

Alguns estudos mostraram a associação do microssatélite *MICA* A5.1 com susceptibilidade a algumas doenças, como a hanseníase (Tosh *et al.*, 2006), doença celíaca (Lopez-Vasquez *et al.*, 2002), doença de Addison (Gambelunghe *et al.*, 1999), entre outras. Outro polimorfismo que pode influenciar a expressão de proteínas *MICA*, foi demonstrado por Steinle *et al.* (2001), no qual a alteração de um único aminoácido, uma metionina para uma valina, na posição 129 do domínio da cadeia pesada $\alpha 2$, categoriza os alelos *MICA* em forte (*MICA-129met*) e fracos (*MICA-129val*) ligantes do receptor NKG2D, muito provavelmente afetando a ativação das células NK.

Em estudos caso-controle como este uma das maiores limitações é o tamanho da amostra e a seleção do grupo controle, além disso, a estratificação da amostra de pacientes com a doença de Chagas para comparar com o grupo controle fez com que o número de indivíduos em cada grupo fosse ainda menor e pode ser o motivo da perda da significância estatística, após a realização da correção de Bonferroni. Sendo assim, recomendamos que novos estudos sejam realizados com maior tamanho amostral e em outras populações, para uma melhor compreensão da influência dos alelos *MICA* na doença de Chagas e suas formas clínicas.

5. Conclusão

Nossos dados sugerem que o alelo *MICA*007* está ligado à proteção contra a doença de Chagas, enquanto o haplótipo *MICA*008_HLA-B*08* está associado à susceptibilidade à doença. Além disso, o alelo *MICA*008* tem influência no desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica. Desta forma, este estudo pode servir ao objetivo de compreender os mecanismos imunopatológicos que estão associados ao gene *MICA* e o desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica.

Agradecimentos

Os autores agradecem a todos os voluntários que participaram deste estudo, ao Hemocentro Regional de Maringá, pela assistência na coleta das amostras, e à Fundação Araucária do estado do Paraná e ao Laboratório de Imunogenética da UEM, pelo apoio financeiro.

Referências

Aida, K., Juarez, S., Kikuchi, M., Gil, M., Ayau, O., de Lopes, P., Kaneko, S., Yanagi, T., Obispo, T., Velasquez, E., Jianbing, M., Matta, V., Paz, M., Kimura, A., Itoh, K., Tada, I., Hirayama, K., 2000. HLA-B35 and MICA-A5 synergistically enhanced the susceptibility to Chagas heart disease. *MHC* 7, 63-70.

Bahram, S., Bresnahan, M., Geraghty, D.E., Spies, S., 1994. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 6259-6263.

Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., Spies, T., 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727-729.

Brener, Z., 1987. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82, 205-213.

Cardozo, D.M., Guelsin, G.A., Clementino, S.L., Melo, F.C., Braga, M.A., Souza, C., Moliterno, R.A., Visentainer, J.E.L., 2009. Extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem de antígenos leucocitários humanos e de receptores semelhantes à imunoglobulina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42, 651-656.

Cruz-Robles, D., Reyes, P.A., Monteón-Padilla, V.M., et al., 2004. MHC class I and class II genes in Mexican patients with Chagas disease. *Hum. Immunol.* 65, 60-65.

Dalalio, M.M.O., Visentainer, J.E.L., Moliterno, R.A., Sell, A.M., Maria Luiza Petzel-Erler, M.L., 2002. Association of HLA-DR2 with chronic Chagasic cardiopathy in a population at Paraná Northeast region, Brazil. *Acta. Sci.* 24, 727-730.

del Puerto, F., Nishizawa, J.E., Kikuchi, M., Roca, Y., Avilas, C., Gianella, A., Lora, J., Velarde, F.U., Miura, S., Komiya, N., Maemura, K., Hirayama, K., 2012. Protective human leucocyte antigen haplotype, HLA-DRB1*01-B*14, against chronic Chagas disease in Bolivia. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 6(3):e1587.

Dias, E, Laranja, F.S., Miranda, A., Nobrega, G., 1956. Chagas' disease; A clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation* 14, 1035-1060.

Dias, J.C., Silveira, A.C., Schofield, C.J., 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 603-612.

European Bioinformatics Institute, Disponível em:
<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html> (Acesso em 04/03/13).

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin 3.11: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinformatics Online* 1, 47-50.

Fodil, N., Pellet, P., Laloux, L., Hauptmann, G., Theodorou, I., Bahram, S., 1999. MICA haplotypic diversity. *Immunogenetics* 49, 557.

Gambelunghe, G., Falorni, A., Ghaderi, M., Laureti, S., Tortoioli, C., Santeusano, F., Brunetti, P., Sanjeevi, C.B., 1999. Microsatellite polymorphism of the MHC class I chain-related (MIC-A and MIC-B) genes marks the risk for autoimmune Addison's disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 3701-3707.

Gambelunghe, G., Brozzetti, A.L., Ghaderi, M., Tortoioli, C., Falorni, A., 2006. MICA A8: a new allele within MHC class I chain-related a transmembrane region with eight GCT repeats. *Hum. Immunol.* 67, 1005-1007.

García Borrás, S., Racca, L., Cotorruelo, C., Biondi, C., Beloscar, J., Racca, A., 2009. Distribution of HLA-DRB1 alleles in Argentinean patients with Chagas' disease cardiomyopathy. *Immunol. Invest.* 38, 268-275.

Gong, Z., Luo, Q., Lin, L., Su, Y., Peng, H., Du, K., Yu, P., Wang, S., 2012. Association of MICA gene polymorphisms with liver fibrosis in schistosomiasis patients in the dongting lake region. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45, 222-229.

Guo, S.W., Thompson, E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361-372.

Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., 1996. Cell stress regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Immunology* 93, 12445-12450.

Imanishi, T., Akaza, T., Kimura, A., Tokunaga, K., Gojobori, T., 1992. Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In: Tsuji, K., Aizawa, M., Sasazuki, T., eds. *HLA 1991, Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference.* Science 1065–1127.

Junqueira Junior, L.F., 2006. Ecos da XXII reunião anual de pesquisa aplicada em doença de Chagas e X reunião anual de pesquisa aplicada em leishmanioses. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39, 565-566.

Karacki, P.S., Gao, X., Thio, C.L., Thomas, D.L., Goedert, J.J., Vlahov, D., Kaslow, R.A., Strathdee, S., Hilgartner, M.W., O'brien, S.J., Carrington, M., 2004. MICA and recovery from hepatitis C virus and hepatitis B virus infections. *Genes Immun.* 5, 261-266.

Lopez-Vazquez, A., Rodrigo, L., Fuentes, D., Riestra, S., Bousono, C., Garcia-Fernandez, S., Martinez-Borra, J., Gonzalez, S., Lopez-Larrea, C., 2002. MICA-A5.1 allele is associated with atypical forms of celiac disease in HLA-DQ2-negative patients. *Immunogenetics* 53, 989-991.

Macedo, A.M., Machado, C.R., Oliveira, R.P., Pena, S.D., 2004. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 1-12.

Layrisse, Z., Fernandez, M.T., Montagnani, S., Matos, M., Balbas, O., Herrera, F., Colorado, I.A., Cataliotti, F., Acquatella, H., 2000. HLA-C*03 Is a risk factor for cardiomyopathy in Chagas' disease. *Hum. Immunol.* 61, 925-929.

Leelayuwat, C., Townend, D.C., Degli-Esposti, M.A., Abraham, L.J., Dawkins, R.L., 1994. A new polymorphic and multi-copy MHC gene family related to nonmammalian class I. *Immunogenetics* 40,339-351.

Marin, M.L.C., Savioli, C.R., Yamamoto, J.H., Kalil, J., Goldberg, A.C., 2004. MICA polymorphism in a sample of the Sao Paulo population, Brazil. *Eur. J. Immunogen.* 31, 63-71.

Mizuki, N., Ota, M., Kimura, M., Ohno, S., Ando, H., Katsuyama, Y., Yamazaki, M., Watanabe, K., Goto, K., Nakamura, S., Bahram ,S., Inoko, H., 1997. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. *Proc. Nat. Aca. Sci.* 94, 1298-1303.

Mok, J.W., Lee,Y.J., Kim, J.Y., Lee, E.B., Song, Y.W., Park, M.H., Park, K.S., 2003. Association of MICA polymorphism with rheumatoid arthritis patients in Koreans. *Hum. Immunol.* 64, 1190-1194.

Moncayo, A., 2003. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 577-591.

Neto, V.A., 2009. Centenário da doença de Chagas. *Rev. Saúde Públ.* 43, 381-382.

Parra, F.C., Amado, R.C., Lambertucci, J.R., Rocha, J., Antunes, C.M., Pena, S.D., 2003. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc. Nat. Aca. Sci.* 100, 177-182.

Pardoll, D.M., 2001. Stress, NK receptors, and immune surveillance. *Science* 294, 534-536.

Pena, S.D.J., Carvalho-Silva, D.R., Alves-Silva, J., Prado, V.F., 2000. Retrato molecular do Brasil. *Ciência Hoje* 27, 16-25.

Perez-Rodriguez, M., Corell, A., Arguello, J.R., Cox, S.T., Mcwhinnie, A., Marsh, S.G., Madrigal, J.A., 2000. A new MICA allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite. *Tissue Antigens* 55, 162-165.

Probst, C.M., Bompeixe, E.P., Pereira, N.F., Dalalio, M.M., Visentainer, J.E.L., Tsuneto, L.T., Petzl-Erler, M.L., 2000. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto population from Paraná, Brazil. *Hum. Biol.* 72, 597-617.

Costa, G.C., Rocha, M.O., Moreira, P.R., et al., 2009. Functional IL-10 Gene Polymorphism Is Associated With Chagas Disease Cardiomyopathy. *J. Infect. Dis.* 199, 451-454.

Pissetti, C.W., Correia, D., Braga, T.T., Faria, G.E.L., Oliveira, R.F., Ribeiro, B.M., Rodrigues, D.B.R., Rodrigues, V., 2009. Associação entre os níveis plasmáticos de TNF- α , IFN- γ , IL-10, óxido nítrico e os isotipos de IgG específicos nas formas clínicas da doença de chagas crônica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42, 425-430.

Pissetti, C.W., Correia, D., de Oliveira, R.F., Llaguno, M.M., Balarin, M.A.S., Silva-Grecco, R.L., Rodrigues, Jr.V., 2011. Genetic and functional role of TNF-alpha in the development *Trypanosoma cruzi* infection. *Plos. Negl. Trop. Dis.* 5:e976.

Prata, A., 2001. Aspectos clínicos e epidemiológicos da doença de Chagas, *Lancet Infect. Dis.* 1, 92-100.

Ramasawmy, R., Fae, K.C., Cunha-Neto, E., Muller, N.G., Cavalcanti, V.L., Ferreira, R.C., Drigo, S.A., Ianni, B., Goldberg, A.C., Kalil, J., 2007. Polymorphisms in the lymphotoxin-alpha predispose to chronic Chagas cardiomyopathy. *J. Infect. Dis.* 196, 1836-1843.

Rassi, Jr. A., Rassi, A., Little, W.C., 2000. Chagas' heart disease. *Clin. Cardiol.* 23, 883-889.

Rees, M.T., Downing, J, Darke, C., 2005. A typing for the major histocompatibility complex class I chain related genes A and B using polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Genet. Test.* 9, 93-110.

Ribas, F., Oliveira, L.A., Petzl-Erler, M.L., Bicalho, M.G., 2008. Major histocompatibility complex class I chain-related gene A polymorphism and linkage disequilibrium with HLA-B alleles in Euro-Brazilians. *Tissue Antigens* 72, 532-538.

Rueda, B., Pascual, M., Lopez-Nevot, M.A., Gonzalez, E., Martin, J., 2002. A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GCT repeats. *Tissue antigens* 60, 526-28.

Sacramento, W.S., Mazini, P.S., Franceschi, D.A.S., Melo, F.C., Braga, M.A., Sell, A.M., Tsuneto, L.T., Visentainer, J.E.L., 2012. Frequencies of MICA alleles in patients from southern Brazil with multibacillary and paucibacillary leprosy. *Int. J. Immunogen.* 39, 210-215.

Steinle, A., LI, P., Morris, D.L., Groh, V., Lanier, L.L., Strong, R.K., Spies, T., 2001. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 53, 279-287.

Stephens, H.A.F., 2001. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol.* 22, 378-385.

Souza, C.F., Noguti, E.N., Visentainer, J.E.L., Cardoso, R.F., Petzl-Erler, M.L., Tsuneto, L.T., 2012. *HLA* and *MICA* genes in patients with tuberculosis in Brazil. *Tissue antigens* 79, 58-63.

Tosh, K., Ravikumar, M., Bell, J.T., Meisner, S., Hill, A.V., Pitchappan, R., 2006. Variation in MICA and MICB genes and enhanced susceptibility to paucibacillary leprosy in south India. *Hum. Mol. Gen.* 15, 2880-2887.

Torres, O.A., Calzada, J.E., Beraún, Y., Morillo, C.A., González, A., González, C.I., Martín, J., 2010. Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. *Infect. Genet. Evol.* 10, 682-685.

Vallian, S., Rad, M.J., Tavallaei, M., Tavassoli, M., 2012. Correlation of major histocompatibility complex class I related a (MICA) polymorphism with the risk of developing breast cancer. *Med. Oncol.* 29, 5-9.

Zwirner, N.W., Fernández-Viña, M.A., Stastny, P., 1998. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells and monocytes. *Immunogenetics* 47, 139-148.

Zwirner, N.W., Dole, K., Stastny, P., 1999. Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *Hum. Immunol.* 60, 323-330.

WHO 2012. Chagas disease (American trypanosomiasis) – factsheet (revised in August 2012). *Wkly. Epidemiol. Rec.* 87, 519-522.

Tabela 1

Características gerais e clinico-patológicas dos pacientes chagásicos e controles saudáveis do sul do Brasil

Características	Pacientes (N=171)	Controles (N=159)
Idades (anos)		
Média (\pm DP)	56 (29,7)	48,5 (5)
Gênero n (%)	N=171	N=159
Feminino ¹	97 (56,7)	68 (42,8)
Masculino	74 (43,3)	91 (57,2)
Grupo Étnico n (%)	N=162	N=157
Branco	115 (71,0)	113 (72,0)
Mulato	29 (17,9)	35 (22,3)
Negro	18 (11,1)	9 (5,7)
Cardiopatia n (%)	N=129	
Positivo	44 (34,1)	
Negativo	85 (65,9)	

DP: desvio padrão

¹P = 0.015

Tabela 2

Frequência dos alelos MICA em pacientes com Chagas, pacientes com cardiopatia chagásica, pacientes sem cardiopatia e grupo controle do sul do Brasil

	Chagas (N=171)	Cardiopatia (N=44)	Não cardiopatia (N=85)	Controles (N=159)
MICA	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
*001	7(2,0)	3(3,4)	2(1,2)	4(1,3)
*002	64(18,7)	15(17,0)	36(21,2)	56(17,6)
*004	45(13,1)	10(11,4)	27(15,9)	45(14,2)
*006	2(0,6)	1(1,1)	1(0,6)	2(0,6)
*007	1(0,3) ¹	0	0	9(2,8) ¹
*008	96(28,1)	31(35,2) ^{2,3}	37(21,8) ³	73(23,0) ²
*009	42(12,3)	9(10,2)	22(12,9)	46(14,5)
*010	11(3,2)	4(4,6)	4(2,3)	13(4,0)
*011	22(6,4)	4(4,6)	13(7,6)	13(4,0)
*012	4(1,2)	3(3,4)	1(0,6)	3(1,0)
*015	2(0,6)	0	2(1,2)	1(0,3)
*016	11(3,2)	2(2,3)	6(3,5)	18(5,7)
*017	2(0,6)	0	2(1,2)	6(1,9)
*018	13(3,8)	3(3,4)	6(3,5)	8(2,5)
*019	15(4,4)	3(3,4)	8(4,7)	14(4,4)
*027	5(1,5)	0	3(1,8)	5(1,6)
*030	0	0	0	1(0,3)
*044	0	0	0	1(0,3)

N, número de indivíduos; n, número de alelos

¹ Pacientes com Chagas vs. controles, $P = 0,01$; OR = 0,10; IC (95%) = 0,002-0,74; $P_c = 0,18$.

² Pacientes com cardiopatia vs. controles, $P = 0,028$; OR = 1,82; IC (95%) = 1,09-3,03; $P_c = 0,504$.

³ Pacientes com cardiopatia vs. pacientes sem cardiopatia, $P = 0,029$; OR = 1,95; IC (95%) = 1,10-3,46; $P_c = 0,522$.

Tabela 3

Frequências haplotípicas dos genes MICA e HLA-B em pacientes com Chagas e controles saudáveis do sul do Brasil

Haplótipos		Pacientes (N=171)		Controles (N=159)		P	OR	IC (95%)
MICA	HLA-B	n	%	n	%			
*002	*35	13	7,6	13	8,4	ns		
*002	*39	6	3,8	5	3,4	ns		
*004	*44	11	6,6	12	7,5	ns		
*004	*49	4	2,6	5	3,1	ns		
*008	*07	10	6,1	10	6,5	ns		
*008	*08	12	7,0 ¹	2	1,6	0,028	4,69	1,14-30,25
*008	*15	6	3,7	7	4,7	ns		
*008	*44	7	3,9	7	4,4	ns		
*009	*51	11	6,7	13	8,5	ns		
*010	*15	5	3,2	5	3,5	ns		
*011	*14	10	6,1	6	4,1	ns		
*016	*35	4	2,6	8	5,3	ns		
*019	*15	4	2,3	5	3,4	ns		

OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; ns, não significativo ($P \geq 0,05$)

¹MICA*008_HLA-B*08, $\Delta' = 0,6517$; $P = 0,07$.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Neste estudo, as análises das frequências do gene MICA, em indivíduos com a doença de Chagas e numa população saudável da região sul do Brasil permitiram as seguintes conclusões:

- 16 alelos MICA estão na amostra de pacientes e 18 no grupo controle, sendo os mais frequentes em ambos os grupos *MICA**008, *002, *004 e *009.
- Enquanto o alelo *MICA**007 está associado com a proteção à doença de Chagas, o haplótipo *MICA**008_ *HLA-B**08 está associado com a susceptibilidade.
- Existe uma associação positiva do alelo *MICA**008 (A5.1) com a cardiopatia chagásica crônica em relação aos controles e aos pacientes sem cardiopatia.
- Este estudo sugere que a proteína codificada por *MICA**008, com um defeito na cauda transmembranar, pode predispor à forma mais grave da doença, a cardiopatia chagásica crônica.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Poucos estudos analisaram a influência do gene MICA na ocorrência da doença de Chagas e sua influência no desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica e até onde sabemos nenhum deles realizado no Brasil, posto isto, a coleta de mais amostras de pacientes e controles será realizada com o intuito de definir com mais clareza o papel dos alelos MICA na imunopatogênese da doença de Chagas em nossa população.

Além disso, para assegurar a definição de alelos que não puderam ser definidos pela genotipagem por PCR-SSOP, o sequenciamento de alelos MICA é uma perspectiva futura com a implantação no laboratório.