



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**POLIMORFISMOS DO COMPLEXO DE GENES KIR PREDISPÕEM À
HANSENÍASE E MODULAM SEU DESENVOLVIMENTO PARA A FORMA
PAUCIBACILAR**

MILENA MAGALHÃES

Belém-Pará
2008

MILENA MAGALHÃES

**POLIMORFISMOS DO COMPLEXO DE GENES KIR PREDISPÕEM À
HANSENÍASE E MODULAM SEU DESENVOLVIMENTO PARA A FORMA
PAUCIBACILAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biológica de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biológica de Agentes Infecciosos e Parasitários.
Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos

Belém-Pará
2008

Magalhães, Milena

Polimorfismos do Complexo de Genes KIR predispõem à hanseníase e modulam seu desenvolvimento para a forma paucibacilar, Belém-Pará, 2008, 50p, Dissertação de Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

1. KIR 2. polimorfismo de DNA 3. célula *natural killer*

MILENA MAGALHÃES

**POLIMORFISMOS DO COMPLEXO DE GENES KIR PREDISPÕEM À
HANSENÍASE E MODULAM SEU DESENVOLVIMENTO PARA A FORMA
PAUCIBACILAR**

Dissertação (ou Tese) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre (ou Doutor) em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos
Departamento de Patologia, UFPA

Banca Examinadora: Prof. Dr. Cláudio Guedes Salgado
Departamento de Patologia, UFPA

Prof. Dr. José Alexandre Rodrigues Lemos
Departamento de Genética, UFPA

Prof.Dr. Leonardo dos Santos Sena

Às minhas mães, Olga e Analúcia.

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro, sempre.

E como me ensinaram que é “Deus no Céu, orientador na Terra”, ao Prof. Eduardo, vulgo Dudu, meu pai científico, por toda a estatística (que eu espero nunca mais esquecer), por exigir de mim quando sabia que eu podia fazer melhor, pela paciência e tolerância, pelos momentos *nerds* e pelo ombro amigo.

Ao LGHM e seus integrantes, pelo apoio estrutural.

Ao CNPq, pela bolsa e financiamento do projeto.

Ao Prof. Cláudio Salgado e Prof. Sidney Santos, pela cessão das amostras, e ao Mateus, pelas dúvidas tiradas.

Ao Leonardo, vulgo Leleco, pelas palavras de conforto, por corrigir meu inglês, e me “inspirar” a ser mais *nerd*.

Aos meus amigos (lá vem...):

-Às sempre presentes. G12 do meu coração! Obrigada por todos os risos, lágrimas, fofocas, sustos, *sleepovers*, *brownie* (o meu, lógico) com sorvete, Tia Maria, domingos culturais, aniversários surpresa, conversas “depenadas”, por me entenderem, mesmo quando eu falo na velocidade da luz, por brigarem comigo quando eu mereço, e, principalmente, por me amarem tanto. Eu sei que amam! E é recíproco, viu? Se é! Pá (“casinha”), Lili (“aaaiiiiiinnnn”), Rê (“pelamordideus!”), Déa (Fessora!), Marcinha e Daf (nuuuunca uma *night!*), Daisy (15 minutos!), May (sumida!), Maria Helena (amiga de TPM-tensão pré-mestrado), e minhas companheiras de sala, Didi e Paulinha. Vocês são o melhor exemplo de que existe vida após a faculdade. E que venha a segunda geração, né, Arthur?

-Aos distantes. Em breve, muitos estarão, mas não vamos falar disso agora. À Tiiiiiiici, minha eterna amiga dos problemas imaginários, porque os musicais do Gene não têm a mesma graça sem ela. Ao Marinho (que bom que voltou), pelas crises (de ambos), pelo gosto musical, e por me dar tanto trabalho! Sorte tua que eu tenho um coração bom... Ao Arthur, por sempre acreditar no meu potencial acadêmico. Aos meus “amiguinhos” do ISPA, porque reencontrar foi bom demais. Tô chegando!!

-Aos novos, porque 2007 me trouxe muitos, e que vieram pra ficar. Ao Filipe, por cuidar da Tici, e me “emprestar” a Dê, a Lú, o Vini (baby querido!), o Stefano & Cia (convenhamos, são muitos nomes!). Como eu já disse, que bom que chegaram sem pedir licença! Vocês fizeram toda a diferença (não era pra rimar...). À Aline, por tanta, tanta coisa. De Mr. Big à “Rosemaryyyyyy”, Amazônia Jazz Band à Leny Andrade, domingos na Estação às infinitas idas ao Imaginário; pelos conselhos, crises, afinidades, ofurô, fotos, muitas fotos, e simplesmente *for being there*. *Thanks baby!*

-Aos da “repartição”, e dos Cafés da vida. Pedrox, Américo, Flávia e Karla, além do Glauber, o ex mais irritante do mundo, que eu gosto mesmo assim.

-Aos de bancada. Jana, Danutinha, Lay, Bruna, Carol e Larysse, “*new generations*” queridas. Me orgulho muito de vê-las crescer a cada dia (Carol e Danuta, foi uma metáfora...). Fico feliz por terem nos escolhido como “mestres” (né, Lay?) e espero que continuem nesse caminho. À velha guarda, Bila, Maria Helena e Clayton, e minha irmãzinha de bancada, Pazinha. Obrigado pela companhia, pela ajuda, por dividir a “merenda”, as dúvidas, as descobertas, os resultados (ou a falta deles) e pelo vínculo tão forte que viemos construindo ao longo desses quase seis anos.

Se você não encontrou seu nome aqui, perdoe-me. O coração é grande, mas a mente é meio lenta.

Agora, a minha base. Família. Um pedaço cá, outro lá. Nesses dois anos, muita coisa mudou. Comemoramos, sofremos, rimos, choramos, viajamos, cozinhamos... Juntos! E assim seremos. Serei sempre a Mi, a Miá, o “Rudi”, seja cá ou lá. Dinda e Vô, meu amor por vocês é incondicional. Obrigada por me deixarem ser o “presentinho de Papai do Céu” e me fazerem sentir tão querida. Cris e Deco, meus irmãos para sempre. Pinga e Mônica, cunhados favoritos (únicos, mas isso é um mero detalhe...). Meus três surfistas lindos, Lipe, Pepê e Serginho. Tia Norma e Milú, que me admiraram sempre. Obrigada por tudo!

Ao meu pai e à Paty, minha “boadrasta”, por todo apoio, e aos meus irmãozinhos lindos, Joãozinho e Israel.

E, por fim, mas não menos importante, às minhas três jovens senhoras lindas, mãe, vóvis e Lalinha. Obrigada pelos telefonemas, emails, cartas, passagens, colos, passeios, quiosques, por todo amor e carinho, e, principalmente, por essa herança genética absolutamente excêntrica.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 HANSENÍASE.....	12
1.1.1 Agente etiológico	12
1.1.2 Características da doença	13
1.1.3 Epidemiologia	15
1.1.4 Resposta imune à hanseníase	18
1.2 CÉLULAS NK.....	23
1.2.1 Receptores e ligantes de células NK	26
1.2.2 Genes KIR	27
1.3 OBJETIVOS.....	31
1.3.1 Objetivo Geral	31
1.3.2 Objetivos Específicos	32
2 MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1 POPULAÇÃO.....	33
2.2 COLETA DAS AMOSTRAS.....	33
2.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....	34
2.4 GENOTIPAGEM DOS GENES <i>KIR</i>	34
2.5 GENOTIPAGEM DOS GRUPOS NK1 E NK2 DE HLA-C.....	37
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
3 RESULTADOS	39
4 DISCUSSÃO	47
5 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	50

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura 1.	Fotomicrografia de lesão de pele de paciente com hanseníase..	2
Figura 2.	Lesão de paciente com hanseníase paucibacilar.....	4
Figura 3.	Lesões de paciente com hanseníase multibacilar.....	4
Tabela 1.	Prevalência da hanseníase no mundo no ano de 2006...	6
Figura 4.	Prevalência da hanseníase no Brasil no ano de 2006.....	7
Figura 5.	Padrão de resposta imune na hanseníase	8
Figura 6.	Possíveis resultados do encontro de uma célula NK e uma célula alvo.....	14
Figura 7.	Receptores de genes <i>KIR</i>	17
Quadro 1.	Ligantes HLA de classe I para os genes <i>KIR</i>	18
Quadro 2.	Combinações de genes <i>KIR</i> e HLA de classe I e suas associações com doenças.....	19
Quadro 3.	<i>Primers</i> utilizados nas reações em cadeia da polimerase para a genotipagem dos genes <i>KIR</i>	25
Quadro 4.	<i>Primers</i> utilizados nas reações em cadeia da polimerase para a genotipagem dos grupos NK1 e NK2 de HLA-C	27
Tabela 2.	Freqüência dos genes <i>KIR</i> em pacientes e controles	29
Figura 8.	Distribuição dos perfis de genes <i>KIR</i> em pacientes com hanseníase e na população controle.....	31
Figura 9.	Correlação positiva entre a freqüência do gene <i>KIR2DL2</i> e a taxa de prevalência da hanseníase.....	34
Figura 10.	Matriz de desequilíbrio de ligação (DL) entre os pares de loci <i>KIR</i>	35

RESUMO

A hanseníase é uma infecção crônica e granulomatosa da pele e nervos periféricos, que infecta principalmente macrófagos e células de Schwann. A Organização Mundial de Saúde classifica a hanseníase em duas formas polares: multibacilar e paucibacilar, de acordo com o índice baciloscópico e a resposta imune do hospedeiro. As células *natural killer* (NK) têm um importante papel na infecção, sendo a primeira forma de defesa contra organismos intracelulares. As células NK utilizam muitos tipos de receptores de superfície celular, como os receptores imunoglobulina-símiles de célula NK (KIR), que podem inibir ou ativar a resposta citolítica de NK, através do reconhecimento de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I na célula alvo. Nesse estudo caso controle, a presença ou ausência de 15 genes KIR e seus ligantes HLA-C foram investigadas, na intenção de se descrever sua variabilidade genotípica, associação com a hanseníase e sua evolução clínica. A genotipagem do complexo de genes KIR e dos grupos NK1 e NK2 de HLA-C foi feita por PCR-SSP em 105 pacientes e 104 controles. KIR2DL2 e KIR2DL3, na presença do seu ligante HLA-Cw parece predispor à hanseníase ($p=0,046$; $\chi^2= 3,97$; OR=1,99; IC 95%= 1,00-3,97). Além disso, a prevalência da hanseníase ao redor do mundo e as freqüências de *KIR2DL2* se correlacionaram positivamente. Esse achado, juntamente com a associação entre KIR2DL3 e a tuberculose, descrita por outros autores, sugere que esses genes de receptores inibitórios predispõem à doença. Adicionalmente, o gene *KIR2DS2* foi associado com o desenvolvimento da hanseníase paucibacilar ($p=0,009$; $\chi^2= 7,23$; OR=3,97; IC 95%= 1,37-9,96), possivelmente modulando o desenvolvimento para a forma mais branda da doença.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic and granulomatous disease of the skin and peripheral nerves, that infects mainly macrophages and Schwann cells. The World Health Organization classifies leprosy in two polar forms: multibacillary and paucibacillary, according to the bacillary index and the immune response from the host. Natural killer (NK) cells play an important role during infection, since it constitutes the first defense against intracellular organisms. NK cells utilize many types of cellular surface receptors, as killer immunoglobulin-like receptors (KIR) that may inhibit or activate NK cytolytic response, through recognizing major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on the target cell. In this case-control study, the presence or absence of 15 KIR genes and their HLA-C ligands were investigated, aiming to describe their genotypic variability, association with leprosy infection and clinical progression. Genotyping of KIR repertoire and HLA-C NK1 and NK2 groups was performed by PCR-SSP in 105 patients and 104 controls. *KIR2DL2* and *KIR2DL3*, in the presence of its HLA-Cw ligand, may predispose to leprosy ($p=0,046$; $\chi^2= 3,97$; OR=1.99; 95% CI=1.00-3.97). Additionally, worldwide leprosy prevalence and *KIR2DL2* frequencies were positively correlated. This find, along with the association between *KIR2DL3* and tuberculosis described by other authors, suggests that these inhibitory receptor genes predispose to the disease. Besides, *KIR2DS2* was associated with the development paucibacillary leprosy ($p=0,009$; $\chi^2= 7,23$; OR=3,7; 95% CI=1,37-9,96), possibly modulating the development toward the mild form of the disease.

1 INTRODUÇÃO

1.1 HANSENÍASE

1.1.1 Agente etiológico

A hanseníase é uma doença causada pelo *Mycobacterium leprae*, uma bactéria intracelular obrigatória, aeróbia, gram-positiva e não-formadora de esporos (Tortora *et al.*, 2005). É uma infecção crônica e granulomatosa da pele e nervos periféricos, que infecta principalmente macrófagos e células de Schwann (Alcaïs *et al.*, 2005; Britton & Lockwood, 2004).

Taxonomicamente, essa bactéria pertence ao filo Actinobacteria, classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales, subordem Corynebacteriaceae e família Mycobacteriaceae (Garrity *et al.*, 2004). O *Mycobacterium leprae* tem a forma de um bastonete reto ou ligeiramente encurvado, de 1,5 a 8 micra de comprimento por 0,2 a 0,5 micron de largura. É um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) que, nos esfregaços de pele e nos cortes histopatológicos, é encontrado isolado, em agrupamentos variados ou em arranjos especiais denominados globias (Figura 1), peculiares do *M. leprae*, que resultam da sólida união de bacilos através de uma substância chamada gléia (Goulart *et al.*, 2002).

Sob condições apropriadas, as bactérias crescem como bacilos delgados individuais. A camada externa de lipopolissacarídeos é substituída por ácidos micólicos, que formam a camada por onde entram os nutrientes, de forma bem lenta, o que pode contribuir para o crescimento lento das micobactérias (Tortora *et al.*, 2005). Apesar de o esqueleto de peptidoglicano, comum a todas

as bactérias, com arabinogalactano e ácidos micólicos, contribuir para a integridade estrutural da parede celular do *M. leprae*, ele não é um imunógeno importante. Ao invés disso, glicolípídeos, glicopeptídeos e trealose contendo lipooligosacarídeos parecem ser os componentes antigênicos ativos do *M. leprae*. O glicolípídeo associado à parede celular de maior importância é o glicolípídeo fenólico I (PGL-I), que se mostra espécie-específico e imunogênico nas infecções por *M. leprae* (Hastings *et al.*, 1988).

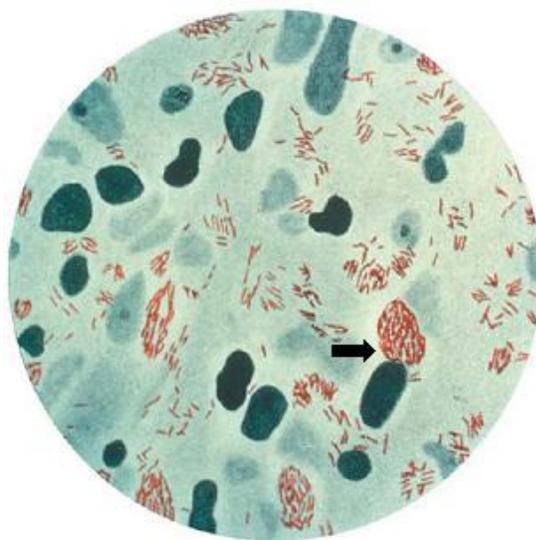


Figura 1. Fotomicrografia de lesão de pele de um paciente com hanseníase. A seta demonstra a formação de globias (Rinaldi, 2005).

1.1.2 Características da hanseníase

Os sintomas da hanseníase variam de acordo com alguns aspectos, como o acúmulo e a proliferação bacteriana e a resposta imunológica ao bacilo. A doença afeta principalmente os nervos periféricos, pele e membranas mucosas. Lesões na pele, áreas anestesiadas e nervos espessados são os principais sinais da doença (Britton & Lockwood, 2004).

A classificação de Ridley-Jopling, de 1966, combina critérios clínicos, histopatológicos e imunológicos para identificar os tipos de hanseníase, onde se tem as formas: tuberculóide (TT), *borderline*-tuberculóide (BT), *borderline-borderline* (BB), *borderline*-lepromatosa (BL), e lepromatosa (LL), essa última também conhecida como virchowiana.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) utiliza outra classificação, proposta para o controle da terapia multidrogas, sugerindo duas categorias de hanseníase: paucibacilar (PB), que inclui TT e BT, e multibacilar (MB), que inclui BB, BL e LL (WHO, 1998). Essas duas formas diferem pela presença ou ausência de BAAR nos esfregaços de pele ou biópsias, ou, ainda, pelo número de lesões, onde a forma paucibacilar se apresenta com até 5 lesões (Figura 2) e a multibacilar com mais de 5 lesões (Figura 3) (WHO, 2000).

Em paucibacilares, as lesões têm características de uma resposta imune mediada por célula (perfil do tipo Th1) bem desenvolvida, e um baixo índice baciloscópico; enquanto que, em multibacilares, o perfil imune é do tipo Th2, com uma resposta imune celular fraca e presença de numerosos bacilos. Os pólos *borderline* são instáveis e têm respostas imunorregulatórias pouco compreendidas (Gallo *et al.*, 2003; Casanova *et al.*, 2002).



Figura 2. Lesão de paciente com hanseníase paucibacilar (Imagem cordialmente cedida pela Professora Socorro Amador-IEC)



Figura 3. Lesões de paciente com hanseníase multibacilar (Imagem cordialmente cedida pela Professora Socorro Amador-IEC)

Em pacientes multibacilares, encontram-se lesões difusas ou nodulares, especialmente nas superfícies frias do corpo, como a mucosa nasal e as ramificações dos nervos periféricos no cotovelo, joelho, pulso e tornozelo. Há perda sensorial devido aos danos nas fibras nervosas. Por outro lado, o pólo tuberculóide (paucibacilar) consiste de poucas lesões, de perda sensorial bem definida. As formas *borderline*, por serem instáveis, possuem sinais e sintomas intermediários entre as duas formas (Britton & Lockwood, 2004; Araújo, 2003).

1.1.3 Epidemiologia

A hanseníase era considerada endêmica em cerca de 122 países em 1985. Em 1995, iniciaram-se os tratamentos multidrogas, em que a OMS forneceu a medicação, livre de custo, para os países endêmicos. No início de 2003, 112 desses países haviam eliminado a hanseníase nacionalmente. Os 10 países restantes da África, Ásia e América Latina, onde o total de casos relatados representa 83% da prevalência global (3,4 por 10.000 habitantes), ainda não haviam atingido a meta do Programa de Eliminação Global da hanseníase: reduzir a taxa de prevalência da doença para menos de um caso por 10 mil habitantes. Em 2003, o Brasil era o segundo país mais endêmico no *ranking* mundial, com taxa de prevalência de 4,2 por 10 mil habitantes, com os principais focos nas regiões Norte e Nordeste (WHO, 2004).

Dados de 2005 refletem que a meta do Programa ainda não foi atingida em nove países, mas esforços estão sendo feitos, especialmente com o acesso mais fácil ao diagnóstico e ao tratamento multidrogas (WHO, 2006). A Tabela 1 demonstra a prevalência da hanseníase em alguns países no mundo.

Tabela 1. Prevalência da hanseníase no mundo no ano de 2006

PAÍS	PREVALÊNCIA POR 10.000 HABITANTES
Angola	0,93
Argentina	0,21
Brasil*	1,59
China	0,02
Coréia	0,09
Etiópia	0,75
Índia	0,84
Indonésia	0,98
Madagascar*	1,20
Moçambique*	2,59
Nepal*	1,83
Oman	0,01
Papua Nova Guiné	1,09
Paraguai	1,30
República Democrática do Congo*	1,83
Samoa	0,27
Senegal	0,42
Suriname	0,88
Tailândia	0,21
Tanzânia*	1,13
Vietnã	0,08

*Países que ainda não atingiram a meta do Programa de Eliminação da Hanseníase. Fonte: WHO, 2006

Hoje, o Brasil, ainda considerado como país endêmico, apresenta taxa de prevalência de 1,59 caso para cada grupo de 10 mil habitantes e, no estado do Pará, essa taxa é de 3,98. A Figura 4 ilustra a distribuição da hanseníase nos estados brasileiros.

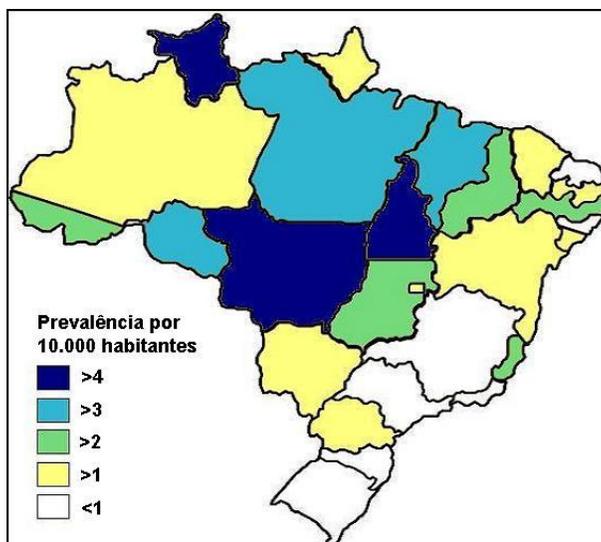


Figura 4. Prevalência da hanseníase no Brasil no ano de 2006 (Fonte: WHO, 2006).

1.1.4 Resposta Imune à hanseníase

Depois da sua entrada no organismo, não ocorrendo a sua destruição, o *M. leprae* irá se localizar na célula de Schwann e na pele. Sua disseminação para outros tecidos pode ocorrer nas formas mais graves da doença, nas quais o agente infectante não encontra resistência contra a sua multiplicação (Araújo, 2003). Os aspectos imunológicos da hanseníase são de grande importância para o entendimento da doença, já que é a resposta imune que vai definir a forma polar da hanseníase.

Muitos microorganismos intracelulares induzem o desenvolvimento de subpopulações Th1 de linfócitos T auxiliares, as quais produzem IFN- γ , a citocina que ativa fagócitos para destruírem microorganismos intracelulares e estimula a produção de anticorpos opsonizantes que promovem mais fagocitose. Outros microorganismos, em contraste, estimulam o desenvolvimento de

subpopulações Th2 desses linfócitos, as quais produzem interleucina 4 (IL-4) e interleucina 5 (IL-5). Dessa forma, as citocinas são o principal estímulo para a diferenciação e eficácia das respostas imunes adaptativas e, especificamente na hanseníase, esse desenvolvimento vai definir a doença em multibacilar (Th2) ou paucibacilar (Th1) (Figura 5).

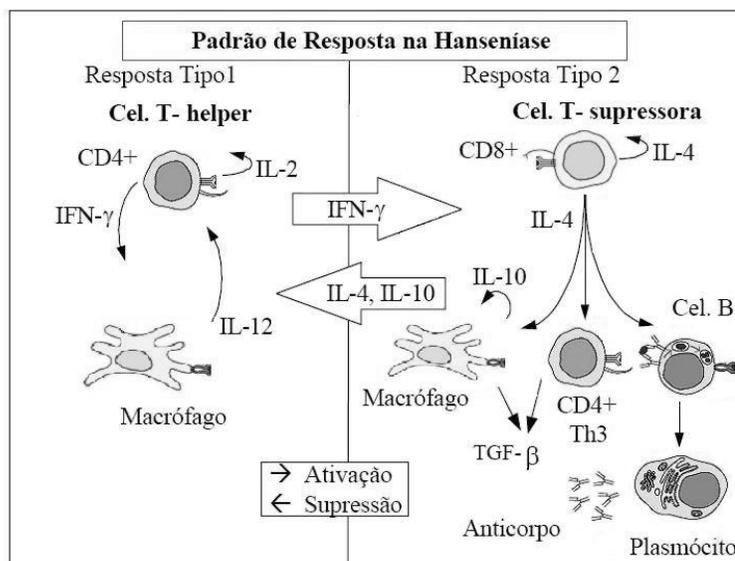


Figura 5. Padrão de resposta imune na hanseníase (FONTE: Adaptado de Goulart, 2002.).

O macrófago é a célula hospedeira primária do *M. leprae*. Essa célula é importante nas funções eferentes e aferentes da resposta imune contra o bacilo, como no processamento e apresentação de antígeno, secreção de citocinas e eliminação desse patógeno intracelular (Hagge *et al.*, 2004).

Além dos macrófagos, as células dendríticas (representadas pelas células de Langerhans, na pele) parecem ser umas das primeiras células a entrar em contato com o bacilo, na ausência da resposta imune adaptativa. A fagocitose do *M. leprae* por essas células e a subsequente produção de citocinas pode

regular a inflamação e manipular o curso da imunidade adaptativa mediada por célula para uma resposta do tipo Th1 ou Th2 (Maeda *et al.*, 2003; Scollard *et al.*, 2006).

A subpopulação Th1, que são células T que produzem IL-2 e interferon γ (IFN- γ), aumentam a imunidade mediada por célula. O IFN- γ ativa macrófagos e a IL-2 estimula o crescimento de células T antígeno-específicas, resultando em doença mais branda ou cura (Goulart *et al.*, 2002).

O IFN- γ estimula os macrófagos a matar ou restringir a proliferação de micobactérias e outros patógenos intracelulares, aumenta a expressão de HLA-DR (antígeno leucocitário humano, alelo DR, classe II) e também de moléculas de HLA de classe I, além de ativar a resposta do tipo Th1 e inibir a do tipo Th2 (Goulart *et al.*, 2002; Abbas & Lichtman, 2005a). A IL-2 pode contribuir para a defesa do hospedeiro por induzir a expansão clonal de células T após o reconhecimento antigênico e aumentar a produção de IFN- γ por estas células (Oppenheim & Ruscetti, 2000), além de promover a proliferação e acentuar a função citolítica das células *natural killer* (NK) (Abbas & Lichtman, 2005a).

A produção local de fator de necrose tumoral α (TNF- α) pelo macrófago, favorece uma ação sinérgica autócrina para manter o macrófago ativado e formar o granuloma imune (Goulart *et al.*, 2002). A IL-12, secretada por fagócitos mononucleares ativados e células dendríticas, é o principal mediador da resposta imune inata inicial a microorganismos intracelulares e é um indutor essencial da imunidade mediada por células, a resposta imune adaptativa adequada à esses organismos (Abbas & Lichtman, 2005a). Essa citocina estimula

células NK a liberarem IFN- γ , o qual predispõe as células T em direção ao padrão Th1, além de induzir células T imaturas a produzir citocinas Th1 quando estimuladas com antígeno e célula apresentadora de antígeno (APC) (Goulart *et al.*, 2002).

A subpopulação Th2, que são células T que produzem IL-4, IL-5 e IL-10, aumentam a resposta humoral. A IL-4 estimula a produção de IgE e ambas, IL-4 e IL-10, estimulam células B e inibem ativação de macrófago, resultando em infecção progressiva (Oppenheim & Ruscetti, 2000).

As citocinas presentes em lesões LL (multibacilares), citocinas tipo 2 ou Th2, IL-4, IL-5 e IL-10, parecem contribuir para a ineficácia da resposta imune e a falha de ativação do macrófago nesses indivíduos (Goulart *et al.*, 2002). A IL-4 também tem um efeito imunorregulatório negativo sobre a imunidade mediada por célula, que pode levar ao aumento da proliferação bacteriana porque: (i) bloqueia a proliferação dependente de IL-2 de células T humanas por inibir receptores de IL-2; (ii) bloqueia a ativação de monócitos mediada pelo IFN- γ ; (iii) inibe a expressão de CD14 sobre monócitos e produção de IL-1 e TNF- α , e bloqueia a geração de óxido nítrico (NO), necessário à destruição de patógenos intracelulares (Oppenheim & Ruscetti, 2000).

Além da IL-4, a IL-13 tem sido incluída no mecanismo de supressão de células T em hanseníase, por seus efeitos sobre células B e macrófagos, similares aos da IL-4. Tem sido demonstrado que apenas clones de células T tipo 2 de lesões lepromatosas produzem IL-13, o que sugere que a IL-13 pode ter um papel na imunossupressão em lesões LL (De La Barrera *et al.*, 2004). A presença

de IL-10 em lesões LL, uma citocina que pode inibir a produção de citocinas por células CD4+ na relativa ausência de IFN- γ ou IL-2, sugere um possível papel para esta citocina nessa resposta imunológica ineficiente específica aos antígenos de *M. leprae*.

Uma ativação crônica local de IL-10 pode levar a uma diferenciação de células T CD4+, originando uma subpopulação de células T regulatórias (Tr1) que produzem altos níveis de IL-10, mantendo a supressão da resposta imune antígeno-específica (Goulart *et al.*, 2002). A IL-10 inibe a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas ativadas, culminando na inibição de IFN- γ , que por sua vez, é um indutor das reações imunes inatas e mediadas por células contra microorganismos intracelulares (Abbas & Lichtman, 2005a).

Nesse contexto, a imunidade celular é de grande importância em infecções como a hanseníase. As células NK, por exemplo, não são importantes apenas na imunidade inata, mas também são reguladoras da imunidade adaptativa (Bottino *et al.*, 2005). São especialmente importantes no momento inicial da infecção por bactérias intracelulares, já que, juntamente com os fagócitos, as células NK são a primeira resposta imune contra tais microorganismos. As bactérias intracelulares ativam as células NK por duas vias: diretamente ou estimulando macrófagos a produzirem IL-2, que é ativadora de NK. A IL-2, por sua vez, produz IFN- γ , que ativa os macrófagos e promove a morte das bactérias fagocitadas (Abbas & Lichtman, 2005b).

1.2 CÉLULAS NK

As células NK são da linhagem linfóide, e constituem cerca de 15% dos linfócitos circulantes no sangue periférico, e 3 a 4% dos esplênicos (Imboden & Seaman, 2000). Ao contrário das células T, que possuem receptores altamente específicos para vários tipos de antígenos, os receptores de célula NK são pouco específicos, mas capazes de reconhecer e eliminar células anormais (Janeway *et al.*, 2001).

A célula NK é um dos mediadores celulares da defesa inata. São células que podem reconhecer e eliminar células aberrantes, sem a necessidade de serem imunizadas ou pré-ativadas, e produzir fatores solúveis – citocinas e quimiocinas – que tem efeitos antimicrobianos diretos ou ativam outras células do sistema imune (Colucci *et al.*, 2003).

Linfócitos da imunidade adaptativa são de extrema importância para uma resposta imune eficaz, porém levam um tempo para serem reconhecidos pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), e recrutados em número suficiente (expansão clonal) para adquirirem função efetora. Em contraste, as células NK, que são da imunidade inata, estão prontas para a resposta em um curto período, já que, por não serem tão específicas, dispensam expansão clonal (Bottino *et al.*, 2005).

A função efetora das células NK é uma importante frente de defesa na imunidade inata em infecções parasitárias, bacterianas e virais, além de formar uma importante ponte para a ativação da resposta imune adaptativa (Degli-Esposti & Smyth, 2005)

A destruição pelas células NK é feita de vários modos. Um deles é pela citotoxicidade mediada por células e dependente de anticorpo, onde os receptores CD16 (porção Fc) dessas células reconhecem algumas subclasses de IgG presentes na superfície das células infectadas, e destroem tais células pela liberação de grânulos contendo perforina, que abre poros na membrana, e granzimas, que deflagram o fenômeno da apoptose (Imboden & Seaman, 2000). As células NK fazem uma “vigilância imune”, reconhecendo células com diminuição da expressão de MHC de classe I ou que super-expressam ligantes para receptores estimulatórios das mesmas (Lanier, 2005)(Figura 5).

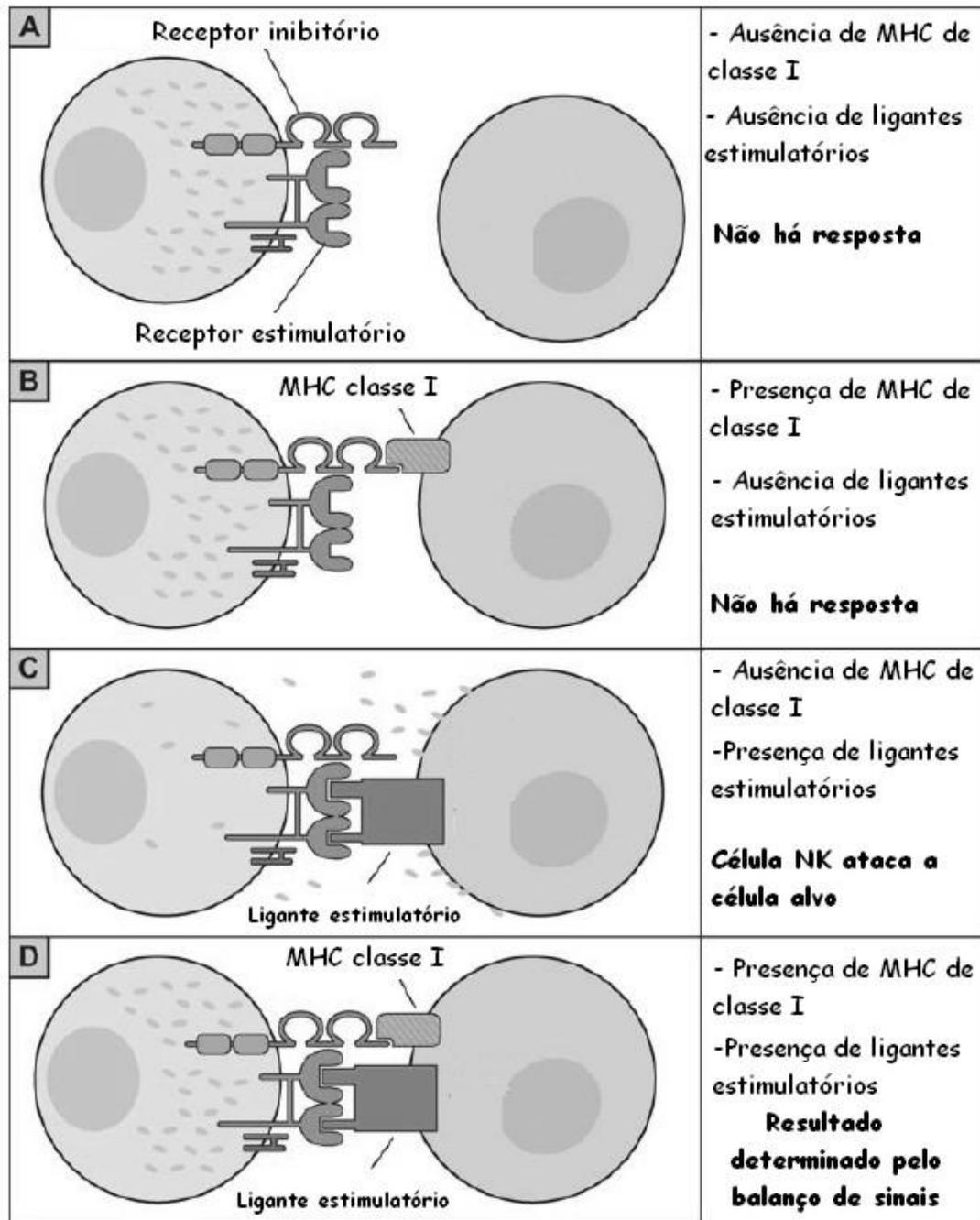


Figura 6. Possíveis resultados do encontro entre uma célula NK e uma célula alvo.

1.2.1 Receptores e ligantes de células NK

O controle da lise celular provocada pelas células NK é feito por um complexo sistema de diversas interações entre ligantes e receptores inibitórios e estimulatórios, envolvendo a expressão de MHC (Boyton & Altmann, 2007). Em resposta ao *stress* e à infecção, as células NK usam tais receptores de superfície celular, que se ligam a moléculas do MHC de classe I, ou relacionadas ao MHC de classe I (Parham, 2005)

As células NK, então, monitoram a expressão de moléculas de MHC de classe I em células-alvo em potencial, usando receptores específicos, como os receptores imunoglobulina- símiles de células *natural killer* (KIR). Os heterodímeros CD-94- NKG2A, também receptores de NK, uma vez ligados ao ligante específico, inibem a citotoxicidade mediada por essa célula (Bottino *et al.*, 2005).

A maioria dos receptores de NK podem ter duas estruturas possíveis, dependendo de quanto seu domínio extracelular de ligação com o ligante se assemelha ao domínio de reconhecimento de carboidrato de lectina tipo C ou ao domínio de imunoglobulina (Parham, 2005).

As famílias de genes que codificam o complexo de receptores lectina-símiles numa região cromossomal conhecida como o complexo NK (NKC), considerando as famílias de genes que codificam os receptores imunoglobulina-símiles, estão presentes numa região denominada de LCR (*Leukocyte-receptor*

Complex). O MHC, NKC e LCR estão em diferentes cromossomos humanos: 6p21.3, 12p12-13 e 19q13.4, respectivamente (Parham, 2005).

1.2.2 Genes KIR

Os genes KIR (*Killer cell immunoglobulin-like receptors*) são membros de um grupo de genes que codificam moléculas regulatórias encontradas em algumas linhagens de células linfóides, como subpopulações de células T de memória e efectoras, células T $\gamma\delta$, células T do fígado, e, principalmente, nas células NK (Carrington & Martin, 2006).

A função principal desses receptores é efetuar o reconhecimento das moléculas de HLA Classe I nas células alvo, destruindo, através de um mecanismo de citólise, aquelas células que possuem um padrão aberrante na expressão destas moléculas em sua superfície. Os genes KIR constituem-se de genes polimórficos mapeados na posição q13.4 do cromossomo 19 e estão contidos no LRC, uma região que compreende aproximadamente 1 Mb de comprimento (Parham, 2005; Moretta *et al.*, 2004).

Os genes KIR, quanto à sua estrutura e função, podem ser basicamente de quatro tipos. Os genes denominados L (que possuem cauda intracitoplasmática longa) têm função de inibição e transmitem sinais para que a célula efetora (NK) não destrua a célula alvo (Carrington & Norman, 2003). Essa inibição ocorre pela presença de um ou dois imunorreceptores contendo motivos de inibição baseados em tirosina (ITIM) (Lanier, 2004). Quando os ligantes se

ligam aos receptores, esses ITIM se tornam fosforilados em resíduos de tirosina e se ligam a tirosina-fosfatases, como SHP-1 e 2, que por sua vez desfosforila intermediários de sinalização das vias de ativação (Abbas & Lichtman, 2005b).

Os genes denominados de S (que possuem cauda intracitoplasmática curta) têm função de ativação, e transmitem sinais para que a célula efetora destrua a célula alvo. Independentemente do tamanho da cauda, os genes KIR podem possuir dois ou três domínios extracelulares, classificados como 2D ou 3D. Portanto, os genes KIR podem ser 2DS, 2DL, 3DS ou 3DL (Figura 6) (Urhberg *et al.*, 2005).

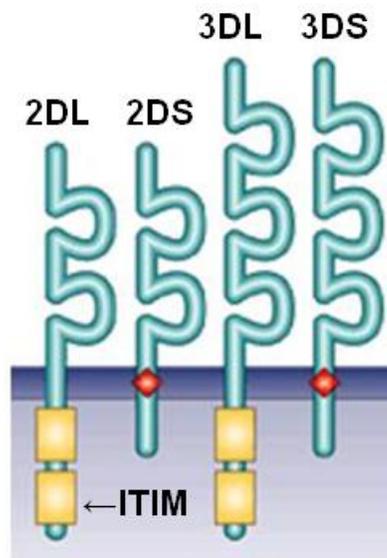


Figura 7. Estrutura dos Receptores Imunoglobulina-símiles (Adaptado de Parham & McQueen, 2003)

Tendo como base o conteúdo gênico, podemos agrupar os genes KIR em dois haplogrupos principais, A e B. O haplogrupo A possui sete genes: KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DS4, KIR3DL1, KIR3DL2 e KIR3DL3, sendo a mais relevante distinção funcional entre os dois haplogrupos, o fato de o

haplogrupo A possuir apenas um gene estimulatório, *KIR2DS4*, enquanto que o B pode ter em sua formação diversas combinações dos genes *KIR 3DL3, 2DL2, 3DP1, 2DL4, 3DS1, 2DL5, 2DS5, 2DS1, 2DS2*, e *3DL2* (Martin *et al.*, 2004). O gene *KIR2DS4* possui um alelo nulo, devido à uma deleção de 21 pares de base no domínio transmembrana, que possui uma frequência de 80% em americanos de descendência européia (Hsu *et al.*, 2002), o que mostra que muitos indivíduos homocigotos para o haplogrupo A não codificam nenhum receptor estimulatório.

Foi proposto por Wilson *et al.* (2000), com base na similaridade das seqüências, que o gene *KIR2DL2* surgiu de uma recombinação não recíproca entre os genes *KIR 2DL1* e *2DL3* o que explicaria o fato de *2DL2* e *2DL3* segregarem como alelos do mesmo *locus* (Witt *et al.*, 1999).

Vários ligantes de KIR já foram descritos (Quadro 1). Os genes *KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DL2* e *KIR2DL3* reconhecem HLA-C, com asparagina (NK2) ou lisina (NK1) na posição 80. Os ligantes para os receptores *2DL5, 2DS3, 2DS4, 2DS5* e *3DL3* ainda não são conhecidos (Carrington & Martin, 2006).

Quadro 1. Ligantes HLA de classe I para os genes *KIR*

2DL1 e 2DS1	2DL2/3 e 2DS2	3DL1/S1	3DL2	2DL4
HLA-Cw grupo 2(NK1) Cw*02 Cw*04 Cw*05 Cw*06	HLA-Cw grupo 1 (NK2) Cw*01 Cw*03 Cw*07 Cw*08	HLA-Bw4 B*08 B*13 B*27 B*44 B*51 B*52 B*53 B*57 B*58	HLA-A A*3 A*11	HLA-G

Devido aos KIRs se ligarem a determinantes polimórficos de moléculas de HLA de classe I, e devido às duas famílias de genes segregarem independentemente, é importante se considerar as combinações das moléculas de HLA de classe I com os KIRs como um fator de risco para o surgimento e progressão de doenças (Parham, 2005; Williams *et al.*, 2005). Vários efeitos dessa associação já foram relatados (Quadro 2).

Quadro 2. Combinações de genes KIR e HLA de classe I e suas associações com doenças

CONDIÇÃO	ASSOCIAÇÃO	FONTE
Reprodução		
Risco de pré-eclampsia	Homozigose para o haplogrupo A de KIR materno e HLA-C2 fetal	Hiby <i>et al.</i> , 2004
Risco de aborto espontâneo recorrente	Ausência de KIR inibitórios com especificidade para alelos de HLA-Cw fetais	Varla-Leftherioti <i>et al.</i> , 2005
Infecção		
Progressão lenta do HIV	<i>KIR 3DS1</i> e <i>HLA- Bw4</i>	Martin <i>et al.</i> , 2002
Cura da infecção por HCV	Homozigose de <i>KIR2DL3</i> e de HLA-C1	Khakoo <i>et al.</i> , 2004
Cura da infecção por HCV e proteção contra o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular	<i>KIR2DS1-HLA-Bw4</i>	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> , 2005
Aumento da resposta de NK à eritrócitos Infectados por malária <i>in vitro</i>	<i>KIR3DL2*002</i>	Artavanis-Tsakonas <i>et al.</i> , 2004
Susceptibilidade à tuberculose	<i>KIR2DL3</i>	Méndez <i>et al.</i> , 2006
Autoimunidade		
Susceptibilidade à Artrite psoriática	<i>KIR2DS1</i> e/ou <i>KIR2DS2</i> + ligante HLA-Cw	Nelson <i>et al.</i> , 2004
Susceptibilidade à vasculite em pacientes com artrite reumatóide	<i>KIR2DS2/HLA-Cw*03</i>	Yen <i>et al.</i> , 2001
Susceptibilidade à diabetes do tipo I	<i>KIR2DS2/HLA-Cw</i> do grupo 1 Diminuição das combinações inibitórias de genótipos KIR-HLA	Van der Slik <i>et al.</i> , 2003 Van der Slik <i>et al.</i> , 2007
Susceptibilidade à esclerodermia	Combinação da presença de <i>KIR2DS2</i> e ausência de <i>KIR2DL2</i>	Momot <i>et al.</i> , 2004
Câncer		
Susceptibilidade à leucemia	<i>KIR2DL2</i> e <i>KIR2DS2</i> <i>KIR3DL1/KIR3DL1</i> + <i>HLA-Bw4</i>	Verheyden <i>et al.</i> , 2004 Verheyden <i>et al.</i> , 2006
Susceptibilidade à melanoma maligno	<i>KIR2DL2/2DL3</i> ; HLA-Cw do grupo 1	Naumova <i>et al.</i> , 2005

O papel de fatores genéticos na susceptibilidade à hanseníase tem sido avaliado há muito tempo, pois a distribuição da doença em conglomerados, famílias ou comunidades com antecedentes genéticos comuns sugere esta possibilidade (Visschedijk *et al.*, 2000). Inclusive, a variabilidade da resposta à infecção pelo *Mycobacterium leprae* causada pelos fatores genéticos do hospedeiro tem sido revisada recentemente (Casanova & Abel, 2002; Casanova & Abel, 2004; Alcaïs *et al.*, 2005). A destruição ou a multiplicação do bacilo no interior dos macrófagos podem ser determinadas por mecanismos imunológicos que envolvem a apresentação do antígeno pelas moléculas do MHC, geneticamente determináveis (Foss, 1999).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho é descrever a variabilidade genética envolvendo 15 *loci* do complexo KIR em pacientes com Hanseníase, investigando a associação de polimorfismos desses genes e de seus ligantes HLA-C com a predisposição à doença e com sua evolução clínica.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Descrever a variabilidade fenotípica de quinze genes do complexo KIR.
- Investigar a associação de fenótipos KIR e seus ligantes HLA-C com predisposição à hanseníase, comparando as frequências de controles e pacientes.
- Investigar a associação de fenótipos KIR e seus ligantes HLA-C com a evolução da hanseníase para suas formas polares paucibacilar e multibacilar.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 POPULAÇÃO

Belém está situada a 1,27 ° de latitude sul e 48,30° de longitude oeste. Segundo a estimativa do IBGE de julho de 2006, a cidade apresenta um total de 1.428.368 habitantes, distribuídos em 1064,918 km² de área territorial.

2.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletadas 105 amostras de 5mL de sangue periférico, por punção venosa à vácuo, de pacientes diagnosticados com hanseníase, cadastrados no ambulatório da Unidade de Referência e Tratamento em Dermatologia Sanitária do Estado do Pará “Dr. Marcelo Cândia”, dentre as quais 20 paucibacilares e 85 multibacilares.

Considerando a prevalência da hanseníase no Pará (3,98 por 10 mil habitantes) e o tamanho populacional da cidade de Belém (1,4 milhões, segundo o IBGE), pode-se afirmar que a população de pacientes desse estudo compreende cerca de 18% do total de pacientes infectados.

A amostra controle constituiu-se de 104 indivíduos não aparentados representativos da população de Belém, coletados da mesma forma.

Os tubos continham EDTA como anticoagulante e as amostras foram estocadas em temperatura adequada até o momento do uso. Os participantes

assinaram um termo de consentimento (em anexo) e estavam cientes do trabalho de pesquisa. Esse trabalho teve aprovação do Comitê de Ética da Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia do Pará.

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA foi feita pelo método descrito por Miller *et al.* (1988), com algumas modificações. O método utiliza 300 µL de sangue total, submetidos a cinco etapas: lise de hemácias por solução hipotônica; lise de leucócitos por solução detergente (SDS); precipitação de proteínas por uma solução de acetato de amônia a 7M; desidratação com isopropanol e etanol a 70%, e hidratação com água bidestilada.

2.4 GENOTIPAGEM DOS GENES KIR

Para a PCR, foram utilizados 29 pares de *primer*, um *forward* e um *reverse* – com exceção do gene *KIR2DS1*, constituído de dois *forwards* e um *reverse* – para a amplificação de 14 genes (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*), um pseudogene (*KIR2DP1*), e uma região controle. Para cada locus, exceto *2DS5*, foram utilizados dois pares de

primers, para evitar que não houvesse amplificação para evitar falsos negativos pela presença de polimorfismos alélicos na região de hibridização dos *primers*.

Cada uma das 29 reações tinha um volume final de 10 µL, contendo 15ng de DNA, 0.1mM de cada dNTP, 1.5mM de MgCl₂, 67mM de Tris-HCl (pH 8.8), 16mM de (NH₄)₂SO₄, 0.25mM de cada *primer* e 1 U de *Taq*.

As seqüências dos *primers* foram desenhadas por Martin *et al.* (2002) fornecidas como suplemento em www.jimmunol.org/cgi/data/169/6/2818/dc1/1 e se encontram no Quadro 3. As condições utilizadas na PCR foram 94^oC 3'; 94^oC 15", 65^oC 15" e 72^oC 30" (4 ciclos); 94^oC 15", 60^oC 15" e 72^oC 30" (21 ciclos); 94^oC 15", 55^oC 1' e 72^oC 2' (5 ciclos); 72^oC 7'.

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5 % contendo brometo de etídio, submetidos a uma corrente de 100 V, e posteriormente visualizados sob luz ultravioleta.

Para uma maior acurácia da PCR, os resultados negativos foram repetidos e para os positivos, foram feitos subgrupos de amostras para cada um dos genes, para os quais também foi feita repetição para confirmação.

Quadro 3. Primers utilizados na genotipagem dos genes *KIR*

GENE		SEQUÊNCIA	TAMANHO (pb)
<i>KIR2DL1</i>	Forward	GTT GGT CAG ATG TCA TGT TTG AA	146
	Reverse	GGT CCC TGC CAG GTC TTG CG	
	Forward	TGG ACC AAG AGT CTG CAG GA	330
	Reverse	TGT TGT CTC CCT AGA AGA CG	
<i>KIR2DL2</i>	Forward	CTG GCC CAC CCA GGT CG	173
	Reverse	GGA CCG ATG GAG AAG TTG GCT	
	Forward	GAG GGG GAG GCC CAT GAA T	150
	Reverse	TCG AGT TTG ACC ACT CGT AT	
<i>KIR2DL3</i>	Forward	CTT CAT CGC TGG TGC TG	550
	Reverse	AGG CTC TTG GTC CAT TAC AA	
	Forward	TCC TTC ATC GCT GGT GCT G	800
	Reverse	GGC AGG AGA CAA CTT TGG ATC A	
<i>KIR2DL4</i>	Forward	CAG GAC AAG CCC TTC TGC	254
	Reverse	CTG GGT GCC GAC CAC T	
	Forward	ACC TTC GCT TAC AGC CCG	288
	Reverse	GGG TTT CCT GTG ACA GAA ACA G	
<i>KIR2DS2</i>	Forward	TTC TGC ACA GAG AGG GGA AGT A	173
	Reverse	AGG TCA CTG GGA GCT GAC AA	
	Forward	CGG GCC CCA CGG TTT	240
	Reverse	GGT CAC TCG AGT TTG ACC ACT CA	
<i>KIR2DS3</i>	Forward	TGG CCC ACC CAG GTC G	242
	Reverse	TGA AAA CTG ATA GGG GGA GTG AGG	
	Forward	CTA TGA CAT GTA CCA TCT ATC CAC	190
	Reverse	AAG CAG TGG GTC ACT TGA C	
<i>KIR2DS4</i>	Forward	CTG GCC CTC CCA GGT CA	204
	Reverse	TCT GTA GGT TCC TGC AAG GAC AG	
	Forward	CTG GCC CTC CCA GGT CA	197/219
	Reverse	GGA ATG TTC CGT TGA TGC	
<i>KIR2DS5</i>	Forward	TGA TGG GGT CTC CAA GGG	125
	Reverse	TCC AGA GGG TCA CTG GGC	
<i>KIR2DS1</i>	Forward	CTTCTCCATCAGTCGCATGAA	102
	Forward	CTTCTCCATCAGTCGCATGAG	
	Reverse	AGAGGGTCACTGGGAGCTGAC	
<i>KIR3DL1</i>	Forward	CGC TGT GGT GCC TCG A	197
	Reverse	GGT GTG AAC CCC GAC ATG	
	Forward	CCC TGG TGA AAT CAG GAG AGA G	181
	Reverse	TGT AGG TCC CTG CAA GGG CAA	
<i>KIR3DL2</i>	Forward	CAA ACC CTT CCT GTC TGC CC	245
	Reverse	GTG CCG ACC ACC CAG TGA	
	Forward	CCC ATG AAC GTA GGC TCC G	130
	Reverse	CAC ACG CAG GGC AGG G	
<i>KIR3DS1</i>	Forward	AGC CTG CAG GGA ACA GAA G	300
	Reverse	GCC TGA CTG TGG TGC TCG	
	Forward	CCT GGT GAA ATC AGG AGA GAG	177
	Reverse	GTC CCT GCA AGG GCA C	
<i>KIR3DL3</i>	Forward	GTC AGA TGT CAG GTT TGA GCG	112
	Reverse	CAT GGA ATA GTT GAC CTG GGA AC	
	Forward	GCA GCT CCC GGA GCT TG	190
	Reverse	GGG TCT GAC CAC GCG TG	

(Continua)

GENE		SEQÜÊNCIA	TAMANHO (pb)
<i>KIR2DL5</i>	Forward	GCG CTG TGG TGC CTC G	214
	Reverse	GAC CAC TCA ATG GGG GAG C	
	Forward	TGC AGC TCC AGG AGC TCA	194
	Reverse	GGG TCT GAC CAC TCA TAG GGT	
<i>KIR2DP1</i>	Forward	GTC TGC CTG GCC CAG CT	205
	Reverse	GTG TGA ACC CCG ACA TCT GTA C	
	Forward	CCA TCG GTC CCA TGA TGG	90
	Reverse	CAC TGG GAG CTG ACA ACT GAT G	
CONTROLE INTERNO	Forward	TGC CAA GTG GAG CAC CCA A	796
	Reverse	GCA TCT TGC TCT GTG CAG AT	

2.5 GENOTIPAGEM DOS GRUPOS NK1 E NK2 DE HLA-C

Para a tipagem de HLA-C, foram utilizados *primers* preparados por Peter Parham, disponíveis na American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI), listados no Quadro 4. O *primer forward* hibridiza à uma seqüência consenso no éxon 2 do HLA-Cw, na posição 120-135. Os *primers reverse* hibridizam à seqüências alternadas, incluindo a posição 80, para diferenciar os grupos NK1 e NK2 (Frohn *et al.*, 1998).

A reação consiste de 0,2mmol de cada dNTP, uma unidade de *Taq* polimerase, 0,15µmol do *primer* de controle interno positivo, 0,5µmol de cada um dos primers HLA-Cw, 50ng de DNA genômico, 20mM de Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM de KCl e 1,5mmol de MgCl₂, com um volume final de 20µL.

Após 10 ciclos à 95°C, 10s/ 65°C; 30s/72°C; 30s (desnaturação/hibridização/extensão), foram feitos mais 22 ciclos, com a temperatura de hibridização diminuída para 58°C.

A visualização dos resultados também se deu por aplicação em gel de eletroforese à 1,5% contendo brometo de etídio, submetido a uma corrente de 100 V, e posteriormente visualizado sob luz ultravioleta.

Quadro 4. *Primers* utilizados para a genotipagem dos grupos NK1 e NK2 de HLA-C

Primer	Seqüência
HLA-Cw comum (<i>forward</i>)	CGC CGC GAG TCC RAG AGG
NK2 (<i>reverse</i>)	GTT GTA GTA GCC GCG CAG G
NK1 (<i>reverse</i>)	GTT GTA GTA GCC GCG CAG T
CRP (<i>forward</i>)	CCA GCC TCT CTC ATG CTT TTG GCC AGA CAG
CRP (<i>reverse</i>)	GGG TCG AGG ACA GTT CCG TGT AGA AGT GGA

R= qualquer nucleotídeo; CRP= controle interno positivo

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As freqüências relativas da presença de cada gene KIR (f) foram obtidas por contagem direta. A freqüência relativa de homozigotos para o haplogrupo A (h) foi obtida ao se considerar homozigotos os indivíduos com amplificação positiva para os 8 *loci* do haplogrupo A (2DL1, 2DL3, 2DL4, 2DS4, 3DS1, 3DL1, 3DL2 e 2DP1) e negativa para os outros *loci*. A freqüência do haplogrupo A (H) foi estimada pela fórmula $H=\sqrt{h}$.

O número médio de genes por perfil foi comparado usando o teste T de Student. As diferenças entre as populações de hanseníase e controle foram calculadas por qui-quadrado (χ^2), com o auxílio do programa Clump (Sham & Curtis, 1995), assim como as diferenças entre as freqüências do ligante HLA-C individualmente e na presença dos receptores que o reconhecem. Foi aplicada a correção para múltiplos testes, quando necessário.

Valores de Odds Ratio (OR), com intervalo de confiança (IC) de 95%, foram estimados para os genes onde foi obtida diferença estatisticamente significativa entre a população de pacientes e controles, com o auxílio do programa BioEstat 5.0 (Ayres, 2007).

As estimativas de desequilíbrio de ligação (DL) entre os *loci* foram calculadas pelo programa SPSS 8.0 *for Windows*.

3 RESULTADOS

O número médio de genes *KIR* por perfil não diferiu significativamente entre controles (10.56) e pacientes (10.8). Da mesma forma, não houve diferença estatisticamente significativa entre o número médio de genes estimulatórios e inibitórios por perfil.

As frequências observadas (*f*) para os 15 loci *KIR* estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2. Estimativas de f para 15 loci KIR em pacientes com hanseníase e controles.

<i>KIR</i>	Hanseníase			Controles
	MB	PB	MB+PB	
<i>2DL1</i>	0.96	0.95	0.96	0.94
<i>2DL2</i>	0.52	0.65	0.54	0.43
<i>2DL3</i>	0.89	0.75	0.87	0.86
<i>2DL4</i>	0.98	1.00	0.98	0.97
<i>2DL5</i>	0.59	0.60	0.59	0.63
<i>2DS1</i>	0.45	0.45	0.45	0.39
<i>2DS2</i>	0.40	0.60	0.44	0.29
<i>2DS3</i>	0.29	0.35	0.30	0.31
<i>2DS4</i>	0.89	0.95	0.90	0.93
<i>2DS5</i>	0.44	0.50	0.45	0.46
<i>3DS1</i>	0.46	0.45	0.46	0.44
<i>3DL1</i>	0.91	0.95	0.91	0.94
<i>3DL2</i>	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>3DL3</i>	0.99	1.00	0.99	0.99
<i>2DP1</i>	0.95	0.95	0.95	0.96
N	85	20	105	104

MB, multibacilar; PB, paucibacilar.

A análise da diferença entre as frequências dos genes KIR entre as populações de multibacilares e paucibacilares não foi significativa, assim como entre multibacilares e controles.

Foram observados 76 perfis em ambas as populações, sendo 32 exclusivos de controles, 44 exclusivos de pacientes e 20 compartilhados pelas duas populações.

As frequências do haplogrupo A em controles e pacientes não diferiram significativamente (0,46 e 0,47, respectivamente), o que também não aconteceu entre os subgrupos paucibacilar e multibacilar (0,39 e 0,49 respectivamente).

Entre os 15 loci KIR investigados, o *KIR2DS2* apresentou a maior discrepância entre pacientes que controles ($p=0,029$; $\chi^2=5,05$; OR=1,92; IC 95%= 1,08-3,41). Esse gene está presente em 29 % dos controles e 44 % dos pacientes, e é ainda mais freqüente na subpopulação paucibacilar, com freqüência de 60 % ($p=0,009$; $\chi^2= 7,23$; OR=3,97; IC 95%= 1,37-9,96). Ambas as comparações perderam a significância após a correção para múltiplos testes.

PERFIS	KIR2DL1	KIR2DL2	KIR2DL3	KIR2DL4	KIR2DL5	KIR2DS1	KIR2DS2	KIR2DS3	KIR2DS4	KIR2DS5	KIR3DS1	KIR3DL1	KIR3DL2	KIR3DL3	KIR2DP1	Contoles (n=104)	Hansenise MB (n=85)	Hansenise B (n=20)
1																1	3	0
2																1	1	0
3																1	6	0
4																12	6	3
5																22	20	3
6																0	2	0
7																1	3	0
8																0	1	0
9																2	1	0
10																0	2	0
11																0	1	0
12																2	4	1
13																2	2	0
14																0	1	0
15																0	1	0
16																0	1	0
17																0	2	0
18																2	1	0
19																0	1	0
20																7	3	1
21																0	1	0
22																0	1	0
23																0	1	0
24																0	1	0
25																0	2	0
26																0	1	1
27																1	0	1
28																0	0	1
29																0	0	1
30																1	0	1
31																1	0	1
32																0	0	1
33																0	2	1
34																0	0	1
35																0	0	1
36																1	0	1

(Continua)

PERFIS	KIR2DL1	KIR2DL2	KIR2DL3	KIR2DL4	KIR2DL5	KIR2DS1	KIR2DS2	KIR2DS3	KIR2DS4	KIR2DS5	KIR3DS1	KIR3DL1	KIR3DL2	KIR3DL3	KIR2DP1	Contoles (n=104)	Hanseníase MB (n=85)	Hanseníase B (n=20)
37																4	4	1
38																0	1	0
39																1	1	0
40																0	1	0
41																0	1	0
42																1	0	0
43																3	0	0
44																1	0	0
45																1	0	0
46																1	0	0
47																3	0	0
48																2	1	0
49																1	0	0
50																1	0	0
51																1	0	0
52																1	0	0
53																1	0	0
54																1	0	0
55																1	0	0
56																1	0	0
57																1	0	0
58																2	0	0
59																2	3	0
60																1	0	0
61																1	0	0
62																1	2	0
63																1	0	0
64																1	0	0
65																1	0	0
66																1	0	0
67																1	0	0
68																1	0	0
69																1	0	0
70																1	0	0
71																1	0	0
72																1	0	0
73																1	0	0
74																1	0	0
75																1	0	0
76																1	0	0

Figura 8. Distribuição dos perfis de genes KIR em pacientes com hanseníase e na população controle

As freqüências dos grupos NK1 e NK2 do ligante HLA-C foram similares entre todas as populações e subpopulações. As freqüências de NK2 foram 0,53 e 0,55 para controles e pacientes, respectivamente, sendo que as freqüências de NK1 são complementares.

Entretanto, a presença simultânea do ligante NK2 e seus receptores KIR2DL2 e KIR2DL3 foi mais freqüente em pacientes (33,7 %) do que em controles (20,3 %), com um valor de *p borderline* de 0,046 ($\chi^2 = 3,97$; OR=1,99; IC 95%= 1,00-3,97), significância que também foi perdida após a correção para múltiplos testes.

A taxa de prevalência da hanseníase se correlacionou positivamente com a frequência do gene *KIR2DL2* ($r= 0,73$; $p=0,04$) em populações asiáticas e africanas (Samoa, China, Vietnã, Tailândia, Índia, Coréia, Senegal e Oman) compiladas da literatura (WHO, 2004), como demonstrado na figura 9.

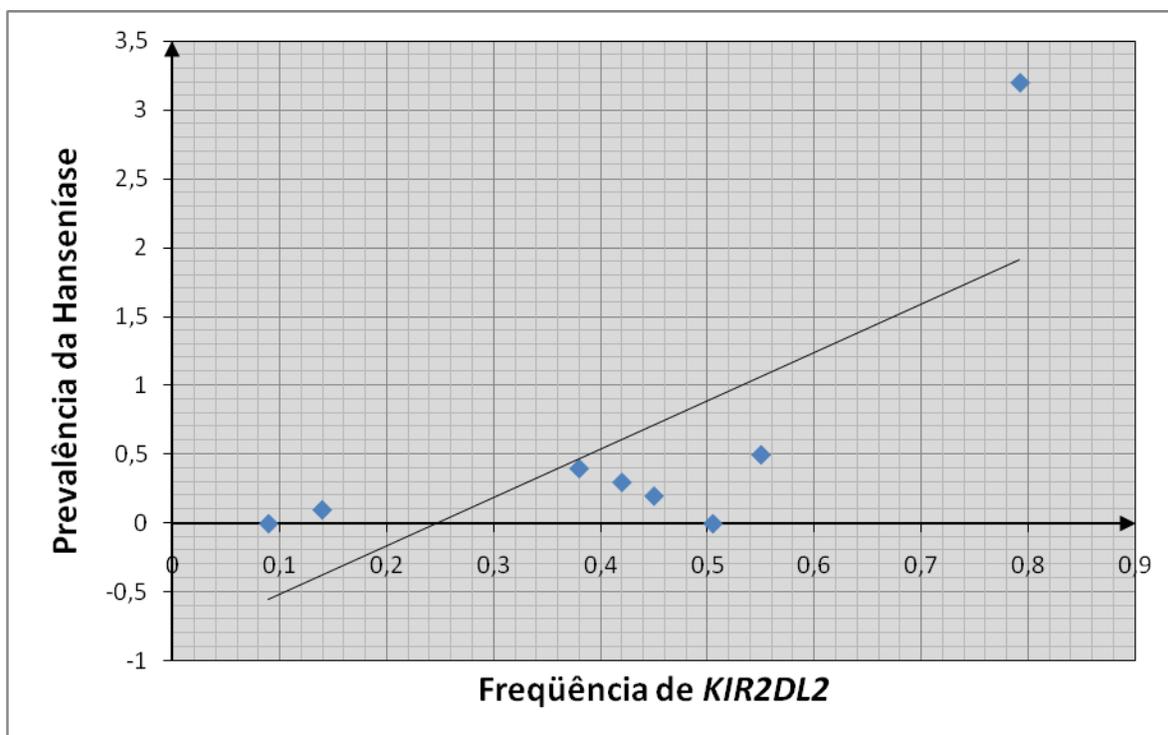
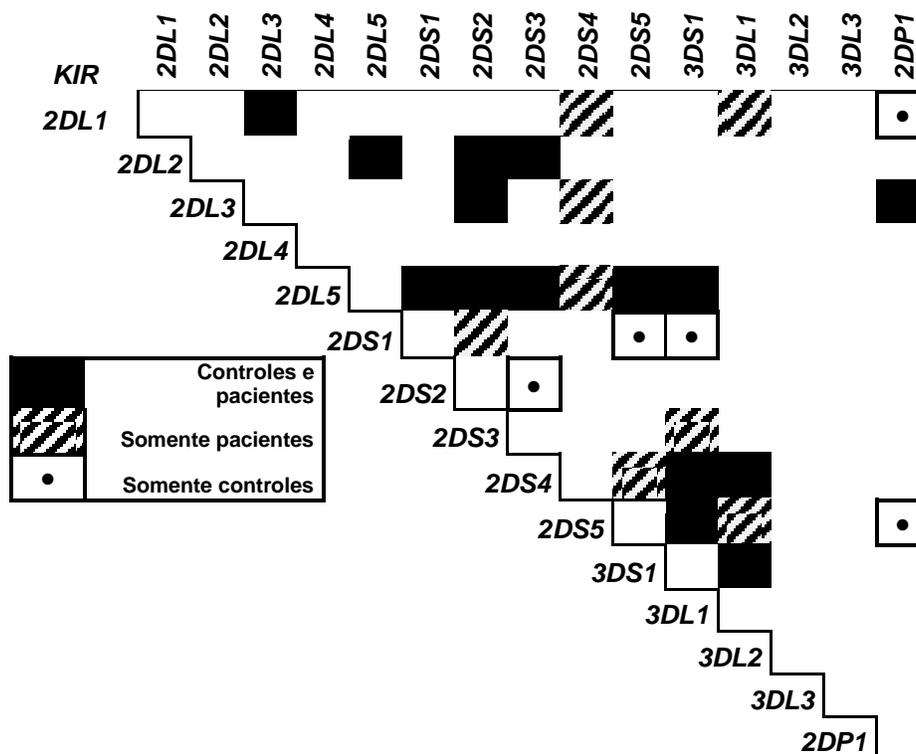


Figura 9. Correlação positiva entre a frequência do gene *KIR2DL2* e a taxa de prevalência da hanseníase.

Os pares de loci KIR em DL em pacientes, controles, e ambas as populações estão ilustrados na Figura 10.

Figura 10. Matriz de desequilíbrio de ligação (DL) entre os pares* de loci KIR..



*As células marcadas indicam valores de DL significantes ($p < 0,05$)

4 DISCUSSÃO

O gene *KIR2DS2* parece estar associado com a hanseníase, já que sua presença foi 15% maior em pacientes do que em controles. Esse gene foi ainda mais freqüente na subpopulação paucibacilar (60%) em relação à população controle (29%). Sendo *KIR2DS2* um receptor estimulatório, a atividade citotóxica das células NK seria estimulada nos pacientes com hanseníase. As células NK são importantes reguladoras da resposta imune, não só pelo ataque direto às células infectadas ou transformadas (citotoxicidade). Sua interação com células dendríticas e macrófagos pode regular a atividade dessa célula, influenciando a produção de citocinas de forma a favorecer uma resposta Th1 (Rajagopalan & Long, 2005), mais adequada para combater parasitas intracelulares, o que pode levar ao desenvolvimento da forma mais branda da doença (PB).

Embora a freqüência de *KIR2DS2* em controles pareça baixa (0,29) em comparação a outras populações do mundo, não é a mais baixa observada. A população controle é representativa da população de Belém, composta por descendentes europeus, africanos e ameríndios, com contribuições menores de populações asiáticas, e essa mistura étnica explicaria essa baixa freqüência.

A maior freqüência dos genes inibitórios *KIR2DL2* e *KIR2DL3* na presença do grupo NK2 de HLA-C em pacientes poderia sugerir que a atividade de NK seria inibida, favorecendo o desenvolvimento da doença. A correlação positiva entre *KIR2DL2* e a prevalência da hanseníase corrobora essa possível associação, já que, quanto maior a freqüência do receptor, maior a prevalência da hanseníase. Além disso, o gene *KIR2DL3* é associado com a tuberculose (Méndez

et al., 2006), uma doença causada por outra espécie de *Mycobacterium*, que pode, entre outros fatores, resultar da inibição da atividade citolítica de NK, já que *KIR2DL2* e *KIR2DL3* são importantes genes inibitórios.

O loci *KIR2DS2*, ao mesmo tempo que parece exercer uma proteção contra o desenvolvimento da forma mais grave da hanseníase, também se mostra associado à susceptibilidade de algumas doenças autoimunes, como a artrite psoriática (Nelson *et al.*, 2004), o diabetes do tipo I (Van der Slik *et al.*, 2003) e a esclerodermia (Momot *et al.*, 2004). Já os loci *KIR2DL2* e *KIR2DL3*, que parecem conferir susceptibilidade à hanseníase, também tem ações diferenciadas em outras doenças. *KIR2DL2* pode proteger contra a esclerodermia (Momot *et al.*, 2004), e predispor à leucemia (Verheyden *et al.*, 2004) e ao melanoma maligno (Naumova *et al.*, 2005), enquanto *KIR2DL3* predispõe à tuberculose (Méndez *et al.*, 2006) e ao melanoma maligno (Naumova *et al.*, 2005). O fato de um mesmo gene proteger contra uma doença infecciosa, e, simultaneamente, influenciar a susceptibilidade às doenças autoimunes, e vice-versa, pode sugerir que os genótipos que permitiram a sobrevivência às epidemias no passado foram sendo selecionados e passados às gerações seguintes, aumentando de frequência. No entanto, essa proteção contra às infecções parece ter como custo a predisposição à doenças autoimunes. Esta teoria foi proposta por Mobley (2004) e baseia-se em observações, como a proteção à tuberculose conferida por polimorfismos do gene *SLC11A1* (antigamente chamado *NRAMP1*: proteína 1 do macrófago associada à resistência natural), que predispões à artrite reumatóide (Runstadler *et al.*, 2005; Sanjeevi *et al.*, 2000)

É importante ressaltar que cada célula NK possui seu próprio repertório de KIR, onde a presença do gene não implica na sua expressão em todos os clones celulares. Além disso, há um processo de seleção, ainda não esclarecido, garantindo que cada célula NK possua pelo menos um receptor inibitório específico para uma molécula de HLA de classe I ((Rajagopalan & Long, 2005).

Enquanto a correção para múltiplos testes se mostra necessária em alguns casos, essa abordagem deve ser cuidadosamente analisada, pois é um procedimento conservativo e pode inflar o erro do tipo II em outras situações (Aickin & Gensler, 1996; Perneger, 1998; Perneger, 1999; Sterne & Smith, 2001; Nyholt, 2001; Whitley & Ball, 2002; Wacholder *et al.*, 2004). Embora haja controvérsias na atual discussão sobre quando e como usar a correção para múltiplos testes (Aickin & Gensler, 1996; Perneger, 1998; Perneger, 1999; Sterne & Smith, 2001; Nyholt, 2001; Boehringler *et al.*, 2000), há um consenso quanto à necessidade de independência dos testes (Perneger, 1998; Perneger, 1999; Nyholt, 2001; Wacholder *et al.*, 2004; Aickin, 1999). Assim, é importante ressaltar que os genes *KIR* estão fortemente ligados, numa região que compreende 150 kb, e estão sobre forte desequilíbrio de ligação (DL) (Carrington & Martin, 2006; Carrington & Norman, 2003). Como foi visto no presente trabalho, os genes *KIR* estão em forte LD, conseqüentemente, as associações observadas podem ser relevantes para esclarecer alguns aspectos da resposta imune à hanseníase, além de estimular futuras investigações, visando sempre a recuperação social dos pacientes e ajustes nos programas de controle e tratamento.

Estudos de associação do complexo de genes *KIR* podem demonstrar fatores prognósticos/preditivos importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas individualizadas para o paciente com hanseníase, além de elucidar a resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*.

5. CONCLUSÕES

A variabilidade genética dos genes *KIR* em pacientes mostrou-se similar à da população de Belém.

O uso cauteloso da correção para múltiplos testes permite a sugestão de uma tendência da ocorrência simultânea de *KIR2DL2* e *KIR2DL3* com o grupo de ligante NK2 a ser um fator de susceptibilidade à hanseníase.

A presença de *KIR2DS2* parece favorecer o desenvolvimento da hanseníase paucibacilar, permitindo uma melhor resposta imune do hospedeiro, em comparação à forma mais grave, multibacilar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. Citocinas. Em: **Imunologia Celular e Molecular**.

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. Elsevier, 2005. Rio de Janeiro. p251-282a.

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H.. Imunidade Inata. Em: **Imunologia Celular e**

Molecular. ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. Elsevier, 2005. Rio de Janeiro. p283-305b.

AICKING, M. Other method for adjustment of multiple testing exists. **British Medical Journal**, 318: 127-128, 1999.

AICKING, M., GENSLER, H. Adjusting for multiple testing whe reporting esearch results: the Bonferroni vs Holm Methods. **American Journal of Public Health**, 86: 726-728, 1996.

ALCAÏS, A., MIRA, M., CASANOVA, J.L., SCHURR, E., ABEL, L. Genetic dissection of immunity in leprosy. **Current Opinion in Immunology**, 17:44–48, 2005.

ARAÚJO, M.G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36(3):373-382, 2003.

ARTAVANIS-TSAKONAS, K et al. Activation of a subset of human NK cells upon contact with Plasmodium falciparum–infected erythrocytes. **Journal of Immunology** 34, 1673-1679, 2004.

AYRES, M., AYRES-JR, M., AYRES, D.L. BioEstat 5.0 Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá/Imprensa Oficial do Estado do Pará. Pará, 2007.

- BOEHRINGER S., EPPLEN, J.T., KRAWCZAK, M. Genetic association studies of bronchial asthma – a need for Bonferroni correction? **Human Genetics**, 107:197, 2000.
- BOTTINO, C., CASTRICONI, R., MORETTA, L., MORETTA, A. Cellular ligands of activating NK receptors. **Trends in Immunology** 26: 221-226, 2005.
- BOYTON, R.J., ALTMANN, D.M. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. **Clinical and Experimental Immunology**, 149:1-8, 2007.
- BRITTON, W.J., LOCKWOOD, D.N.J. Leprosy. **The Lancet**, 363:1209-1219, 2004.
- CARRINGTON, M., NORMAN, P. **The KIR Gene Cluster**. National Library of Medicine (US), NCBI; 2003. Disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mono_003.TOC&depth=2
Acesso em 12/11/06
- CARRINGTON, M., MARTIN, M.P. The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 298:225-257, 2006
- CASANOVA, J.L., ABEL, L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: The Human Model. **Annual Review of Immunology**, 20:581–620, 2002.
- CASANOVA, J.L., ABEL, L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. **Nature Reviews Immunology**, 4:55-66, 2004.
- COLUCCI, F., CALIGIURI, M.A., DI SANTO, J.P. What does it take to make a natural killer? **Nature Reviews Immunology**, 3:413-425, 2003.
- DE LA BARRERA, S.S., FINIASZ, M., FINK, S., ILARREGUI, J., ALEMÁN, M., OLIVARES, L., FRANCO, M. C., PIZZARIELLO, G., SASIAIN, M.C., NK cells

- modulate the cytotoxic activity generated by *Mycobacterium leprae* -hsp65 in leprosy patients: role of IL-18 and IL-13. **Clinical and Experimental Immunology**, 135 :105–113, 2004.
- DEGLI-ESPOSTI, M.A., SMYTH, M.J. Close encounters of different kinds; dendritic cells and NK cells take centre stage. **Nature Reviews Immunology**, 5:112-124, 2005.
- FOSS NT. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 74:113-119,1999.
- FROHN, C., SCHLENKE, P., EBEL, B., DANNENBERG, C., BEIN, G., KIRCHNER, H. DNA typing for natural killer cell inhibiting HLA-Cw groups NK1 and NK2 by PCR-SSP. **Journal of Immunological Methods**, 218:155-160, 1998.
- GALLO, M.E.N., JÚNIOR, L.A.N.R., ALBUQUERQUE, E.C.A., NERY, J.A.C., SALES, A.M. Alocação do paciente hanseniano na poliquimioterapia: correlação da classificação baseada no número de lesões cutâneas com os exames baciloscópicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, 78(4):415-424, jul./ago. 2003.
- GARRITY, GM., BOONE, DR., CASTENHOLZ, RW., Bergey's manual of systematic bacteriology. NEW YORK; LONDON, 2004, ED. SPRINGER
- GOULART, I.M.B., PENNA, G.O., CUNHA, G., Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 35(4): 365-375, 2002.
- HAGGE, D. A., RAY, N.A., KRAHENBUHL, J.L., ADAMS, L.B. An in vitro model for

- the lepromatous leprosy granuloma: fate of *Mycobacterium leprae* from target macrophages after interaction with normal and activated effector macrophages. **The Journal of Immunology**, 172:7771–7779, 2004.
- HASTINGS, R.C., GILLIS, T.P., KRAHENBUHL, J.L., FRANZBLAU, S.G. Leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, 1(3):330-348, 1988.
- HIBY, S.E., WALKER, J.J., O'SHAUGHNESSY, K.M., REDMAN, C.W.G., CARRINGTON, M., TROWSDALE, J., MOFFETT, A., Combinations of Maternal KIR and Fetal HLA-C Genes Influence the Risk of Preeclampsia and Reproductive Success. **The Journal of Experimental Medicine**, 200(8): 957–965, 2004.
- HSU, K.C., LIU, X.R., SELVAKUMAR, A., MICKELSON, E., O'REILLY, R.J., DUPONT, B. Killer Ig-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes, each with multiple subsets. **Journal of Immunology**, 169:5118-5129, 2002.
- IMBODEN, J.B., SEAMAN, W.E. Linfócitos T e células natural killer. Em: **Imunologia Médica**. Stites, D.P., Terr, A.I., Parslow, T.G. Guanabara Koogan, 2000. Rio de Janeiro.p101-112
- JANEWAY, C.A., TRAVERS, P., WALPORT, M., CAPRA, J.D. Innate immunity. Em: **Immunobiology**. Austin, P., Lawrence, E. (eds). Garland Publishing, New York, 2001.
- KHAKOO, S.I., THIO, C.L., MARTIN, M.P., BROOKS, C.R., GAO, X., ASTEMBORSKI, J., CHENG, J., GOEDERT, J.J., VLAHOV, D., HILGARTNER, M., COX, S., LITTLE, A.M., ALEXANDER, G.J., CRAMP, M.E., O'BRIEN, S.J., ROSENBERG, W.M.C., THOMAS, D.L., CARRINGTON, M.,

- HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving of hepatitis c virus infection. **Science**, 305, 872-874, 2004.
- LANIER, L.L. NK cell recognition. **Annual Review of Immunology**, 23:225–74, 2005.
- LÓPEZ-VÁZQUEZ, A., RODRIGO, L., MARTÍNEZ-BORRA, J., PÉREZ, R., RODRÍGUEZ, M., FDEZ-MORERA, J.L., FUENTES, D., RODRÍGUEZ-RODERO, S., GONZÁEZ, S., LÓPEZ-LARREA, C. Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. **The Journal of Infectious Diseases**, 192(1):162-5, 2005.
- MAEDA, Y., GIDOH, M., ISHII, N., MUKAI, C., MAKINO, M. Assessment of cell mediated immunogenicity of Mycobacterium leprae-derived antigens. **Cellular Immunology** 222:69–77, 2003.
- MARTIN, A.M., KULSKI, J.K., GAUDIERI, S., WITT, C.S., FREITAS, E.M., TROWSDALE, J., CHRISTIANSEN, F. T. Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. **Gene** 335,121–131, 2004.
- MARTIN, M.P., GAO, X., LEE, J.H., NELSON, G.W., DETELS, R., GOEDERT, J.J., BUCHBINDER, S., HOOTS, K., VLAHOV, D., TROWSDALE, J., WILSON, M., O'BRIEN, S.J., CARRINGTON, M. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS, **Nature Genetics**, 31:429-434, 2002.
- MÉNDEZ, A., GRANDA, H., MEENAGH, A., CONTRERAS, S., ZAVALETA, R.,

- MENDOZA, M.F., IZQUIERDO, L., SARMIENTO, M.E., ACOSTA, A., MIDDLETON, D. Study of KIR genes in tuberculosis patients. **Tissue antigens**, **68**:386-389, 2006.
- MILLER, S.A., DIKER, D.D., POLESKY, H.F. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic acid Research**, **16**:1215, 1988.
- MOBLEY, J.L. Is rheumatoid arthritis a consequence of natural selection for enhanced tuberculosis resistance? **Medical Hypotheses**, **62**: 839–843, 2004.
- MOMOT, T., KOCH, S., HUNZELMANN, N., KRIEG, T., ULBRICHT, K., SCHMIDT, R.E., WITTE, T. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. **Arthritis and Rheumatism**, **50**(5):1561-5, 2004.
- MORETTA, L., MORETTA, A. Killer immunoglobulin-like receptors. **Immunology**, **16**:626–633, 2004.
- NAUMOVA, E., MIHAYLOVA, A., STOITCHKOV, K., IVANOVA, M., QUIN, L., TONEVA, M. Genetic polymorphism of NK receptors and their ligands in melanoma patients: prevalence of inhibitory over activating signals. **Cancer Immunology Immunotherapy**, **54**(2):172-178, 2005.
- NELSON, G.W., MARTIN, M.P., GLADMAN, D., WADE, J., TROWSDALE, J., CARRINGTON, M. Cutting edge: Heterozygote advantage in Autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-Like receptor combinations in psoriatic arthritis. **Journal of Immunology**, **173**, 4273-4276, 2004..
- NYHOLT, D.R. Genetic case-control association studies – correction for multiple testing. **Human Genetics**, **109**:564-565, 2001.

- OPPENHEIM, J.J., RUSCETTI, F.W. Citocinas. Em: **Imunologia Médica**. Stites, D.P., Terr, A.I., Parslow, T.G. Guanabara Koogan, 2000. Rio de Janeiro. p113-129
- PARHAM, P. MHC Class I molecules and KIRs in human history, health and survival. **Nature Reviews**, 5:201-214, 2005.
- PARHAM, P., MCQUEEN, K.L. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. **Nature Reviews Immunology**, 3(2):108-122, 2003.
- PERNEGER, T.V. What's wrong with Bonferroni adjustments. **British Medical Journal**, 316: 1236-1238, 1988.
- PERNEGER, T.V. Adjusting for multiple testing in studies is less important than other concerns. **British Medical Journal**, 318: 1288, 1999.
- RAJAGOPALAN, S., LONG, E.O. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. **The Journal of Experimental Medicine**, 4;201(7):1025-9, 2005.
- RIDLEY, D.S., JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. **International Journal of Leprosy**. 34:255-273, 1966.
- RINALDI, A. The global campaign to eliminate leprosy. **Public Library of Science Medicine**, 2(12):341, 2005.
- RUNSTADLER, J.A., SÄILÄ, H., SAVOLAINEN, A., LEIRISALO-REPO, M., AHO, K., TUOMILEHTO-WOLF, E., TUOMILEHTO, J., SELDIN, M.F. Association of *SLC11A1* (*NRAMP1*) With Persistent Oligoarticular and Polyarticular Rheumatoid Factor–Negative Juvenile Idiopathic Arthritis in Finnish Patients. **Arthritis & Rheumatism**, 52(1): 247–256, 2005.

- SANJEEVI, C. B., MILLER, E. N., DABADGHAO, P., RUMBA, I., SHTAUVERE, A., DENISOVA, A., CLAYTON, D., BLACKWELL, J. M. Polymorphism at *NRAMP1* and *D2S1471* loci associated with juvenile rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, 43(6): 1397–1404, 2000.
- SCOLLARD, D.M., ADAMS, L.B., GILLIS, T.P., KRAHENBUHL, J.L., TRUMAN, R.W., WILLIAMS, D.L. The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**. 19(2): 338-381, 2006.
- SHAM, P.C., CURTIS, D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. **Annals of Human Genetics**, 59: 97-105, 1995.
- STERNE, J.A.C., SMITH, G.D. Sifting the evidence – what’s wrong with significance tests? **British Medical Journal**, 322: 226-231, 2001.
- TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. Doenças Microbianas do Sistema Nervoso. Em: Microbiologia Médica, São Paulo, 8ª edição, Editora Artmed, 2005, p615-635.
- UHRBERG, M. The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. **European Journal of Immunology**, 35:1-6, 2005.
- VAN DER SLIK, A.R., ALIZADEH, B.Z., KOELEMAN, B.P., ROEP, B.O., GIPHART, M.J. Modelling KIR-HLA genotype disparities in type 1 diabetes. **Tissue Antigens**, 69(1):101-105, 2007.
- VAN DER SLIK AR, KOELEMAN BP, VERDUIJN W, BRUINING GJ, ROEP BO, GIPHART MJ. KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. **Diabetes**, 52(10):2639-2642, 2003.

- VARLA-LEFTHERIOTI, M., SPYROPOULOU-VLACHOU, M., KERAMITSOGLOU, M., PAPADIMITROPOULOS, M., TSEKOURA, C., GRAPHOU, O., PAPADOPOULOU, C., GERONDI, M., STAVROPOULOS-GIOKAS, C. Lack of the appropriate natural killer cell inhibitory receptors in women with spontaneous abortion. **Human Immunology**, 66 (1):65-71, 2005.
- VERHEYDEN, S., BERNIER, M., DEMANET, C. Identification of natural killer cell phenotypes associated with leukemia. **Leukemia** 18:2002-2007, 2004.
- VERHEYDEN, S., DEMANET, C. Susceptibility to myeloid and lymphoid leukemia is mediated by distinct inhibitory KIR-HLA ligand interactions. **Leukemia**, 20(8):1437-8, 2006.
- VISSCHEDIJK, J., VAN DE BROEK, J., EGGENS, H., LEVER, P., VAN BEERS, S., KLASTER, P. Mycobacterium leprae – millennium resistant! Leprosy control on the threshold of a new era. **Tropical Medicine and International Health** 5:388-399, 2000.
- WACHOLDER, S., CHANOCK, S., GARCIA-CLOSAS, M., EL GHORMLI, L., ROTHMAN, N. Assessing the probability that a positive report is false: an approach for molecular epidemiology studies. **Journal of the National Cancer Institute**, 96: 434-442, 2004.
- WHITLEY, E., BALL, J. Statistics review 3: hypothesis testing and p values. **Critical Care**, 6:222-225, 2002.
- WHO Expert Committee on Leprosy. **WHO Technical Report Series** nr. 874, World Health Organization. Geneva, 1998.
- WHO A guide to eliminate leprosy as a public health problem. **World Health Organization**; Geneva, 2000

- WHO Leprosy Elimination Project - Status Report 2003; **World Health Organization**, Geneva 2004. Disponível em <http://www.who.int/lep>
- WHO Global Leprosy Situation. Weekly epidemiological Record. **World Health Organization**, vol 81, 32, p309-316, 2006.
- WILSON, M.J., TORKAR, M., HAUDE, A., MILNE, S., JONES, T., SHEER, D., BECK, S., TROWSDALE, J. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, 97:4778, 2000
- WILLIAMS, A.P., BATEMAN, A.R., KHAKOO, S.I. KIR and their role in disease. **Molecular Interventions**, 5(4):226-240, 2005.
- WITT, C.S., DEWING, C., SAYER, D.C., UHRBERG, M., PARHAM, P., CHRISTIANSEN, F.T. Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. **Transplantation**, 68:1784, 1999
- YEN, J.H., MOORE, B.E., NAKAJIMA, T., SCHOLL, D., SCHAID, D.J., WEYAND, C.M., GORONZY, J.J. Major Histocompatibility Complex Class I-recognizing Receptors Are Disease Risk Genes in Rheumatoid Arthritis. **The Journal of Experimental Medicine**, 193(10):1159–1167, 2001.

Termo de Consentimento Livre e esclarecido

Você esta sendo convidado para participar de uma pesquisa que está ligada ao projeto: “Associação de polimorfismos de genes KIR e seus grupos de ligantes com a hanseníase e suas formas polares”.

O objetivo desse estudo é fazer uma identificação, através do DNA, de fatores genéticos que possam aumentar o risco de se contrair a hanseníase, bem como com a evolução da doença para um dos tipos possíveis, ou para a forma intermediária.

Os avanços na área de saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. Com esse estudo, alguns aspectos da hanseníase que ainda não são bem entendidos, podem ser esclarecidos.

Caso você participe, será necessária uma coleta de 5 mL do seu sangue, para podermos obter o DNA. O sangue será coletado da veia, do mesmo jeito de uma coleta para exames de sangue de rotina, não oferecendo risco para sua saúde.

Sua participação não é obrigatória. Você poderá se retirar da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento, nem na relação com os pesquisadores ou com a instituição envolvida. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. A publicação dos resultados será feita sem que seus dados pessoais sejam divulgados. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo.

Você receberá uma cópia deste termo, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação a qualquer momento.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa, cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, ___/___/_____

Assinatura do sujeito da pesquisa
ou do responsável

Assinatura do pesquisador responsável
Nome:
End:
Fone:
Reg. Conselho: