

MÁRCIO MARQUES DE MORAES

GENOTIPAGEM DO REPERTÓRIO *KIR* E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES
KIR (*KIR2DS2* E *KIR2DS4*) E SUA INTERAÇÃO COM A VARIAÇÃO GENÉTICA
DO GENE *HLA-C* EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS COM E SEM
EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO AGUDA PÓS-TRANPLANTE

CURITIBA

2011

MÁRCIO MARQUES DE MORAES

GENOTIPAGEM DO REPERTÓRIO *KIR* E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *KIR* (*KIR2DS2* E *KIR2DS4*) E SUA INTERAÇÃO COM A VARIAÇÃO GENÉTICA DO GENE *HLA-C* EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS COM E SEM EPISÓDIOS DE REJEIÇÃO AGUDA PÓS-TRANPLANTE

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Bicalho

CURITIBA

2011

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Moraes, Márcio Marques de

Genotipagem do repertório *KIR* e análise da expressão dos genes *KIR* (*KIR2DS2* e *KIR2DS4*) e sua interação com a variação genética do gene *HLA-C* em pacientes transplantados renais com e sem episódios de rejeição aguda pós-tranplante. / Márcio Marques de Moraes. – Curitiba, 2012.

122 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Maria da Graça Bicalho

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Células killer 2. Rins – Transplante I. Título II. Bicalho, Maria da Graça III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 575.1

PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de tese de Doutorado a qual se submeteu **MARCIO MARQUES MORAES**, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.


Curitiba, 28 de março de 2011



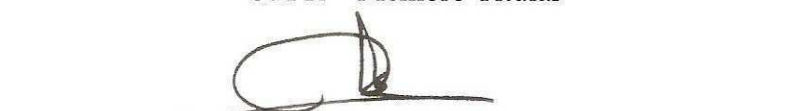
Professor Doutor Ricardo Alberto Moliterno
UEM – Membro Titular




Professora Doutora Eni Picchioni Bompeixe
UFPR – Membro Titular



Professora Doutora Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro
UFPR – Membro Titular



Professora Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
UFPR – Membro Titular



Professora Doutora Maria da Graça Bicalho
UFPR – Orientadora e Presidente da banca

Visto



Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Vice-Coordenador do Programa de Pós Graduação em Genética

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, à minha orientadora Prof^a Dr^a Maria da Graça Bicalho. Por acreditar em minha dedicação e força de vontade, além de me oferecer o caminho para uma carreira científica através de ensinamentos e oportunidades.

À minha Família:

Aos meus pais, Leonardo e Suzete, pelo amor incondicional e alegria em todos os momentos da minha vida. Mesmo que tais momentos não sejam pronunciados verbalmente, sei que muito mais do que palavras, valem as ações. É pra eles que dedico este trabalho.

Aos meus Irmãos, Daniel e Fábio, por todos os momentos felizes e alegres em nossa convivência. À Fernanda, mãe de uma menininha linda que é minha sobrinha, a Lara, e por agüentar meu Irmão =]. E ao grande amor da minha vida, que me apoiou sempre, me agüentou sempre e que é uma das pessoas mais fantásticas que eu conheço, Giovana.

A todos os meus amigos do LIGH, que desde o começo me acolheram, pelos muitos momentos de diversão e pelos ensinamentos, sejam eles técnicos ou de experiência de vida. Onde todos de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Aos queridos amigos do LCHO, que me receberam com muito carinho em seu laboratório e proporcionaram muitas alegrias, sejam estas científicas ou resultantes das festas!

Aos meus eternos amigos de Pós-Graduação, Marcos e Sarah, Gustavo e Rodrigo, pela amizade verdadeira, respeito e por ter tornado estes anos de estudos uma alegria infinita. Aos Pais do Newton, Benn e Lupe, pessoas extraordinárias que auxiliaram infinitamente no meu desenvolvimento pessoal e científico. Ao eterno mestre Elias Karam, por todo seu apreço, alegrias e exemplo de dedicação e vocação de ensinar. Aos muitos amigos que fiz neste Departamento de Genética, que não enumerei aqui pois precisaria de mais uma tese para fazê-lo.

A todos os Professores do Departamento de Genética, por compartilhar de sua sabedoria e por semear a ética e a consciência científica. Um agradecimento especial aos Professores: Prof^a. Dra. Eni Picchioni Bompeixe, Prof^a. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, Prof. Dr. Ricardo Alberto Moliterno, e Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza pelas sugestões que muito colaboraram e continuarão contribuindo à realização do presente trabalho.

A Dr^a Fabiana Loss de Carvalho Contieri e ao Dr. Ricardo Benvenuti, juntamente com sua equipe do Hospital Evangélico de Curitiba e da Casa de Apoio ao transplantado renal, pela imensa colaboração e pela disponibilização de amostras e dados referentes aos pacientes renais e seus doadores.

Obrigado a TODOS que fazem parte dessa minha família!



PhD Comics (http://www.phdcomics.com/store/mojostore.php?_view&ProductID=17370)

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE GRÁFICOS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS NO BRASIL	3
2.1.1. Transplante Renal	6
2.2. O MHC HUMANO	8
2.3. CÉLULAS <i>NATURAL KILLER</i>	11
2.3.1. Hipótese do “ <i>Missing-Self</i> ” (Perda do Próprio)	12
2.3.2. Receptores de células NK que reconhecem ligantes MHC de classe I.....	16
2.4. RECEPTORES KIR	17
2.4.1. Estrutura das Proteínas KIR	17
2.4.2. Genes <i>KIR</i>	21
2.4.2.1. Nomenclatura dos Genes <i>KIR</i>	24
2.4.2.2. Estrutura Gênica e Variabilidade Alélica	26
2.4.2.3. Organização Gênica e Diversidade Haplotípica	29
2.4.2.4. Controle da Expressão Gênica	32
2.4.2.5. Genes <i>KIR</i> e Transplante	33
2.5. A PROTEÍNA <i>HLA-C</i>	36
2.5.1. Genes <i>HLA-C</i>	36
2.5.2. Nomenclatura dos genes <i>HLA-C</i>	37
2.5.3. <i>HLA-C</i> e transplante	38

2.6. INTERAÇÕES ENTRE RECEPTORES KIR E SEUS LIGANTES HLA DE CLASSE I	39
2.6.1. Estrutura dos complexos KIR2D/HLA-C	41
3. OBJETIVOS	45
4. JUSTIFICATIVA	46
5. MATERIAL E MÉTODOS	47
5.1. Caracterização da Amostra	47
5.2. Coleta de amostras de sangue	48
5.2.1. Obtenção das Amostras	48
5.3. Extração do DNA Genômico e RNA total	50
5.4. Concentrações de DNA e RNA Total	50
5.5. Genotipagem dos <i>KIR</i> através da técnica de PCR-SSOP	51
5.6. Genotipagem do gene <i>HLA-C</i> através do seqüenciamento e de PCR-SSP	53
5.7. Análise da Expressão dos Genes <i>KIR</i>	54
5.7.1. Transcrição Reversa do RNA Total	54
5.7.2. Quantificação Relativa dos genes <i>KIR2DS2</i> e <i>KIR2DS4</i> por PCR Tempo Real (qRT-PCR)	55
5.7.2.1. Iniciadores E Reação qRT-PCR	56
5.7.3. Validação da qPCR	59
5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
6. RESULTADOS	64
6.1. Análise da presença dos locos <i>KIR</i>	64
6.2. Análise da Expressão Gênica de <i>KIR2DS2</i> e <i>KIR2DS4</i>	84
7. DISCUSSÃO	90
7.1. Frequências dos genes <i>KIR</i> e a Incompatibilidade KIR-Ligante	90
7.2. Expressão dos genes <i>KIR2DS2</i> e <i>KIR2DS4</i>	94
8. CONCLUSÕES	98
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
ANEXO I – TABELA DE SINÔNIMOS DOS LOCOS KIR	108

ANEXO II – DESCRIÇÃO DA METODOLOGIA	110
---	-----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Alorreconhecimento de aloantígenos	5
FIGURA 2 – Localização e estrutura do MHC humano	9
FIGURA 3 – Estrutura das moléculas MHC de classe I e de classe II	10
FIGURA 4 – Hipótese do “ <i>Missing-Self</i> ” revisada	13
FIGURA 5 – Ajuste da Função Efetora das Células NK	14
FIGURA 6 – Receptores das Células NK com ligantes MHC I	16
FIGURA 7 – Receptores KIR ativadores e inibidores das células NK	18
FIGURA 8 – Características estruturais dos receptores KIR (ativadores e inibidores) das células NK	19
FIGURA 9 – Região cromossômica do <i>LRC</i> e dos <i>KIR</i>	22
FIGURA 10 – Nomenclatura dos genes <i>KIR</i>	25
FIGURA 11 – Estrutura gênica dos genes <i>KIR</i>	27
FIGURA 12 – Representação dos haplótipos A e B	31
FIGURA 13 – Diversidade do grupo haplotípico B	32
FIGURA 14 – Número de alelos HLA-C conhecidos até Agosto de 2007	37
FIGURA 15 – Nomenclatura dos genes HLA-C	38
FIGURA 16 – Estrutura da região extracelular da molécula KIR2D	41
FIGURA 17 – Interação molecular entre as proteínas KIR2D e HLA de classe I específicos	43
FIGURA 18 – Teste de Estabilidade dos genes referência GAPDH e HPRT1	57
FIGURA 19 – Diluição seriada para produção da curva padrão de um gene alvo	59
FIGURA 20 – Curva padrão para o gene de referência GAPDH	60
FIGURA 21 – Comparação entre as curvas padrão dos genes referência e os genes alvo	61
FIGURA 22 – ΔCq entre os genes referência e genes alvo	61
FIGURA 23 – Perfil da expressão do <i>KIR2DS2</i> nos Pacientes	84
FIGURA 24 – Perfil da expressão do <i>KIR2DS4</i> nos Pacientes	85
FIGURA 25 – Perfil de expressão dos <i>KIR2DS2</i> e <i>KIR2DS4</i> em Pacientes Pré-Transplante e seus Doadores	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Número de transplantes de órgãos realizados no Brasil (2003-2010)	4
TABELA 2 – Características das moléculas HLA de classe I e II	9
TABELA 3 – Receptores KIR e seus ligantes HLA-C	41
TABELA 4 – Conversão sorológica das tipagens moleculares de <i>HLA-C</i>	42
TABELA 5 – Características funcionais e estruturais dos receptores KIR	44
TABELA 6 – Caracterização da Amostra	48
TABELA 7 – Distribuição das amostras de RNA entre pacientes e seus doadores	49
TABELA 8 – Condições de Amplificação da PCR-SSOP	52
TABELA 9 – Condições de amplificação para realização da PCR-SSP para tipagem <i>HLA-C</i>	54
TABELA 10 - Parâmetros da Reação de Transcrição Reversa do RNA	55
TABELA 11 – Oligonucleotídeos iniciadores para os genes referência (<i>GAPDH</i> e <i>HPRT1</i>) e alvos (<i>KIR2DS2</i> e <i>KIR2DS4</i>)	56
TABELA 12 – Volumes dos componentes da reação de qPCR	58
TABELA 13. Condições de amplificação da qPCR	58
TABELA 14. Valores de Slope, Interseção do eixo Y, eficiência e R ² das curvas padrão	60
TABELA 15 – Frequência dos genes KIR (Portadores e Gênicas) em Receptores e Doadores Renais	66
TABELA 16 – Comparação das frequências dos portadores dos genes <i>KIR</i> em Receptores e Doadores Renais com e sem Rejeição Aguda	69
TABELA 17 – Comparação das frequências de portadores (loco a loco) entre os Receptores e com e sem Rejeição	70
TABELA 18 – Número de indivíduos com identidade dos genes <i>KIR</i> entre Receptores e seus Doadores com diferentes graus de <i>Mismatches</i>	74
TABELA 19 – Comparação entre as médias do número de Genes inibidores, ativadores e total entre Receptores e Doadores	75
TABELA 20 – Comparação entre Receptores e Doadores com e sem rejeição para os grupos ligantes C1 e C2	79
TABELA 21 – Distribuição das compatibilidades e incompatibilidades KIR-Ligante entre os grupos Receptores com (RECP) e sem (RECC) rejeição	82
TABELA 22 – Análise comparativa entre os grupos Receptores com (RECP) e sem (RECC) rejeição para as compatibilidades e incompatibilidades KIR-Ligante	83
TABELA 23 – Comparação das médias de RQ entre amostras Pré Transplante (Pré-tx) e Doadores	86
TABELA 24 – Análise da Variância entre os tratamentos Pré-transplante, Imunossupressão, Rejeição Hiperaguda, Rejeição guda e 30 dias após o Transplante	87
TABELA 25 – Comparação entre as médias de RQ de amostras pareadas Pré-Transplante vs	88

Tratamentos	
TABELA 26 – Comparação entre as médias de RQ de todos os Tratamentos	89

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – A) Frequência dos genes KIR entre os Receptores e Doadores com e sem rejeição aguda. B) Frequência dos genes KIR em Doadores em que a dupla apresentou ou não rejeição. C) Frequência dos genes KIR em Receptores renais com e sem rejeição	71
GRÁFICO 2 – Perfil da compatibilidade HLA entre Receptores e Doadores considerando-se o número médio de Mismatches para os locos HLA-A, HLA-B, HLA-DR e HLA-C ..	72
GRÁFICO 3 – Representação das médias da presença dos genes KIR em Receptores e Doadores	76
GRÁFICO 4 – Distribuição do número de locos inibidores KIR entre Receptores com e sem rejeição	77
GRÁFICO 5 – Distribuição do número de locos ativadores KIR entre Receptores com e sem rejeição	77
GRÁFICO 6 – Comparação do número de indivíduos entre Receptores com e sem rejeição para diferentes razões entre o número de receptores KIR inibidores e ativadores	78
GRÁFICO 7 – Comparação entre Receptores com e sem rejeição com diferentes números de genes KIR inibidores apresentando ligantes	80
GRÁFICO 8 – Comparação entre Receptores com e sem rejeição com diferentes números de genes KIR ativadores apresentando ligantes	80

LISTA DE ABREVIATURAS

Células NK	- células <i>Natural Killer</i> ;
KIR	- <i>Killer-cell Ig-like Receptors</i> ou Receptores semelhantes à Imunoglobulina das Células <i>Natural Killer</i> ;
MHC	- <i>Major Histocompatibility Complex</i> ou Complexo Principal de Histocompatibilidade;
HLA	- <i>Human Leukocyte Antigen</i> ou Antígeno Leucocitário Humano;
ABTO	- Associação Brasileira de Transplante de Órgãos;
TCR	- <i>T cell Receptor</i> ou Receptor das Células T;
APC ou CAA	- <i>Antigen-presenting Cells</i> ou Células Apresentadoras de Antígenos;
Ig	- Imunoglobulina
LILR	- <i>Leukocyte Ig-like Receptors</i> ou Receptores semelhantes à Ig Leucocitários;
LRC	- <i>Leukocyte Receptor Complex</i> ou Complexo de Receptores Leucocitários;
ITIM	- Imunoreceptor com Motivo Inibidor baseado em Tirosina;
ITAM	- Imunoreceptor com Motivo Ativador baseado em Tirosina;
KARAP	- <i>Killer Cell Activating Receptor Associated Protein</i> ou Proteína Associada ao Receptor Ativador de Células NK;
ILT	- <i>Ig-like transcripts</i> ou Transcritos semelhantes à Ig
LENG	- <i>LRC Encoded Novel Gene</i> ou Novo gene LRC
NKC	- <i>Natural Killer Complex</i> ou Complexo <i>Natural Killer</i> ;
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> ou Reação em Cadeia da Polimerase;
SSP	- <i>Single Sequence Primer</i> ou Iniciador de Seqüência Específica;
SSOP	- <i>Sequence Specific Oligonucleotide Probe</i> ou Sonda Oligonucleotídica de Seqüência Específica;
qPCR	- PCR quantitativo;
cDNA	- DNA complementar;
Cq	- Ciclo de quantificação;
RQ	- Quantidade Relativa;
GAPDH	- <i>Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase</i> ;
HPRT1	- Hipoxantina Fosforibosiltransferase 1;
MM	- <i>Mismatches</i> (Incompatibilidades)

RESUMO

As principais dificuldades para o sucesso do transplante renal são as variações sobre a aceitação ao rim transplantado e sua taxa de sobrevivência. Um mecanismo amplamente estudado é o papel dos genes do sistema imune durante este processo, por exemplo o envolvimento das células NK e seus receptores KIR (do inglês Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor) devido à sua importância na modulação da resposta destas células contra células alvo. Evidências experimentais demonstraram a infiltração de células NK em rins transplantados e sua atividade aumentada após o transplante. A citotoxicidade das células NK é mediada pela interação entre os receptores de superfície (por exemplo, KIR) e moléculas de HLA de classe I nas células alvo (por exemplo, HLA-C). De acordo com a hipótese "*Missing-Self*", a ausência de ligantes específicos de HLA de classe I, na célula alvo, para KIR inibidores poderia levar a aloreatividade das células NK do paciente contra as células do órgão transplantado. Esta ausência do ligante específico é chamada de, em vários estudos, incompatibilidade KIR-ligante. Foram analisados a presença de 16 genes *KIR* (através de PCR-SSOP metodologia) e a genotipagem do gene HLA-C (por seqüenciamento e PCR-SSP) em 110 pacientes transplantados renais (57 com a rejeição aguda (RA)) e seus doadores. Além disso, analisamos a influência de três fatores na ocorrência de episódios de rejeição aguda: 1) a identidade *KIR* (quando o locus está presente em ambos, paciente e seu doador) para 5 loci *KIR* (*KIR2DL1*, *KIR2DL2* e *KIR2DL3*, KIR inibidores; *KIR2DS1* e *KIR2DS2*, KIR ativadores), 2) a incompatibilidade KIR-ligante e 3) a expressão de *KIR2DS2* e *KIR2DS4* em 19 pacientes e 14 doadores (por qRT-PCR). A comparação locus a locus mostrou, para três genes *KIR*, que a presença destes foi estatisticamente diferente entre os pacientes com AR e aqueles sem (*KIR2DL1*, $p = 0,01$; OR = 4,01; IC 95% = 1,44-11,17; *KIR2DS4*, $p = 0,02$; OR = 0,10; IC 95% = 0,01 - 0,89 e *KIR2DS5*, $p = 0,02$; OR = 3,03; IC 95% = 1,15-8,41). Entretanto, quando divididos de acordo com as *mismatches HLA* (MM) em três grupos (0-2MM, 3MM e 4-6MM) essas diferenças não foram observadas, observou-se apenas uma tendência à significância para o gene *KIR2DL1* (0-2MM $p = 0,09$; e 3 MM $p = 0,08$). A análise da expressão de *KIR2DS2* e *KIR2DS4* não mostrou diferenças significativas entre amostras anteriores e pós-transplante (durante imunossupressão, episódio de rejeição aguda, e 30 dias após o transplante). A análise de frequências gênicas, identidades dos genes, o perfil ativador e inibidor, e além da análise da expressão, sugerem que a citotoxicidade do *Natural Killers*, durante a rejeição aguda no transplante renal, pode envolver todos os genes *KIR* e sua interação com todos os seus ligantes, mesmo outras moléculas HLA (por exemplo: HLA-A e HLA-B), e também outros receptores NK.

ABSTRACT

The main difficulties to renal transplantation are variations on the transplanted kidney acceptance and its survival rate. One of the mechanisms widely studied is the role of immune system genes during this process, for example *KIR* genes (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors) because of its importance in the modulation on the response of Natural Killer cells against target cells. Experimental evidence has demonstrated the NK cells infiltration in transplanted organs and its increased activity after the transplantation. The NK cells cytotoxicity is mediated by the interaction between surface receptors (e.g. *KIR*) and HLA class I molecules on target cells (e.g. HLA-C). According to the hypothesis called "Missing-Self", the lack of specific HLA class I ligands, on target cell, to inhibitory *KIR* could lead to NK cells alloreactivity from patient against cells from the transplanted organ. This specific ligand lack is called, in several studies, *KIR*-ligand incompatibility. We analyzed the presence of 16 *KIR* genes (through PCR-SSOP methodology) and HLA-C genotyping (by sequencing and PCR-SSP) in 110 kidney transplanted patients (57 with acute rejection (AR)) and its donors. Also, we analyzed the influence of three factors on the occurrence of acute rejection episodes: 1) the *KIR* identity (when the locus is present in both patient and his donor) for 5 *KIR* loci (*KIR2DL1*, *KIR2DL2* and *KIR2DL3*, inhibitory *KIRs*; *KIR2DS1* and *KIR2DS2*, activatory *KIRs*), 2) the *KIR*-ligand incompatibility and 3) the expression of *KIR2DS2* and *KIR2DS4* in 19 patients and 14 donors (by qRT-PCR). The locus-by-locus comparison showed, for three *KIR* genes, that their presence were statistically different between patients with AR and those without it (*KIR2DL1*, $p = 0,01$; OR = 4,01; IC 95% = 1,44-11,17; *KIR2DS4*, $p = 0,02$; OR = 0,10; IC 95% = 0,01 – 0,89 and *KIR2DS5*, $p = 0,02$; OR = 3,03; IC 95% = 1,15-8,41). Although, when we divided according to *HLA* mismatches (MM) in three groups (0-2MM, 3MM and 4-6MM) those differences were not observed; we only observed a tendency in *KIR2DL1* gene (0-2MM $p = 0,09$; and 3 MM $p = 0,08$). The expression analysis for *KIR2DS2* and *KIR2DS4* has not showed significant differences between before and after the transplantation (during immunosuppression, acute rejection episode and 30 days after transplantation). The analysis of gene frequencies, gene identities, activatory and inhibitory profile, and expression, suggest that the cytotoxicity of Natural Killers, during the acute rejection in kidney transplantation, can involve the *KIR* genes and its interaction with all their ligands, even others *HLA* (for example: *HLA-A* and *HLA-B*), and also others NK receptors.

1. INTRODUÇÃO

Transplante é o processo de coletar células, tecidos ou órgãos de um indivíduo, transferindo este material (enxerto) para outro local do mesmo indivíduo (transplante autólogo) ou para um indivíduo diferente da mesma espécie (transplante alogênico). Na prática clínica, o transplante é utilizado com a finalidade de tentar superar uma deficiência funcional ou anatômica do paciente. Como todo alotransplante, o sucesso deste ou a “pega do enxerto” depende, entre outros fatores, da prevenção da rejeição do órgão por parte do sistema imune do receptor, ao reconhecer aloantígenos presentes no tecido transplantado. Esse aloreconhecimento, é comumente implementado por células T e se constitui no principal obstáculo para um transplante bem sucedido. Embora a rejeição seja um processo dependente de células T, a destruição do aloenxerto resulta de uma ampla distribuição de mecanismos efetores. Um destes mecanismos, ainda pouco estudado, é a atividade aumentada das células *Natural Killer* (NK) logo após o transplante apesar de forte imunossupressão, sugerindo que a citotoxicidade mediada por células NK do receptor contra células do doador possa ser um componente adicional previamente não reconhecido do processo de rejeição. Em humanos, o aumento do número de células NK circulantes, foi observado, durante a rejeição aguda de aloenxertos renais (COOKSEY et al., 1984), além da infiltração destas células em órgãos como coração (MARBOE et al., 1983) e rim (HANCOCK et al., 1985; TOTTERMAN et al., 1989) após o transplante. A atividade citolítica das células NK humanas é regulada pela interação de receptores de membrana ativadores e inibidores, expressos em sua membrana celular, com epítomos presentes em células alvo, como por exemplo, aqueles presente nas moléculas HLA (Antígenos Leucocitários Humanos) de classe I expressas por células hospedeiras (MIDDLETON et al., 2005). Isto conduziu à hipótese do “missing-self”, que postula que as células NK, durante o processo da imunovigilância reconhecem e eliminam as células que não expressam moléculas próprias do MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) (MIDDLETON et al., 2005). Dentre as famílias gênicas

que codificam receptores de células NK optou-se no presente trabalho em estudar as relações entre os Receptores semelhantes à Imunoglobulina das células *Natural Killer* (KIR do inglês, *Killer-cell Ig-like Receptors*) com a variação genética de seu ligante HLA-C em pacientes transplantados renais e sua possível influência no prognóstico e na sobrevida do aloenxerto em pacientes renais. Uma melhor compreensão dos mecanismos associados à aceitação/rejeição do alo-enxerto, relacionado a atividade das células NK e repertório KIR doador/receptor e a interação destes com seus ligantes, poderá contribuir para o aumento da sobrevida do enxerto. Cirocco e colaboradores (2007) observaram que a taxa de sobrevida do enxerto renal foi menor entre pares de receptores-doadores onde ambos não possuem os genes *KIR2DS2* e *KIR2DL2*, mesmo o par sendo HLA-idêntico (CIROCCO, et al. 2007). No entanto, são ainda poucos os estudos que investigam as relações entre receptores KIR e aceitação de aloenxertos renais.

2. REVISÃO BILIOGRÁFICA

2.1 Transplante de Órgãos no Brasil

No ano de 1997 foi criado pelo do Ministério da Saúde o Sistema Nacional de Transplantes (SNT) tendo como atribuição normatizar e desenvolver o processo de captação e distribuição de tecidos, órgãos e partes retiradas do corpo humano para finalidades terapêuticas. Três anos após a criação do SNT, foi estruturada pelo mesmo a Central Nacional de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos (CNNCDO), cujo objetivo principal é coordenar o trabalho das CNCDO estaduais, no sentido de agilizar a atividade executiva do programa de transplantes, que cabe às Secretarias Estaduais de Saúde. Informações disponíveis no *site* do Sistema Nacional de Transplantes (http://portal.saude.gov.br/saude/area.cfm?id_area=1004 Acesso em: Dezembro de 2010)

Segundo estatísticas apresentadas pela ABTO, foram realizados no país 41491 transplantes de órgãos sólidos (abrangendo transplantes de coração, pâncreas, pulmão, fígado, córnea, rim, entre outros) no período entre 2003 a 2010, de doadores vivos ou cadavéricos (TABELA 1) (www.abto.org.br Acesso em: Janeiro de 2011). Durante este mesmo período, o transplante renal totalizou 71% dos transplantes de órgãos sólidos, sendo o tipo de transplante mais realizado no país. No estado do Paraná foram realizados aproximadamente 1253 transplantes de rim entre 2001 e 2006. Em 2009, apenas no primeiro semestre, foram transplantados 620 órgãos no Estado, sendo destes 69 rins, cerca de 11% (http://portal.saude.gov.br/saude/area.cfm?id_area=1004 Acesso em: Dezembro de 2010).

TABELA 1. NÚMERO DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS REALIZADOS NO BRASIL (2003-2010)

	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	TOTAL
Órgãos Sólidos	4433	4948	4712	4700	4837	5417	6042	6402	41491
Rim (BR)	3184	3484	3559	3278	3460	3814	4288	4630	29497

Tabela 1. Número de transplantes de órgãos sólidos realizados no Brasil no período entre 2003 e 2010. **Órgãos Sólidos** = dados referentes a transplantes de coração, rim, córnea, fígado, pulmão e pâncreas; **Rim (BR)** = transplantes de rim realizados no país; Dados retirados do site da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO) (http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/populacao/rbt/anoXVI_n4/index.aspx, acesso em Janeiro de 2011).

O transplante de órgãos e/ou tecidos para substituição de órgãos funcionalmente comprometidos é, atualmente, uma importante terapia médica. Tal transferência de órgãos ou tecidos recebe a denominação de transplante autólogo, quando o receptor é o mesmo indivíduo, e de transplante alogênico quando ocorre entre indivíduos diferentes, mas da mesma espécie. Entretanto, na maioria dos casos, a resposta imune desenvolvida pelo receptor em relação ao tecido transplantado estranho, se constitui no principal impedimento para um transplante bem sucedido. Em tecidos contendo células nucleadas, respostas de células T às moléculas MHC alogênicas (*Major Histocompatibility Complex* – Complexo Principal de Histocompatibilidade), presentes no enxerto são o principal alvo da reação de reconhecimento imunológico ou aloreconhecimento que resulta, quase sempre, em rejeição. A histocompatibilidade *HLA* (*Human Leukocyte Antigen* – Antígenos Leucocitários Humanos), há muito tempo foi considerada um dos principais fatores responsáveis pela “pega do enxerto” (tolerância ao órgão transplantado). Quanto maior a similaridade entre as moléculas HLA do doador e receptor, maior a taxa de sobrevivência do aloenxerto (JANEWAY et al., 2000; ABBAS, LICHTMAN & POBER, 2000).

O aloreconhecimento pode ocorrer de duas formas:

Aloreconhecimento Direto: receptores de células T (TCRs) reconhecem aloantígenos HLA não processados diretamente nas Células Apresentadoras de Antígenos (CAA) do tecido ou órgão transplantado (FIGURA 1a).

Alorreconhecimento Indireto: requer a internalização, o processamento e a apresentação dos antígenos do enxerto por CAAs do próprio receptor via moléculas apresentadoras de antígenos (moléculas HLA) a Linfócitos T (FIGURA 1b), ativando caminhos de sinalização intracelular que resultam no processo de rejeição.

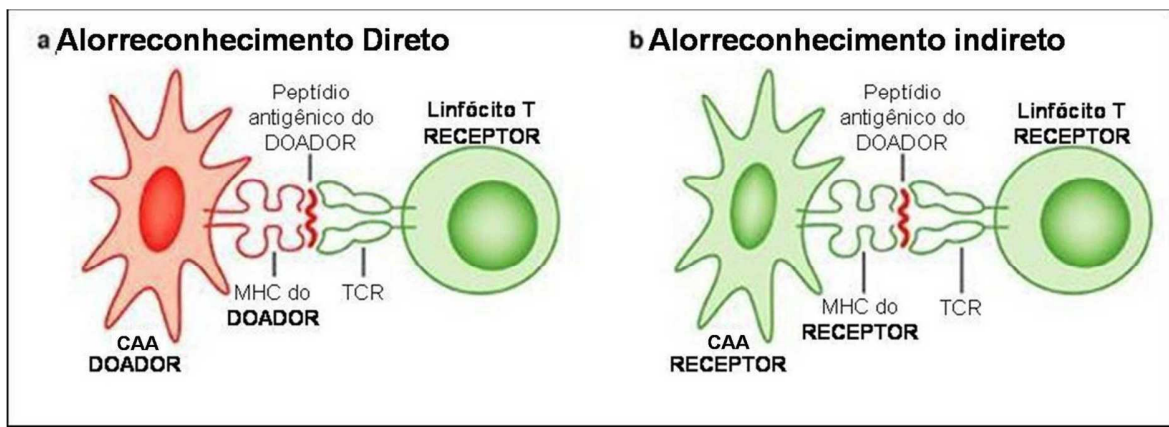


FIGURA 1. ALORRECONHECIMENTO DE ALOANTÍGENOS

Nota: Alorreconhecimento de peptídeos antigênicos do órgão transplantado. a) Alorreconhecimento direto, apresentação de aloantígenos via Célula Apresentadora de Antígenos (CAA) do próprio doador a linfócitos T do receptor. b) Alorreconhecimento Indireto, requer a internalização, processamento e a apresentação dos aloantígenos por CAAs do receptor a linfócitos T também do receptor. FONTE: ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Cellular and molecular Immunology. 4ed., Saunders, 2000.

O tipo de rejeição pode ser classificado segundo critérios em:

- **Rejeição Hiperaguda:** ocorre dentro de 48 horas após a ocorrência da anastomose das artérias e vasos sanguíneos nos receptores e, decorre da presença de anticorpos anti-HLA pré-formados presentes no soro do receptor em decorrência de um estímulo prévio (gestação, transfusões, transplante... etc.). É caracterizada por febre e por anúria. A ligação de anticorpos citotóxicos em aloantígenos que se expressam no endotélio vascular, ativa o complemento, com subsequente agregação de neutrófilos e plaquetas, resultando em trombose. É um evento

irreversível onde a única opção de tratamento é a remoção imediata do enxerto.

- **Rejeição Aguda:** tipo mais comum de rejeição, se origina através de respostas alogênicas primárias (tais como o alorreconhecimento direto e indireto) ocorrendo dentre 6 a 90 dias após o transplante. É mediado por células T e anticorpos, os quais podem causar tubulite e vasculite, respectivamente. Altas doses de esteróides e drogas antilinfocitárias são efetivos na reversão da resposta pelas células T, aproximadamente em 80 a 90% das vezes, no entanto, anticorpos antilinfocitários somente revertem a vasculite em aproximadamente 60% das vezes.
- **Nefropatia Crônica do Enxerto (anteriormente referida como Rejeição Crônica):** ocorre quando a tolerância ao aloenxerto é interrompida, após 4 ou mais meses do transplante. É caracterizada pela proteinúria, ocasional hematúria, hipertensão e síndrome nefrótica. O mediador primário deste tipo de rejeição é o anticorpo.

Apesar da administração de modernos agentes imunossupressores, a rejeição aguda ainda pode ocorrer, sendo frequentemente conduzida a permanente disfunção do enxerto ou a perda deste (VAMPA et al., 2003).

2.1.1 Transplante Renal

Apesar dos avanços técnicos no procedimento de diálise, o transplante renal é uma alternativa de tratamento para pacientes com doenças renais em estágio final (BENFIELD et al., 1999; CECKA, 2001) como por exemplo, a Insuficiência Renal Crônica (IRC). Essa condição resulta de lesões renais irreversíveis e progressivas, provocadas por doenças que tornam o rim incapaz de realizar as suas funções. As principais causas para o desenvolvimento da IRC são: nefropatia diabética, glomerulonefrite crônica, pielonefrite crônica, nefrosclerose maligna e doença renal policística. O ritmo de progressão depende

da doença original e de causas agravantes, como hipertensão, infecção urinária, nefrite, gota e diabetes (informações disponíveis no *site* do ABC da Saúde, <http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?268> Acesso em: Agosto de 2007).

Alguns testes pré-transplante são realizados tanto no receptor quanto no doador, dentre os quais se incluem: tipagem do sistema sanguíneo ABO; teste *cross-match* ou prova cruzada (testa anticorpos do receptor contra possíveis antígenos expressos na superfície celular de linfócitos do doador); e tipagem *HLA* (teste para determinar o grau de compatibilidade *HLA* entre receptores e doadores). A prova-cruzada (*cross-match*) é importante para evitar que anticorpos anti-*HLA* pré-existentes no paciente danifiquem o endotélio do enxerto, causando assim, a rejeição hiperaguda.

Embora a rejeição seja um processo dependente de células T, a destruição do aloenxerto resulta de uma ampla participação de mecanismos efetores. Um destes mecanismos, ainda pouco estudado, é a atividade aumentada das células *Natural Killer* (NK) logo após o transplante, mesmo estando o paciente sob um regime forte de imunossupressão (VAMPA *et al.*, 2003). Este fato é sugestivo de que a citotoxicidade das células NK do receptor contra antígenos do doador seja um alvo previamente não reconhecido do processo de rejeição. Em humanos, o aumento do número de células NK circulantes foi observado durante a rejeição aguda de aloenxertos renais (COOKSEY *et al.*, 1984), podendo haver infiltração destas células no tecido transplantado (HANCOCK *et al.*, 1985; TOTTERMAN *et al.*, 1989). Este mesmo processo de infiltração pode ocorrer em aloenxertos cardíacos (MARBOE *et al.*, 1983). Observa-se que as células NK têm habilidade para lisar células epiteliais do rim humano *in vitro* (LIN *et al.*, 1993). O trabalho de Hancock e colaboradores (1985) demonstra que painéis de anticorpos monoclonais direcionados contra vários marcadores leucocitários, detectaram células NK CD56 no aloenxerto renal durante as fases iniciais do processo de rejeição. Após esta fase ocorre um fluxo de células T e macrófagos (HANCOCK *et al.*, 1985). A importância destas células, em transplantes de órgãos sólidos, foi também demonstrada em alotransplantes de modelos animais (MAIER *et al.*, 2001; POPOOLA *et al.*, 2001).

2.2. O MHC humano

A descoberta do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) deu início à área clínica em crescente expansão de transplante de órgãos e tecidos. Em humanos, estas moléculas foram primeiramente visualizadas na superfície dos leucócitos e por esta razão receberam a designação de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA - *Human Leukocyte Antigens*) (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Os genes *HLA* codificam proteínas, que por meio de sua função apresentadora de peptídeos, são importantes moduladoras do repertório de linfócitos T circulantes e, auxiliam no processo de implementação da resposta imune. Mais recentemente foi enfatizado seu papel regulador da atividade citotóxica das Células NK.

Estudos genéticos relacionados à esses aloantígenos, bem como estudos sorológicos e moleculares realizados em *workshops* internacionais de histocompatibilidade, permitiram a identificação de vários locos gênicos polimórficos e polialélicos situados em uma região do braço curto do cromossomo 6 humano (6p21.31) (FIGURA 2). Essa região do genoma, foi subdividida em regiões de classe I, II e III (FIGURA 2) (LAMM et al., 1985; BELL, 1989; CHRISTANSEN et al., 1994) de acordo com a estrutura e função dos produtos dos genes nela situados.

As proteínas HLA possuem uma região extracelular onde situa-se uma fenda (ou sulco) que se liga a peptídeos proteicos, seguido por um par de domínios semelhantes à Imunoglobulina e ancoram-se à membrana celular por regiões transmembrânicas e citoplasmáticas. As moléculas HLA são subdivididas em classe I e II. As moléculas de classe I estão presentes em todas as células nucleadas e são heterodímeros constituídos de uma cadeia α (de 45 kD) composta por três domínios (α_1 , α_2 e α_3) ligada de forma não covalente a uma molécula de β_2 -microglobulina, um polipeptídeo de 12 kD codificado por um gene localizado no cromossomo 15 (KLEIN & SATO, 2000).

Proteínas de classe II são heterodímeros formados por uma cadeia α , com dois domínios (α_1 e α_2), e uma cadeia β , também com dois domínios (β_1 e β_2)

(ABBAS & LICHTMAN, 2005). Suas características e diferenças estão representadas na tabela 2 e na figura 3.

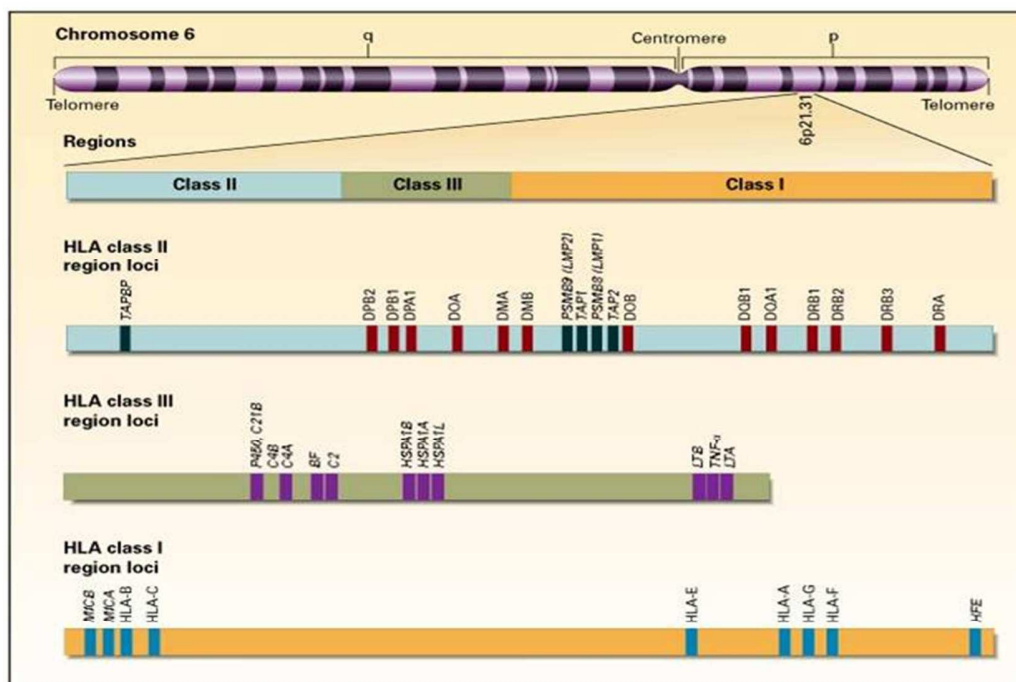


FIGURA 2. Localização e estrutura do MHC humano

Nota: Localização do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) humano. Disponível em http://nejm.org/teaching_tools/jpegs_large/klei.fig1.jpg, acesso em Novembro de 2007)

TABELA 2. Características das moléculas HLA de classe I e II

Característica	HLA de classe I	HLA de classe II
Cadeias polipeptídicas	α (44-47 kD) β_2 -microglobulina (12 kD)	α (32-34 kD) β (29-32 kD)
Localização de resíduos de aa polimórficos	Domínios α_1 e α_2	Domínios β_1 e β_2
Local de ligação para co-receptores da célula T	A região α_3 liga CD8 (de linfócitos T CD8+)	A região β_2 liga CD4 (de linfócitos T CD4+)
Tamanho da fenda de ligação de peptídeos	Acomoda peptídeos com 8-11 aa	Acomoda peptídeos com 10-30 aa
Locos	HLA-A, HLA-B, HLA-C	HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP

aa = aminoácidos

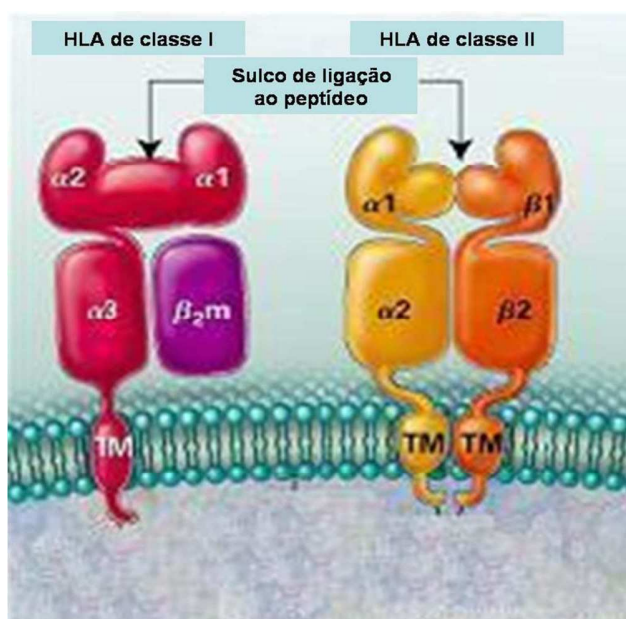


FIGURA 3. Estrutura das moléculas HLA de classe I e de classe II

Nota: TM = região transmembrânica. Moléculas de classe I formadas por um heterodímero constituído por uma cadeia α e uma cadeia leve denominada β_2 -microglobulina, enquanto que moléculas de classe II formam um heterodímero de uma cadeia α e uma cadeia β . (<http://labmed.hallym.ac.kr/immunogenetics/NEJM-HLA.htm> Acesso em Abril de 2007).

Estudos clínicos têm permitido concluir que de todos os locos de classe I e de classe II, a similaridade *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DR* entre doador e receptor é de grande importância para prever o prognóstico do transplante de órgãos e tecidos. (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Os alelos *HLA* são expressos de forma co-dominante e por essa razão, nos testes de histocompatibilidade, consideram-se os três locos *HLA* citados, definindo o grau de compatibilidade *HLA* entre a dupla receptor-doador entre zero a seis similaridades (*matches*). Seis *matches* são preditivos de uma melhor sobrevida do enxerto e, quanto menor o número de *matches*, menor a taxa de sobrevida (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Embora a compatibilidade *HLA* entre doador-receptor seja um requisito fundamental para o sucesso do transplante, o papel dos anticorpos, células apresentadoras de antígenos, células T *helper* (CD4+) e citotóxicas (CD8+), além de outras moléculas de superfície (como o HLA-C) nas células do sistema imune, mecanismos de sinalização e outros mecanismos efetores da resposta imune, não foram totalmente elucidados e necessitam de maiores esclarecimentos. Dentre

estes está o objetivo deste estudo, que é investigar o papel de receptores das células NK na rejeição aguda ao aloenxerto renal.

2.3. Células *Natural Killer*

As células NK (*Natural Killer*) são linfócitos derivados da medula óssea que possuem importantes funções na regulação da resposta imune inata. Entretanto, baseado em sua linhagem de origem, repertório de receptores e funções efetoras, as células NK parecem ser um tipo celular transicional, que seria uma ponte entre o sistema imune inato e o adaptativo (LANIER, 2005). Estas células são componentes cruciais no controle imune de células tumorais, células infectadas por vírus e células sob “stress” (TRINCHERI, 1989; DOKUN *et al.*, 2001; BRUTKIEWICZ & WELSH, 1995; MORETTA *et al.*, 2002; LONG, 2002; FRENCH & YOKOYAMA, 2003), além de participar no processo de rejeição do aloenxerto em transplantes de medula óssea em modelos experimentais murinos (BIX *et al.*, 1991). Um sofisticado repertório de receptores de superfície celular controla sua ativação, proliferação e funções efetoras (SPITS, *et al.* 1998).

Mais do que ser regulada por apenas um receptor, as células NK parecem atuar através da integração de inúmeros sinais provenientes de vários receptores. Sua ativação é controlada por receptores inibidores que, presumivelmente funcionam como um sistema “a prova de falhas”, evitando assim estimulação inadvertida, a qual resultaria em dano às células normais do organismo (LANIER, 2005). O reconhecimento de células alvo por células NK envolve a ligação e interação entre receptores ativadores e inibidores presentes em sua membrana celular com moléculas ligantes na superfície da célula alvo, além da integração de sinais transmitidos por estes receptores determinando se a célula deve ou não ser ativada. No caso de ativação, a célula NK responde com a reorganização e liberação de grânulos citotóxicos, além da transcrição e secreção de citocinas (LANIER, 2005). Os mecanismos, envolvidos na ativação e na inibição destas

células, estão aos poucos sendo elucidados, sendo a hipótese do “*missing-self*” (perda do próprio) (KÄRRE, 1985; KÄRRE, 2002) a mais aceita atualmente.

2.3.1. Hipótese do “*Missing-Self*” (perda do próprio)

Inicialmente as células NK foram descritas como não restritas ao MHC em seu processo de reconhecimento de células alvo, devido a sua capacidade de lisar células que não expressavam moléculas MHC ou que expressavam várias moléculas alogênicas. Contudo, Karre e colaboradores notaram que, mais do que ignorar o MHC, as células NK participam da imunovigilância, reconhecendo epítomos presentes em certas moléculas HLA. Estas células parecem ser ativamente inibidas de uma resposta citotóxica quando encontram células tumorais que expressam certas moléculas MHC de classe I (KÄRRE et al, 1985). Subseqüentemente, em um estudo de rejeição de células da medula óssea dependente de células NK de camundongos singênicos deficientes de β_2 -microglobulina foi demonstrada a habilidade das células NK em reconhecer e eliminar células hematopoéticas normais que não expressam moléculas MHC de classe I, (BIX, et al. 1991; HOGLUND, et al. 1991). De acordo com a hipótese “*Missing-self*” (LJUNGGREN & KARRE, 1990), as células NK fornecem a imunovigilância para células que tenham diminuição da expressão de moléculas MHC de classe I, um evento freqüentemente resultante da transformação celular ou infecção por vírus. Até recentemente, aceitava-se que as células NK lisavam quaisquer células que não expressavam ligantes MHC de classe I para receptores inibidores expressos em sua membrana (LANIER, 2005). Uma modificação contemporânea dessa hipótese “*missing-self*”, indica que células NK patrulham por células anormais, as quais não expressam ou possuem uma expressão reduzida de moléculas MHC de classe I, ou uma expressão aumentada de ligantes para receptores ativadores das células NK (FIGURAS 4 e 5).

Evidências experimentais sugerem que receptores inibidores que reconhecem epítomos presentes em proteínas MHC de classe I possam servir somente para atenuar, mais do que inibir completamente, as funções efetoras da

células NK e que, a quantidade de proteínas MHC I na superfície celular do alvo é proporcional ao grau de inibição.

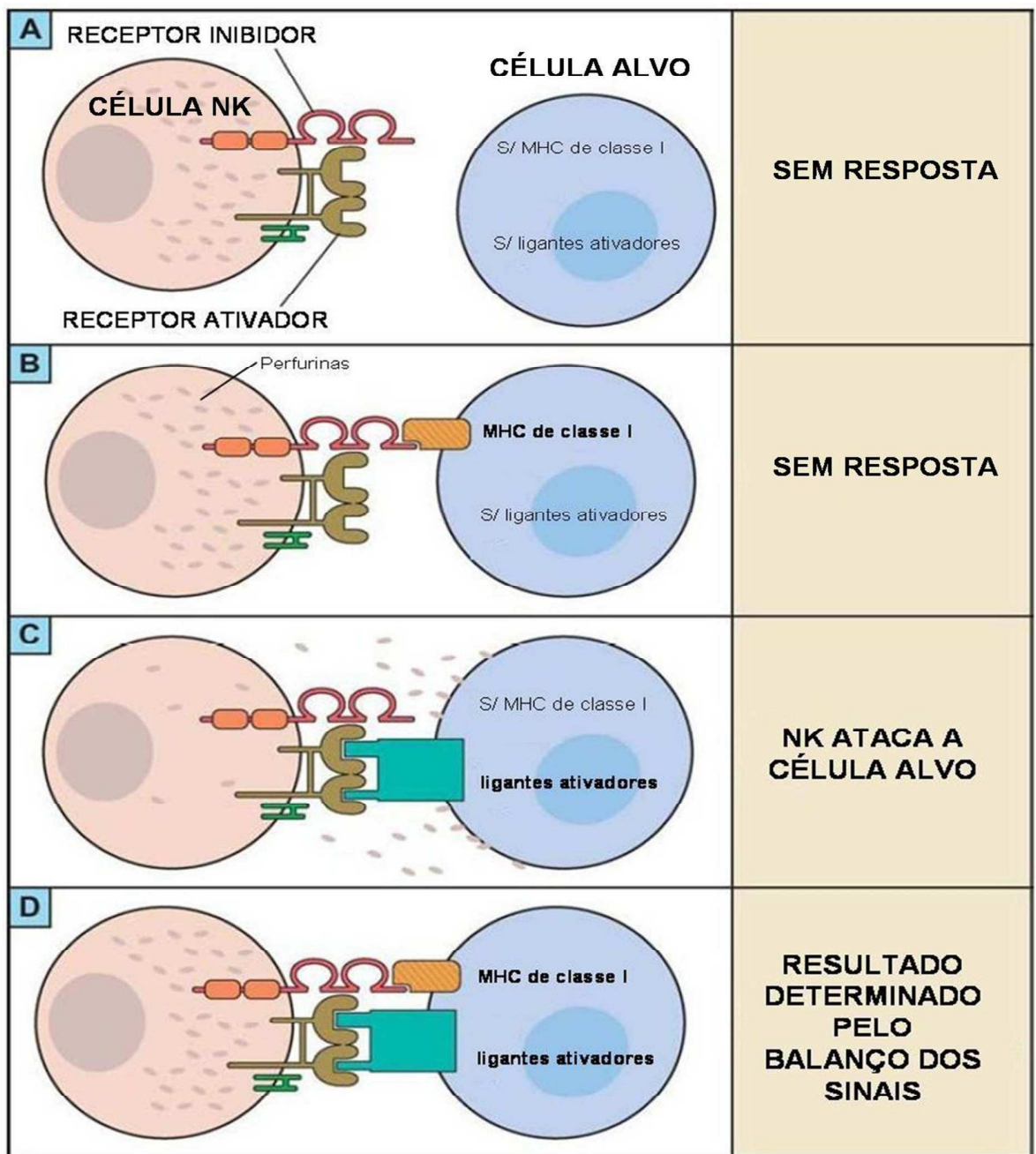


FIGURA 4. HIPÓTESE “MISSING-SELF” REVISADA

Nota: Hipótese “Missing-self” revisada. Representação do encontro entre uma célula NK e a célula alvo e possíveis resultados. A) Em algumas circunstâncias, receptores inibidores da célula NK (diferentes dos KIR) reconhecendo outros ligantes que não as proteínas MHC de classe I podem

suprimir respostas das células NK. B) A expressão de moléculas MHC de classe I ligantes para os receptores inibidores KIR desabilita a resposta, além da não expressão de ligantes ativadores. C) A não expressão da molécula MHC I ligante do receptor inibidor KIR conjuntamente com a expressão de ligantes para receptores ativadores resultam em mecanismos responsivos efetores. D) Quando interagem com células alvo expressando ligantes para ambos receptores ativadores e inibidores, o resultado é determinado pela soma da extensão dos sinais. A quantidade dos receptores ativadores e inibidores nas células NK e a quantidade de ligantes nas células alvo, tanto quanto diferenças qualitativas nos sinais transduzidos, determinam a extensão da resposta das células NK. FONTE: LANIER, L.L. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 225-274; 2005.

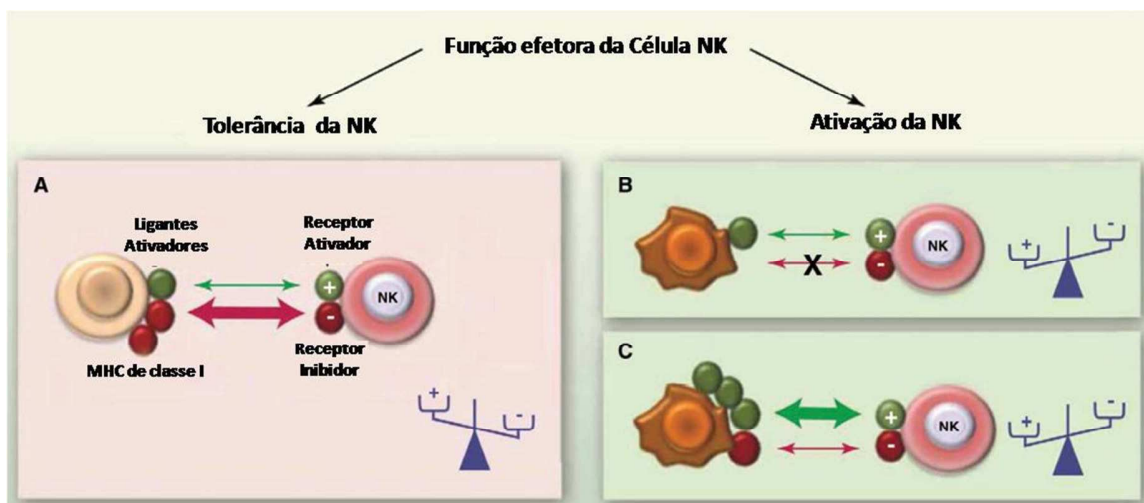


FIGURA 5. AJUSTE DA FUNÇÃO EFETORA DAS CÉLULAS NK

Nota: A integração de diferentes sinais produzidos pela ligação de moléculas ligantes na superfície de células alvo e receptores das células NK modulam a qualidade e a intensidade da resposta destas células. A) Na presença de receptores ativadores e inibidores, a célula NK pode ter sua ação suprimida quando a proporção de ligantes inibidores é superior. B e C) A situação contrária pode favorecer a ativação de sua função efetora. FONTE: Modificado de: VIVIER, E. Innate or Adaptive Immunity - The example of Natural Killer Cells. *SCIENCE* 331: 44-49; 2011.

Modelos experimentais permitiram prever que, quando múltiplos receptores ativadores de células NK são engajados simultaneamente (LANIER, et al. 1997) ou quando apenas um potente receptor ativador é adequadamente estimulado (CERWENKA, et al. 2001; DIEFENBACH, et al. 2001), as células NK são capazes de eliminar células alvo mesmo existindo interação de seus receptores inibidores com ligantes específicos MHC de classe I.

Por outro lado, uma das características marcantes dessa hipótese admite que a falha na resposta das células NK a alvos potenciais, pode ser devido à ativa inibição mediada por receptores inibidores ou alternativamente, devido à ausência de sinais de ativação suficientes para iniciar a resposta (LANIER, 2005). Um exemplo dessa situação seria a não resposta das células NK aos eritrócitos, sabendo-se que estes não expressam moléculas MHC I em sua superfície. Uma explicação seria que junto a não expressão de MHC I, existiria também a falta de ligantes capazes de se ligarem com receptores ativadores das NK. Uma outra explicação alternativa para a incapacidade das células NK de danificar tecidos normais, com baixos níveis de expressão de MHC I (ex. tecidos neurais) ou nenhuma expressão (ex. eritrócitos), é a possibilidade de que esta proteção da célula alvo seja mediada por receptores inibidores que reconhecem ligantes não MHC I (LANIER, 2005).

É difícil admitir que as células NK tenham primariamente evoluído para rejeitar tumores e certamente menos ainda, rejeitar células não transplantadas (autólogas). Sendo assim, foi proposto que a morte de células autólogas infectadas por vírus, seria uma provável força direcional para a evolução do reconhecimento da “perda do próprio” (“*Missing-self*”) (KIESSLING et al. 1975; KÄRRE, 1985).

2.3.2. Receptores de células NK que reconhecem ligantes MHC de Classe I

Diversos receptores de células NK cujos ligantes são moléculas MHC de classe I “clássicas” e “não clássicas” foram identificados. Entre estes estão a família de receptores CD94/NKG2, os Receptores semelhantes à Imunoglobulina Leucocitários - LILR (do inglês, *leukocyte Ig-like receptors*) e os Receptores semelhantes à Imunoglobulina das células *Natural Killer* – KIR (do inglês, *Killer-cell Ig-like Receptors*) (Figura 6).

Não existem ainda evidências aceitáveis de que células NK reconheçam, através de seus receptores, moléculas MHC de classe II. Lanier e colaboradores buscaram tais evidências em análises de camundongos deficientes de MHC II e em estudos funcionais *in vitro*, utilizando células alvo humanas e murinas que expressavam MHC de classe II (LANIER, 2005).

Receptores Humanos		Ligantes
KIR3DL3		?
KIR2DL3		HLA-CS77N80
KIR2DL2		HLA-CS77N80
KIR2DL1		HLA-CN77K80
KIR2DL4		HLA-G?
KIR3DL1		HLA-Bw4
KIR3DS1		?
KIR2DL5A/B		?
KIR2DS3		?
KIR2DS5		?
KIR2DS1		HLA-Cweakly
KIR2DS2		?
KIR2DS4		HLA-Cweakly
KIR3DL2		HLA-A
CD94/NKG2A		HLA-E
CD94/NKG2C		HLA-E
LILRB1		HLA-A, B, C, E, F

FIGURA 6. RECEPTORES DAS CÉLULAS NK COM LIGANTES MHC I

Nota: Representação gráfica dos receptores de célula NK com ligantes MHC de classe I. Receptores Inibidores: KIRs inibidores (ex. KIR2DL e KIR3DL), LILB1 e CD94/NKG2A contendo ITIMs (motivos inibidores baseados em tirosina) em seus domínios citoplasmáticos. Receptores

Ativadores: Proteínas CD94/NKG2C e algumas moléculas KIR faltando os ITIMs em sua cauda, possuindo um resíduo carregado em seus domínios transmembrana, resíduos estes de ligação com proteínas adaptadoras (DAP12) com ITAMs (K/R) (motivos de ativação baseado em tirosina) (ex. KIR2DS e KIR3DS). O KIR2DL4 é uma exceção, possui o domínio citoplasmático com ITIM e está associado com uma proteína adaptadora. E ligantes MHC de classe I. O símbolo ? significa ligante desconhecido ou duvidoso. FONTE: LANIER, L.L. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 225-274; 2005.

2.4. Receptores KIR

2.4.1. ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS KIR

Os receptores semelhantes à Ig das células *Natural Killer* (KIR – *killer cell immunoglobulin-like receptor*) são membros de um grupo de moléculas reguladoras encontradas na superfície das células NK. Os KIRs foram primeiramente identificados por sua habilidade de conferir alguma especificidade na citólise mediada por células NK (HAREL-BELLAN et al., 1986; MORETTA et al., 1990). Esta especificidade se dá, principalmente, através da interação de isotipos de moléculas KIR com epítomos presentes em moléculas HLA de classe I que se expressam na membrana das células. Essa interação protege células saudáveis da destruição espontânea causada pela citólise mediada por células NK. Entretanto, outros isotipos KIR podem estimular esta atividade (CARRINGTON & NORMAN, 2003).

As proteínas KIR são membros da super-família das imunoglobulinas (Ig) e se estruturam em dois ou três domínios extracelulares semelhantes à Ig (D₀, D₁ e D₂) (FIGURA 6 e 7). As moléculas com cauda citoplasmática longa são do tipo inibidor (inibem a ação citolítica da célula *Natural Killer*), em virtude da presença em sua cauda citoplasmática de imunoreceptores com motivos inibidores baseados em Tirosina (ITIMs) responsáveis pela transdução de sinais inibidores de funções efetoras (FIGURA 7 e 8).

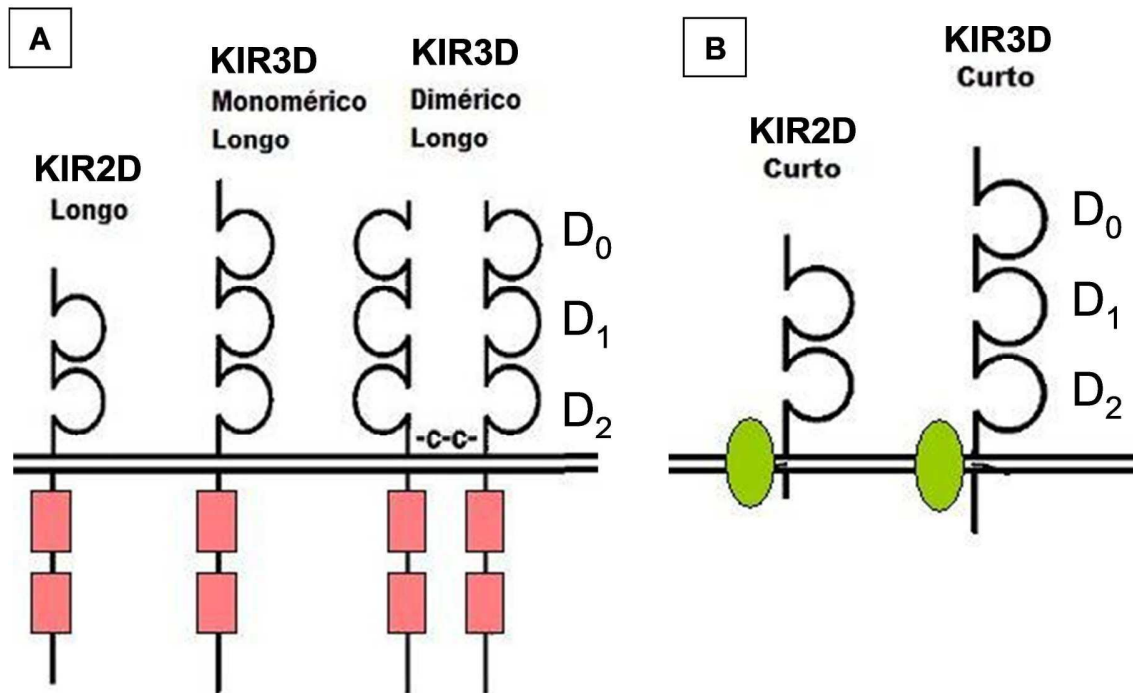


FIGURA 7. RECEPTORES KIR ATIVADORES E INIBIDORES DAS CÉLULAS NK

Nota: Todos os receptores KIR são membros da superfamília das imunoglobulinas, e podem conter dois ou três domínios Ig na região extracelular. A) Receptores KIR inibidores: todos os membros da família apresentam seqüências de aminoácidos inibidoras da ativação celular (ITIM) (em vermelho) na cauda citoplasmática. B) Os receptores KIR ativadores não apresentam domínios inibitórios ITIM, porém apresentam aminoácidos carregados no segmento transmembrânico. A cor verde representa a proteína adaptadora ou proteína associada ao receptor ativador KIR de células NK (DAP-12) a qual possui os ITAMs (Imunorreceptores com Motivos Ativadores baseados em Tirosina). A letra D seguida dos números 0, 1 e 2 indicam os domínios extracelulares semelhantes à Ig.

FONTE: Modificado de: LANIER, L. NK cell receptors. **Annual Review of immunology**, Baltimore, v. 16, p. 359-393, 1998.

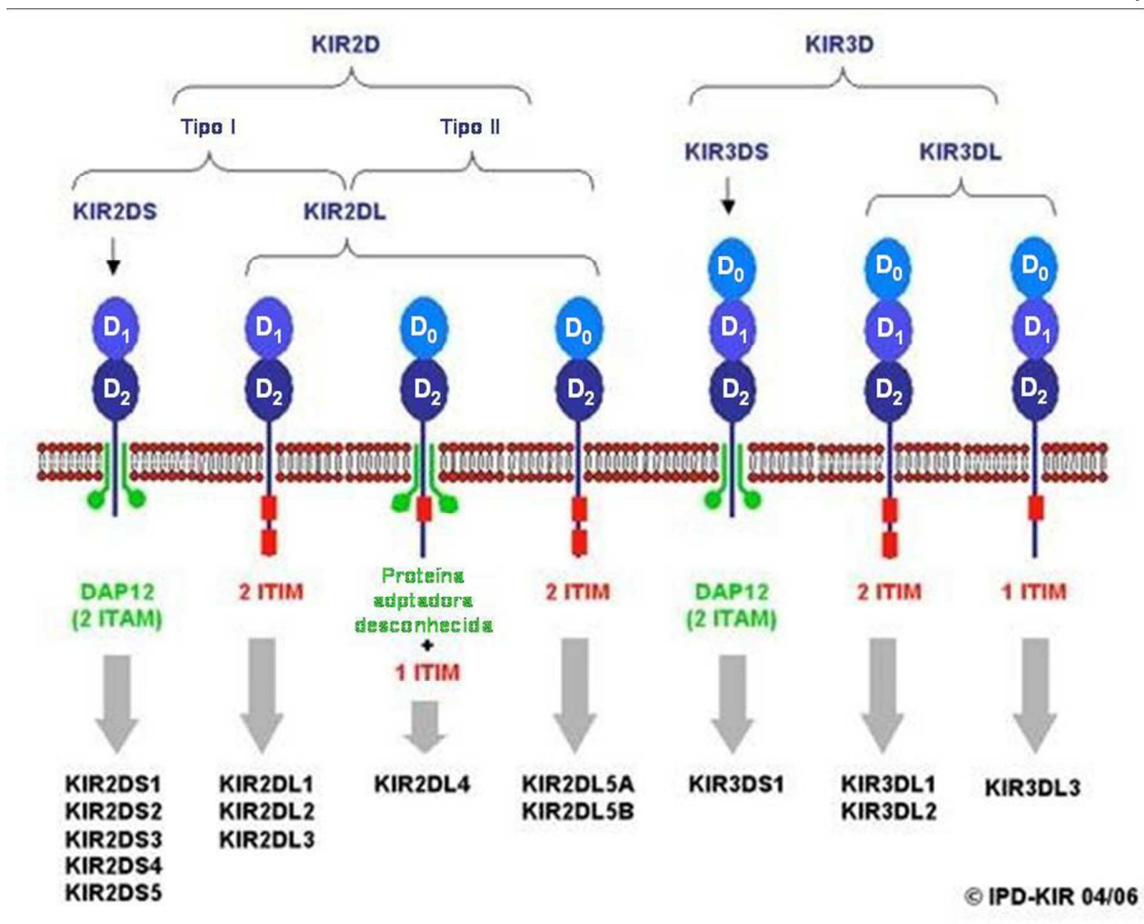


FIGURA 8. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS RECEPTORES KIR (ATIVADORES E INIBIDORES) DAS CÉLULAS NK

Nota: Estrutura das proteínas KIR. Características estruturais das proteínas KIR com 2 (KIR2D) ou 3 (KIR3D) domínios extracelulares semelhantes à Ig. A associação dos KIRs ativadores com as proteínas adaptadoras é mostrado em verde, enquanto que os ITIMs dos receptores inibidores são mostrados em vermelho. A letra D seguida dos números 0, 1 e 2 indicam os domínios extracelulares semelhantes à Ig.

FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: julho de 2007

As moléculas com cauda citoplasmática curta possuem uma alteração em um resíduo de aminoácido (lisina) localizado na região transmembrânica. Esta alteração, causada por mutações que afetam os receptores inibidores, pode ser suficiente para introduzir um outro aminoácido com polaridade diferente que resulte em versões ativadoras capazes de ligar o peptídeo de sinalização DAP12 (Proteína de Ativação de 12 kD DNAX - *DNAX activation protein of 12 kD*). Estas

proteínas são também conhecidas por KARAP (Proteína Associada ao Receptor Ativador de Células NK - *Killer Cell Activating Receptor Associated Protein*), uma molécula sinalizadora capaz de gerar um sinal ativador. Isto facilita a interação desta molécula DAP-12 com a proteína KIR, além da concomitante perda dos motivos ITIMs (CARRINGTON & NORMAN, 2003; MORETTA & MORETTA, 2004). Essas moléculas adaptadoras possuem os ITAMs (Imunoreceptores com Motivos Ativadores baseados em Tirosina) (FIGURA 8) (CARRINGTON & NORMAN, 2003). A especificidade deste estímulo pelos KIRs é pouco definida e pode também incluir ligantes não HLA de classe I (MORETTA & MORETTA, 2004). A molécula KIR2DL4 contém seqüências de ambos receptores ativadores e inibidores (CARRINGTON & NORMAN, 2003).

As proteínas com dois domínios semelhantes à Ig (KIR2D), podem ser classificadas em dois grupos distintos conforme os domínios (D_0 , D_1 e D_2) que apresentam. Por exemplo, proteínas KIR2D Tipo I (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4 e KIR2DS5) exibem os domínios D_1 e D_2 , enquanto que os receptores KIR2D Tipo II (KIR2DL4 e KIR2DL5) não possuem o domínio D_1 e sim o domínio D_2 (FIGURA 8).

As proteínas KIR variam de 306 a 456 resíduos de aminoácidos de comprimento, e o peptídeo líder da maioria dessas proteínas possui aproximadamente 21 resíduos de aminoácido. Contudo, a presença de um códon iniciador diferente no receptor KIR2DL4 gera um peptídeo líder mais longo (SELVAKUMAR, et al., 1996).

2.4.2. GENES *KIR*

Os genes *KIR* localizam-se no braço longo do cromossomo 19 humano (19q13.4), dentro de um complexo gênico de 1Mb denominado de *LRC* (Complexo de Receptores Leucocitários - *Leukocyte Receptor Complex*) (FIGURA 9). Os genes *LRC* conhecidos podem ser agrupados, baseando-se na sua organização, filogenia e estrutura, em quatro famílias multi-gênicas. Estas são: Família 1 - Receptores Leucocitários semelhantes à Ig, *LILRs* (*leukocyte Ig-like receptors*) e Transcritos semelhantes à Ig, *ILTs* (*Ig-like transcripts*); Família 2 - Receptores semelhantes à Ig das células *Natural Killer*, *KIRs* (*Killer-cell Ig-like Receptors*), Glicoproteína VI Receptor de colágeno de plaquetas, *GPVI* (*platelet collagen receptor glycoprotein VI*); Família 3 - um grupo representado pelos receptores de IgA Fc, *FCAR*, e *NKp46*; e Família 4 - Receptores semelhantes à Ig Associados a Leucócitos, *LAIRs* (*Leukocyte-associated Ig-like Receptors*) (MARTIN et al., 2004). O *LRC* contém genes que expressam uma seleção de 30 receptores semelhantes à Ig, dependendo do haplótipo analisado. Os novos genes *LRC*, denominados de *LENGs* (*LRC - Encoded Novel Genes*), codificados na extremidade centromérica do complexo, não estão estruturalmente relacionados ao Receptores semelhantes à Ig. Estes incluem o *LENG5*, que expressa a subunidade SEN34 de uma endonuclease de recomposição de transferência de RNA e *LENG7* que expressa um fator de alongamento 1 (VALES-GOMEZ et al., 1998).

Alguns produtos do *MHC* de classe I são ligantes alvo de alguns membros da Família dos Receptores semelhantes à Ig, como, por exemplo, as moléculas expressas pelos genes *KIR* (MARTIN et al., 2004).

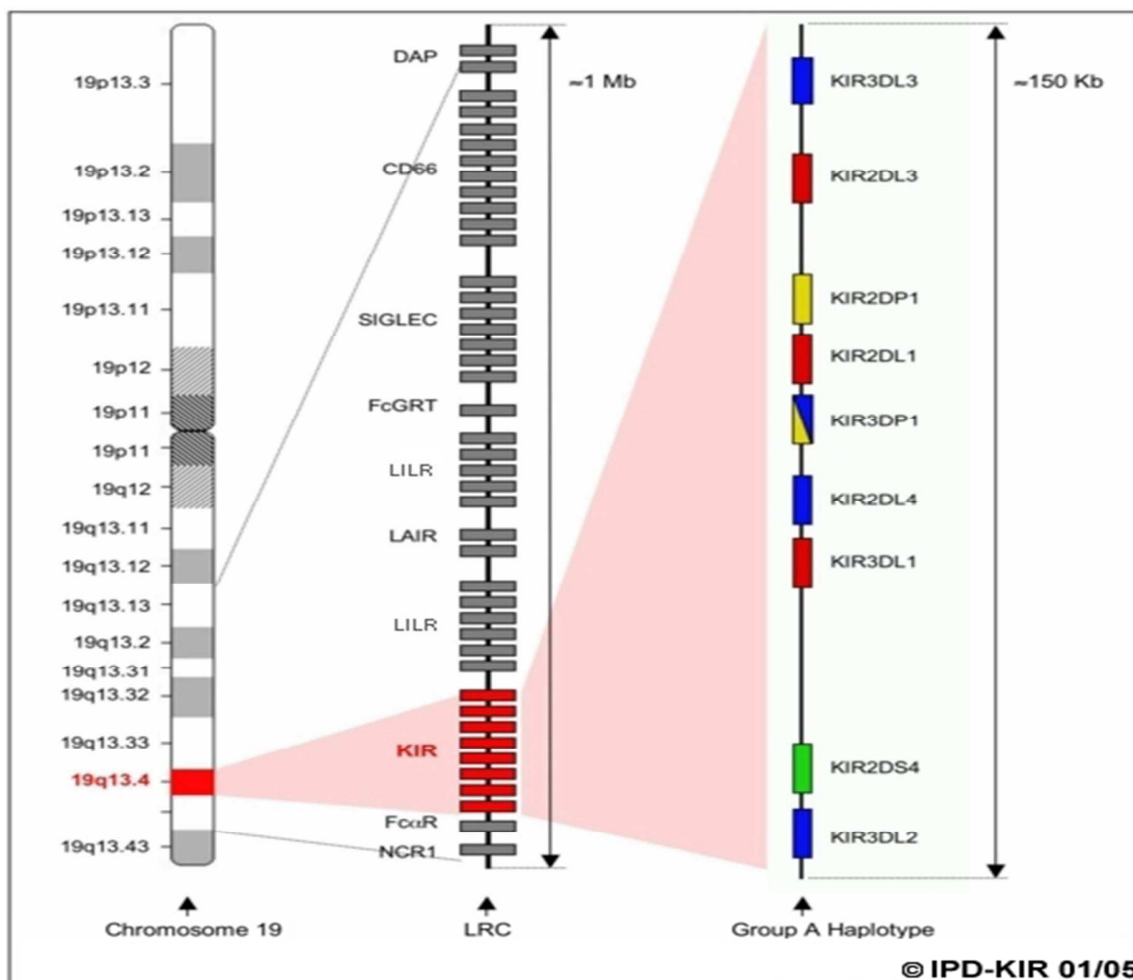


FIGURA 9. REGIÃO CROMOSSÔMICA DO LRC E DOS KIR

Nota: Localização cromossômica do LRC (Complexo do Receptor Leucocitário) destacando os genes *KIR* que se situam no cromossomo 19 (19q13.4). Dentro do LRC, encontram-se várias famílias gênicas, dentre elas estão: os LILRs (*leukocyte Ig-like receptors*); os ILTs (*Ig-like transcripts*); os KIRs (*Killer-cell Ig-like Receptors*); os GPVI (*platelet collagen receptor glycoprotein VI*); os receptores de IgA Fc, FCAR e NKp46; além dos LAIRs (*Leukocyte-associated Ig-like Receptors*).

FONTE: MARTIN, A.; KULSKI, J. K.; WITT, C.; PONTAROTTI, P.; CHRISTIANSEN, F. T. Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men. *Immunology* V.23: No.2; 2002.

Os genes *KIR* localizam-se num segmento cromossômico que se estende por 4 a 16Kb (seqüência genômica completa). A estrutura de cada gene *KIR* pode

conter de 4 a 9 exons, sendo dessa forma classificados como pertencentes a um de 3 grupos de acordo com suas características estruturais:

1) **Genes *KIR2D* Tipo I;**

Codificam proteínas com 2 domínios extracelulares com uma conformação D_1 e D_2 .

2) **Genes *KIR2D* Tipo II;**

Codificam proteínas com 2 domínios extracelulares com uma conformação D_0 e D_2 .

3) **Genes *KIR3D*;**

Codificam proteínas com 3 domínios extracelulares (D_0 , D_1 e D_2).

1) Genes *KIR2D* Tipo I

Neste grupo incluem-se os genes *KIR2DS1-5*, *KIR2DL1-3* e o pseudogene *KIR2DP1*. Estes genes possuem 8 exons, sendo o exon 3 não codificante (COLONNA & SAMARIDIS, 1985; WAGTMANN, et al., 1995; VILCHES, et al., 2000A e 2000B). Os genes *KIR2DL1* e *KIR2DL2* compartilham uma deleção no exon 7, o que os distingue dos demais genes *KIR*. Já os genes *KIR2DS1-5* e os *KIR2DL1-3* diferem entre si pelo comprimento de sua cauda citoplasmática codificada pelo exon 9.

2) Genes *KIR2D* Tipo II

Inclui os genes *KIR2DL4* e *KIR2DL5*, que possuem uma deleção característica do exon 4 e diferem do grupo *KIR2D* Tipo I pelo fato do exon 3 ser codificante. O *KIR2DL4* tem o exon 1 cerca de 6 nucleotídeos maior do que o exon 1 dos demais genes *KIR*, além de possuir um códon iniciador diferente dos outros genes.

3) Genes *KIR3D*

Estes genes possuem os 9 exons e incluem os genes estruturalmente relacionados *KIR3DS1*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* e *KIR3DL3*. Dentro deste grupo, os 4 genes diferem no exon 9 no que se refere a seqüência codificante da cauda citoplasmática (COLONNA & SAMARIDIS, 1985; DOHRING, et al., 1996; TORKAR, et al., 1998). Este comprimento da cauda citoplasmática pode variar de 23 resíduos de aminoácido (codificados por alguns alelos do gene *KIR3DS1*) até 116 resíduos (codificados por alelos do gene *KIR2DL4*). O gene *KIR3DS1* difere dos genes *KIR3DL1* e *KIR3DL2* por apresentar uma seqüência mais curta do exon 8. Já o *KIR3DP1* difere dos demais por não possuir o exon 6. A mais notável característica de um gene *KIR* se refere ao gene *KIR3DP1*, cujo segmento gênico do exon 6 ao 9 foi deletado, e ocasionalmente também o exon 2 (VILCHES, et al., 2000C).

2.4.2.1. NOMENCLATURA DOS GENES *KIR*

O subcomitê do *Human Genome Organization* (HUGO), denominado de Comitê de Nomenclatura para Fatores do Sistema *HLA* (WHO - *World Health Organization Nomenclature Committee*) foi designado para nomear os genes *KIR* e seus alelos (MARSH et al., 2003). A denominação do sistema gênico *KIR* considera a estrutura da proteína *KIR* e consiste de quatro grupos principais, classificados com base em duas características: número de domínios Ig extracelulares (2D ou 3D) e características da cauda citoplasmática da proteína *KIR*.

Com base na nomenclatura apresentada pela HUGO, os genes que codificam proteínas com dois domínios extracelulares são representados por *KIR2D*. Enquanto que aqueles que têm como produto uma proteína com 3 domínios são *KIR3D*. Este sistema de nomenclatura separa ainda os *KIR2D* e *KIR3D* em dois grupos, considerando-se o tipo de cauda citoplasmática presente

na proteína. As moléculas KIR com cauda citoplasmática longa possuem na denominação, junto ao seu número de domínios extracelulares, a letra “L” (do inglês *Long*) como, por exemplo, os genes *KIR2DL* ou *KIR3DL*. As moléculas que possuem a cauda citoplasmática curta são codificadas por genes designados pela letra “S” (do inglês *Short*), no caso *KIR2DS* e *KIR3DS* (OLCESE et al., 1997; LANIER et al., 1998). Os pseudogenes *KIR* são identificados pela letra “P” logo após o dígito correspondente ao tipo de domínio, como, por exemplo, nos pseudogenes *KIR2DP* ou *KIR3DP*. Após a nomeação destas 2 características, o dígito final é correspondente aos diferentes locos (FIGURA 10). Quando dois ou mais genes *KIRs* possuem seqüências e expressam estruturas protéicas muito similares (mas não idênticas), a eles é dado o mesmo número, discriminando-as por uma letra final, por exemplo os genes *KIR2DL5A* e *KIR2DL5B* (MORETTA & MORETTA, 2004).



FIGURA 10. NOMENCLATURA DOS GENES *KIR*

Nota.: Nomenclatura adotada pelo HUGO (*Human Genome Organization*).

FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: julho de 2007

A maioria dos genes *KIR* apresenta variação alélica e esta diversidade foi nomeada com base na nomenclatura adotada para os locos *HLA* (GARDINER et al., 2001; SHILLING et al., 2002). Assim, os três primeiros dígitos, após a designação do loco, distinguem alelos onde diferenças nas seqüências de éxons

conferem mudanças não sinônimas. Os dois próximos dígitos indicam alelos que se distinguem por diferenças na seqüência de éxons e que difiram em um íntron, promotor ou outra região não codificante (MORETTA & MORETTA, 2004). No primeiro relatório do Comitê de Nomenclatura, 87 alelos foram nomeados (SIVORI et al., 1997). Subseqüentemente, 18 alelos foram adicionados em 2003, mais dois em 2004 e um alelo foi excluído, totalizando 106 alelos (MORETTA & MORETTA, 2004).

2.4.2.2. ESTRUTURA GÊNICA E VARIABILIDADE ALÉLICA

O conjunto de genes *KIR* localiza-se no cromossomo 19, ocupando cerca de 150kb de um complexo gênico denominado *LRC*. Vários genes *KIR* seguem um arranjo básico quanto à organização de sua estrutura exon-intron: os exons 1 e 2 codificam a seqüência líder da proteína KIR; cada um dos domínios Ig (os domínios D₀, D₁ e D₂) corresponde a um único exon (exons 3, 4 e 5, respectivamente). Apenas um exon é responsável pela região de interação com o ligante e um pela porção transmembrânica (exon 6 e 7, respectivamente), sendo o domínio citoplasmático codificado pelos dois exons finais (8 e 9) (FIGURA 11) (WILSON et al., 1997, 2000; TROWSDALE et al., 2001).

A organização éxon/íntron dos genes *KIR2DL1*, *2DL2* e *2DL3* e todos os genes *KIR2DS* (conhecidos como *KIRs* com dois domínios Ig Tipo 1) (VILCHES & PARHAM, 2002) é a mesma que dos genes codificantes de moléculas com 3 domínios. Entretanto, o exon 3 dos genes *KIRs* com 2 domínios é um pseudoexon, o qual pode ser eventualmente excisado por recomposição, possivelmente devido a uma deleção de 3 pares de bases. Contudo, freqüentemente este exon permanece (VILCHES & PARHAM, 2002).

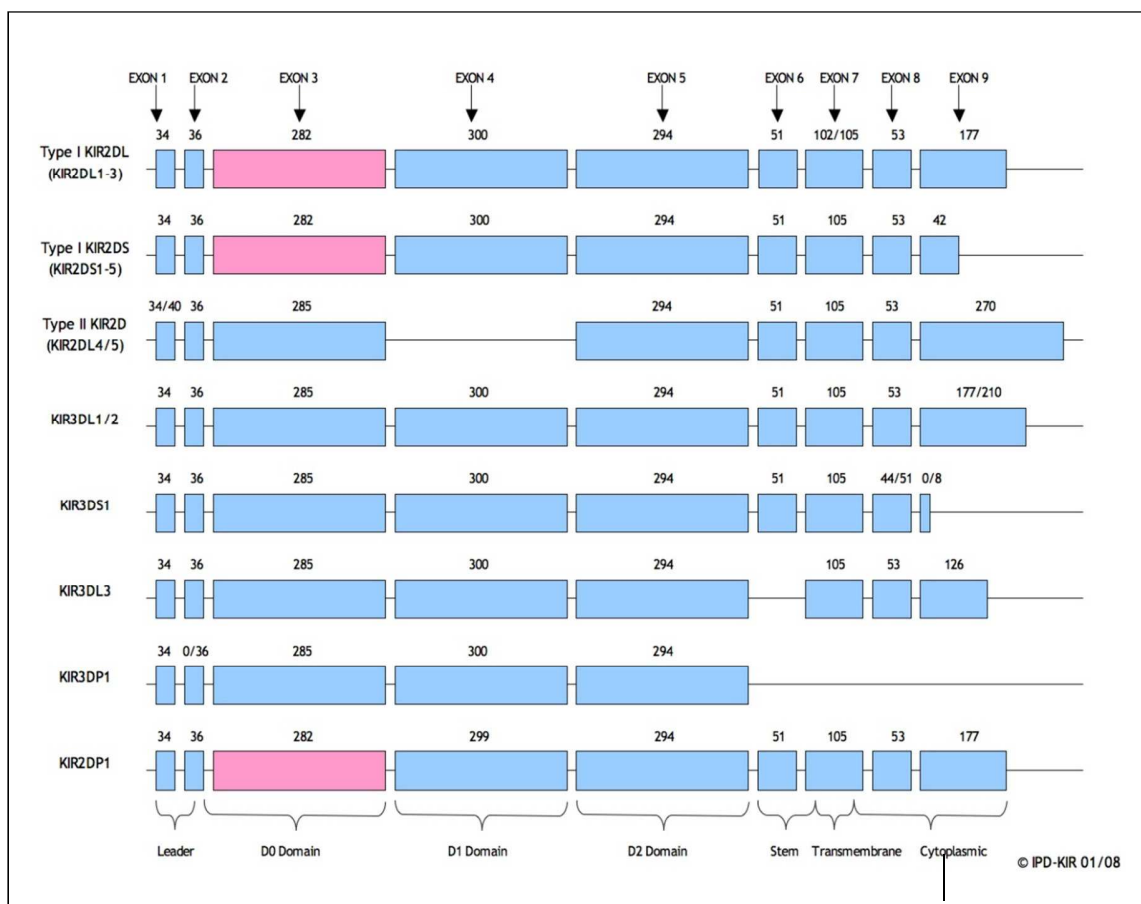


FIGURA 11. ESTRUTURA GÊNICA DOS *KIR*

Nota.: Estrutura dos genes *KIR*. Os genes *KIR* que compartilham uma organização estrutural similar estão aqui agrupados, enquanto os demais genes *KIR* com peculiaridades estruturais são mostrados por si só. As regiões codificantes estão representadas como caixas azuis e as nem sempre codificantes estão representadas em vermelho, seu tamanho em pares de bases (pb) está mostrado acima das caixas. O exon 3 não expresso do gene *KIR2DP1* e o exon 2 que por estar deletado no gene *KIR3DP1* são mostrados em vermelho. As chaves na porção final do diagrama representam a maneira que os exons codificam para cada domínio e região da proteína.

FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: julho de 2007

O produto dos genes *KIR2D* tipo 1 conseqüentemente perde o domínio D_0 (VILCHES et al., 2000C). Os *KIR2Ds* tipo 2 incluem *2DL4*, *2DL5A* e *2DL5B* (VILCHES & PARHAM, 2002), que se caracterizam pela ausência completa do exon 4 (SELVAKUMAR et al., 1997A), o que conseqüentemente causa a perda do domínio D_1 no produto protéico. Os genes *KIR3D* possuem toda a estrutura dos

exons intacta, com exceção dos *3DL3* que não possuem o exon 6. (CARRINGTON & NORMAN, 2003).

Dois pseudogenes foram identificados e nomeados através de suas semelhanças com os genes *KIR*, podendo estar presentes em certos haplótipos. O *KIR2DP1* possui uma identidade de seqüência de aproximadamente 97% quando comparado aos *KIR2DL1*, *2DL2* e *2DL3*, e contém dois exons, o 3 e 4. Um segundo pseudogene *KIR*, *KIR3DP1* é diferenciado por uma deleção de 1,5kb, que remove o exon 2 (WILSON et al., 2000).

Existe uma identidade de 91% compartilhada entre as seqüências promotoras da maioria dos genes *KIR* (VALIANTE et al., 1997), o que sugere que os mesmos possam ser controlados por mecanismos similares. O promotor do *KIR3DL3* possui um valor menor de similaridade (89%), o que pode esclarecer a reduzida expressão do *3DL3*. Alternativamente, o *KIR2DL4* é expresso em virtualmente 100% dos clones de NK, uma característica única do *2DL4*. O alelo *KIR2DL5B* (o mais comum em caucasóides) do gene *KIR2DL5* não é expresso devido à presença de uma mutação na sua seqüência promotora. Essa mutação ocorre em um sítio de ligação do fator de transcrição AML1, o que irá impedir a expressão do *KIR2DL5*. O mesmo acontece com o pseudogene *KIR3DP1* (VILCHES et al., 2000A).

A maioria dos genes *KIR* contém sítios variáveis, enquanto que o restante da seqüência do gene mostra pouca variação (SELVAKUMAR et al., 1997; WITT et al., 2000; GARDINER et al., 2001; SHILLING et al., 2002). Um fator significativo que contribui para esta diversidade da região genômica onde estão situados os locos *KIR* é o polimorfismo alélico (VALIANTE et al., 1997; SHILLING et al., 2002) gerado por mutações de ponto e recombinações homólogas (VALIANTE et al., 1997; SHILLING et al., 2002). Tais polimorfismos alélicos têm sido identificados para todos os genes *KIR* (HSU et al., 2002A). Esta variação pode ocorrer dentro de seqüências codificadoras responsáveis pelos epítomos que interagem com as moléculas HLA de classe I, e dessa forma poderia influenciar em tal interação (FAN et al., 1997, 2001; BOYINGTON et al., 2000; BOYINGTON & SUN, 2002). Nos genes *KIR*, variações nas seqüências nucleotídicas têm sido observadas em

toda a extensão do gene, diferentemente da variação observada para os genes *HLA* de classe I e II, que é primariamente restrita a um ou dois éxons (HUGHES, 2002). O histórico de permutas desiguais e a similaridade de seqüências entre os genes *KIRs* têm dificultado a distinção de alelos de um mesmo loco e de locos diferentes (CARRINGTON & NORMAN, 2003).

2.4.2.3. ORGANIZAÇÃO GÊNICA E DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA

Os genes *KIR* estão organizados dentro do complexo *LRC* em haplótipos, os quais têm mostrado uma extensa variação no número e no tipo de genes *KIR* presentes. A ordem dos genes *KIR* determina dois haplótipos distintos. (FIGURA 11). Os genes estão organizados de forma “cabeça-a-cauda” (do inglês *head-to-tail*), e cada gene ocupa de 10 a 16kb de comprimento, com uma seqüência intermediária de aproximadamente 2kb separando cada par de genes, exceto por uma seqüência única de 14kb anterior ao *KIR2DL4*. Todos os haplótipos *KIR* conhecidos estão flanqueados em sua extremidade centromérica pelo loco *KIR3DL3* e em sua extremidade telomérica pelo *KIR3DL2*, além de dois locos centrais, os *KIR3DP1* e *KIR2DL4*. Estes genes presentes virtualmente em todos os haplótipos são denominados “genes de moldura do haplótipo” (do inglês, *frameworks*) (VILCHES, et al., 2000B, 2002; WILSON et al., 2000; TROWSDALE, et al., 2001). A variação haplotípica encontrada no complexo *KIR* é devido à variação no número de genes que compõem o haplótipo bem como pelo polimorfismo alélico em vários desses genes (SELVAKUMAR et al., 1997; UHRBERG et al., 1997; SHILLING et al., 2002). A investigação dos haplótipos *KIR* sugere uma história de duplicação gênica e permuta desigual nesta região (CARRINGTON & NORMAN, 2003). Com exceção dos *KIR* de “moldura”, o conteúdo gênico dos genes *KIR* dentro dos haplótipos varia de indivíduo para indivíduo, de tal modo que um haplótipo pode exibir menos de 8 ou mais de 14 genes e pseudogenes *KIR*, dependendo da presença ou ausência dos locos

(UHRBERG et al., 1997; WITT et al., 1999; WILSON et al., 2000; HSU et al., 2002B).

Com base no conteúdo gênico, os haplótipos têm sido divididos em dois grupos primários, denominados A e B (FIGURA 12), os quais foram originalmente diferenciados usando a técnica PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição) baseado na presença de um fragmento gerado pela enzima de restrição *HindIII* de aproximadamente 24Kb (UHRBERG et al., 1997). Esse fragmento também está presente nos haplótipos B e mais tarde foi relacionado à presença do gene *KIR2DL5* (UHRBERG, et al., 1997; VILCHES, et al., 2002). A principal distinção entre estes dois haplótipos é o número de genes de receptores ativadores presentes. O haplótipo A tem 7 genes: *KIR2DL1*, *2DL3*, *2DL4*, *2DS4*, *3DL1*, *3DL2* e *3DL3*, contendo apenas um gene ativador (*2DS4*). O gene *KIR2DS4* possui um alelo nulo com uma frequência populacional de cerca de 84% (MAXWEL et al., 2002). Sendo assim, alguns indivíduos podem ser homocigotos para um haplótipo A onde nenhum *KIR* ativador é expresso (HSU et al., 2002B). Enquanto que o haplótipo B possui várias combinações de genes ativadores: *KIR2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS5*, *3DS1* e *2DS4*; além dos demais *KIR2DL4*, *3DL2*, *3DL3* e *3DP1* (CARRINGTON & NORMAN, 2003) (FIGURA 13). As frequências dos haplótipos A e B na população Caucasóide são similares, entretanto em relação ao conteúdo gênico, o haplótipo B possui uma maior variedade de subgrupos. Contudo existe uma ampla variação destes entre diferentes etnias (WITT et al., 1999; NORMAN et al., 2001). O haplótipo A possui uma frequência de 75% em Japoneses e apenas 15% em Aborígenes Australianos (TONEVA et al., 2001; YAWATA et al., 2002).

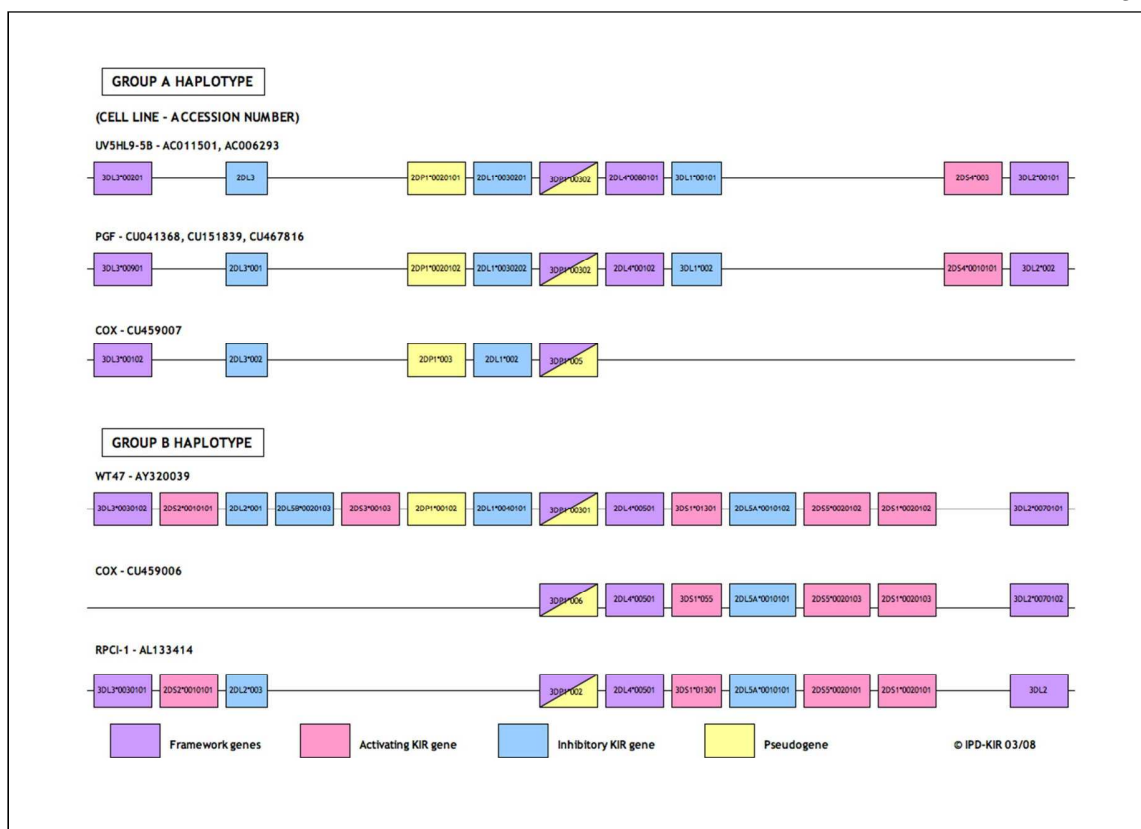


FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS A E B

Nota: Representação dos haplótipos A e B. Diagrama representando a organização de possibilidades de Haplótipos KIR A e B. Esta representação não está em escala.

FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: julho de 2010.

O aumento e a diminuição da região genômica onde situam-se os locos *KIR* parece ser resultado, em parte, de permutas desiguais e duplicações gênicas. Uma consequência destes eventos moleculares é a presença de duas (ou mais) cópias de um mesmo gene em um único haplótipo *KIR* e o rearranjo da ordem dos genes (CARRINGTON & NORMAN, 2003).

O número de cópias dos genes *KIR* também é variável, com pelo menos dois genes sendo exibidos mais de uma vez por haplótipo (GOMEZ-LOZANO et al., 2002). Finalmente, o polimorfismo alélico presente nos genes é o maior contribuinte para a diversidade da região *KIR*, com múltiplos alelos conhecidos e

provavelmente mais ainda a serem identificados para cada loco *KIR* (HSU et al., 2002).

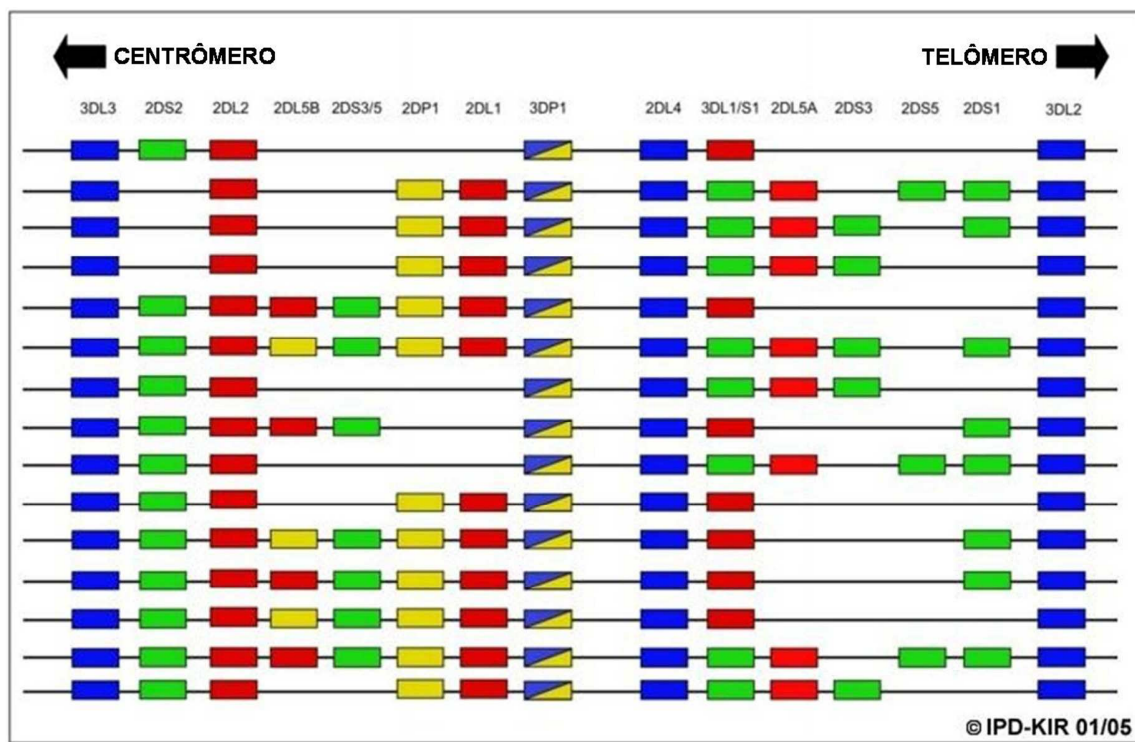


FIGURA 13. DIVERSIDADE DO GRUPO HAPLOTÍPICO B

Nota: A diversidade do grupo haplotípico B aqui apresentada foi identificada por dois estudos separados que envolveram a análise de segregação familiar, seqüenciamento genômico e análises de ordem gênica (SHILLING, et al., 2002; HSU, et al., 2002). As caixas azuis indicam os genes de “moldura”, as vermelhas os genes codificantes de receptores inibidores enquanto que as verdes, os genes que codificam proteínas ativadoras. As caixas amarelas representam os pseudogenes. O gráfico não está em escala.

FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: julho de 2007

2.4.2.4. CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA

O fator que contribui para o repertório diversificado de células NK, expondo diferentes grupos de moléculas KIR é a expressão e a manutenção de um grupo único destas proteínas para cada célula NK. Embora exista essa diversificação

entre os genes *KIR*, suas regiões reguladoras são bastante conservadas. A explicação de mecanismos reguladores que esclareçam a expressão diferencial dos KIRs ainda é limitada. Mecanismos epigenéticos têm sido especulados para o estabelecimento e a manutenção de diferentes padrões de expressão. Um mecanismo importante encontrado na regulação de genes é a metilação de citosinas dentro de dinucleotídeos CpG (ilhas CpG), estando associada à inibição da transcrição. A metilação do DNA é mantida durante as divisões celulares seguintes, o que fornece a capacidade de diversificar a expressão gênica de células individuais e transmiti-la para sua progênie (MORETTA & MORETTA, 2004). Santourlidis e colaboradores (2002) identificaram uma ilha CpG anterior à região dos genes *KIR*, a qual possui estrutura similar em todos os genes *KIR* expressos, com exceção do *KIR2DL4* onde a densidade de dinucleotídeos CpG é baixa. As ilhas CpG altamente metiladas correspondem a genes *KIRs* não expressos, o que não ocorre naqueles que são expressos. Esta correlação foi observada (SANTAOURLIDIS et al., 2002) em linhagens celulares NK e em células NK recentemente isoladas. Estudos são sugestivos de que a manutenção da expressão clonalmente restrita para genes *KIR* altamente homólogos e seus alelos é feita por metilação nas células NK. Foi também demonstrado que em clones de células NK, somente um alelo é expresso e sugere-se que seja o resultado da demetilação monoalélica, indicando assim, que os genes *KIR* são regulados independentemente. Os clones de células NK mostraram claramente uma expressão dos genes *KIR* clonalmente restrita, mesmo após extensiva cultura e expansão clonal (CHAN et al., 2003).

2.4.2.5. GENES *KIR* E TRANSPLANTE

As células NK fazem parte da imunidade inata, formando, uma primeira linha de defesa contra antígenos estranhos. Em contraste às células T que são restritas pelo alotipo MHC no processo de imunovigilância, as células NK interagem de forma diferente com alótipos MHC, cujo mecanismo foi explicitado

pela hipótese "*Missing-Self*" (Perda do Próprio). A atividade das células NK é provavelmente o resultado de um balanço na expressão de receptores de superfície ativadores e inibidores, as moléculas ou receptores KIR (LANIER, 2001), e a interação destes com moléculas HLA de classe I. Os receptores KIR, o grupo de moléculas receptoras melhor caracterizado das células NK, são isotipo específicos. Assim, aloenxertos com moléculas HLA de classe I KIR-Ligante não presentes podem potencialmente ser alvo do reconhecimento citolítico mediado por receptores KIR. A incompatibilidade KIR-Ligante foi definida como a ausência de certos epítomos, codificados por grupos alélicos HLA de classe I, e presentes no tecido do doador, os quais são ligantes para as proteínas KIRs do paciente. Estudos indicam a ocorrência de aloreações mediadas pelo repertório *KIR* quando o alvo alogênico não expressa alelos HLA de classe I que os bloqueie (RUGGERI et al., 2004A). O conhecimento atual das especificidades KIR ativadoras ou inibidoras da lise celular, através da ligação com epítomos presentes nas moléculas HLA ainda é incompleto, embora existam alguns exemplos de especificidade entre o KIR e o HLA já conhecidos. Por exemplo, o KIR2DL1 liga-se somente aos epítomos HLA-C do Grupo 1 (C1), onde estão epítomos que incluem os aminoácidos Asn77, Lys80, enquanto o KIR2DL2 liga-se somente aos epítomos HLA-C do Grupo 2 (C2) que possuem Ser77, Asn80 (COLONNA et al., 1993) (TABELA 5).

As células NK são ativadas logo após o transplante, apesar da forte imunossupressão, sugerindo que a ação citotóxica destas células do paciente contra células do doador possa ser um alvo do processo de rejeição. Isso foi observado especialmente nos pares de doadores e paciente KIR incompatíveis, onde o paciente expressa um repertório KIR cujo resultado da interação com ligantes expressos em células do doador resulta em rejeição. O pico da atividade das NK ocorre dentro de 3 dias do início da resposta imune, precedendo a atividade das células T. Elas também têm um significativo papel na defesa contra tumores (TRINCHERI, 1989), infecção viral (TRINCHERI, 1989; DOKUN et al., 2001), e a rejeição do transplante de medula óssea (BIX et al., 1991). Diferentemente das células T, elas não requerem sensibilização e são capazes de

matar células alvo independentemente de ativação. Sua importância, em transplantes de órgãos sólidos, foi recentemente demonstrada em alotransplantes de modelos animais (MAIER et al., 2001; POPOOLA et al., 2001). Em humanos, o aumento do número de células NK circulantes foi observado durante a rejeição aguda de aloenxertos renais (COOKSEY et al., 1984), além de participar em infiltrados cardíacos (MARBOE et al., 1983) e renais (HANCOCK et al., 1985; TOTTERMAN et al., 1989).

As células NK possuem a capacidade de lisar células epiteliais do rim humano *in vitro* (LIN et al., 1993). A utilização de painéis de anticorpos monoclonais, direcionados contra vários marcadores leucocitários, mostram células NK CD56 presentes no aloenxerto renal durante o princípio da rejeição, seguido por um fluxo de células T e macrófagos (HANCOCK et al., 1985).

Os testes pré-transplantes, tais como tipagem HLA e prova cruzada, para seleção de doadores, associados com os modernos agentes imunossupressores permitem um aumento na taxa de sobrevida do aloenxerto renal, chegando em algumas unidades transplantadoras a mais de 90% dos casos em 1 ano. Entretanto, a rejeição aguda ainda ocorre e, freqüentemente, conduz à permanente disfunção do enxerto ou a perda deste (VAMPA et al., 2003). A rejeição é o problema mais comum dos primeiros 3 meses imediatamente após o transplante de rim (ETTENGER et al., 1990; McENERY et al., 1992). Cirocco e colaboradores (2007) observaram que a taxa de sobrevida do enxerto renal foi menor entre pares de receptores-doadores onde ambos não possuem os genes *KIR2DS2* e *KIR2DL2*, mesmo o par sendo HLA-idêntico (CIROCCO, et al. 2007).

2.5. A PROTEÍNA HLA-C

O HLA-C é uma molécula apresentadora de antígenos HLA de classe I, seguindo o mesmo padrão estrutural: heterodímeros constituídos por duas cadeias polipeptídicas: uma cadeia α composta por três domínios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) associada a uma cadeia β_2m . A fenda de ligação é composta pelos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ enquanto o domínio $\alpha 3$ associa-se com a cadeia β_2 -microglobulina. A estrutura da β_2 -microglobulina é estabilizada por pontes dissulfeto e é similar a um domínio de Ig em sua estrutura tri-dimensional (ABBAS & LICHTMAN, 2005). As moléculas HLA-C são representadas pelas figuras 3 e 15.

2.5.1. GENE *HLA - C*

Precedendo a utilização da técnica de PCR na tipagem dos genes *HLA*, a tipagem por sorologia foi bastante utilizada. Essa abordagem, quando se pretendia caracterizar as variações *HLA-C*, apresentava dificuldades e resultados ambíguos na identificação de especificidades, um número alto de *blanks* (um alelo indefinido gerado pela Maximização da Estimativa (EM)). Estas limitações da técnica impediram o real dimensionamento da diversidade do *HLA-C*. Contudo, com o desenvolvimento da PCR, o aumento progressivo da descoberta de alelos novos *HLA-C* ocorre na ordem de 446 em 2010, de acordo com a nova nomenclatura para o sistema HLA, apresentada por Marsh e colaboradores neste mesmo ano (MARSH *et al*, 2010), chegando a 1016 alelos descritos no relatório disponível em <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/index.html> para Janeiro de 2011 (FIGURA 14). Essa diversidade genética foi amplamente interpretada e aplicada nas diferentes áreas de estudo, em especial na área de transplante de tecidos e órgãos (BUHLER *et al.*, 2006).

Numbers of HLA Alleles							
HLA Class I Alleles							4,721
HLA Class II Alleles							1,353
HLA Alleles							6,074
Other non-HLA Alleles							115
Number of Confidential Alleles							2
HLA Class I							
Gene	A	B	C	E	F	G	
Alleles	1,519	2,069	1,016	10	22	46	
Proteins	1,119	1,601	750	3	4	15	
Nulls	77	62	24	0	0	2	

FIGURA 14. Número de alelos *HLA-C* conhecidos até Janeiro de 2011.

FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html> Acesso em Janeiro/2011

O *HLA-C* é um gene HLA classe I clássico e contém 8 exons. O exon 1 codifica o peptídeo líder da proteína, os exons 2 e 3 os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$, responsáveis pela fenda de ligação ao peptídeo. O domínio $\alpha 3$ é codificado pelo exon 4, e a região transmembrana pelo exon 5. Os exons 6 e 7 codificam a cauda citoplasmática. O polimorfismo dentro dos exons 2 e 3 é responsável pela especificidade de ligação ao peptídeo.

2.5.2. NOMENCLATURA DO GENE *HLA-C*

A nomenclatura adotada para o gene *HLA-C* é a mesma utilizada para os demais genes *HLA*, onde cada alelo *HLA* é descrito por meio de um sistema que utiliza-se de letras e números, contendo 4, 6 ou 8 dígitos, os quais são separados por dois pontos (:). A extensão da designação do alelo é dependente de sua seqüência e de alelos com seqüências similares a sua. Todos os alelos recebem uma designação de pelo menos 4 dígitos. As designações com 6 ou 8 dígitos são utilizadas apenas quando é necessário para caracterizar a natureza e ou regiões na estrutura do gene onde estão situadas as variantes nucleotídicas. A nomenclatura para genes do sistema *HLA* é apresentada na figura 15.

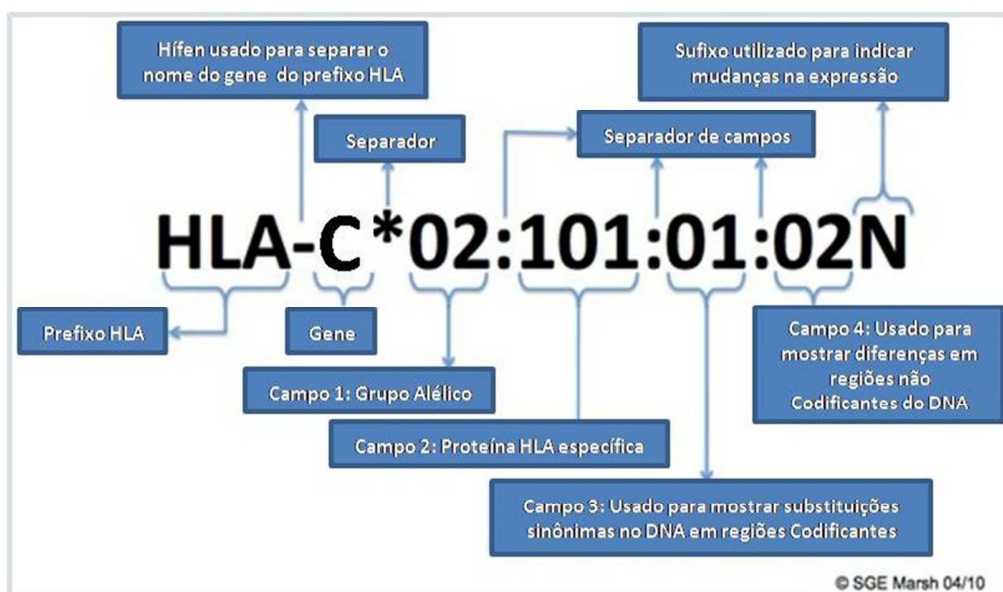


FIGURA 15. NOMENCLATURA DOS GENES *HLA-C*.

FONTE: Disponível em: <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html> Acesso em: Janeiro de 2011

2.5.3. *HLA-C* E TRANSPLANTE

Exames laboratoriais pré-transplantes de medula óssea e renais, são recomendados e realizados rotineiramente para identificação de variantes alélicas de *HLA-C* e, atualmente é sugerida a sua participação em situações de aloconhecimento em outros tipos de transplantes.

No contexto do transplante de medula óssea, níveis elevados de precursores de linfócitos citotóxicos (CTLs) foram associados com *mismatch HLA-C* em pacientes, indicando que a incompatibilidade *HLA-C* deveria ser evitada em transplante de doadores não relacionados (não aparentados) de medula óssea (BARNARDO et al., 1996). Segundo Bishara e colaboradores, pacientes onde doadores não relacionados de medula óssea possuíam disparidades *HLA-C* entre ambos e positividade para o teste MMLR (*Modified Mixed Leukocyte Reaction*) foram mais propensos a desenvolver complicações pós-transplante, como GvHD (*Graft vs Host Disease* – doença do enxerto versus o hospedeiro) e rejeição

(BISHARA et al., 1999). Atualmente o *HLA-C* foi investigado, tendo como fundamento, suas interações com os receptores KIR em transplante de medula óssea (COOK et al, 2004). Moya-Quiles e colaboradores sugerem que o gene *HLA-C* codifique produtos moleculares capazes de desempenhar um papel na aloreatividade ou na alotolerância ao enxerto de fígado, onde a compatibilidade possa ser útil para diminuir o risco de rejeição aguda ao órgão e promover a aceitação do enxerto (MOYA-QUILES et al., 2003). Este mesmo grupo recentemente observou um papel protetor do grupo alélico *HLA-C*07*, por apresentar associação negativa com o desenvolvimento da rejeição aguda, podendo assim ser considerado como um fator preditivo para a aceitação do aloenxerto de fígado (MOYA-QUILES et al., 2007).

No transplante renal o *mismatch HLA-C* entre paciente e doador foi associado com a ocorrência de episódios de rejeição aguda. Duplas receptor-doador incompatíveis para *HLA-C* com um *mismatch* adicional para o loco *HLA-B*, apresentaram significativamente mais episódios de rejeição do que duplas compatíveis (FROHN et al., 2001). Recentemente, análises de incompatibilidade KIR/ligantes *HLA-C* são realizados na área de transplante renal. Sieler e colaboradores observaram que pacientes com rejeição renal aguda demonstram um número significativamente maior de incompatibilidades KIR-Ligantes (*KIR2DL1* e seus ligantes *HLA-C* (C1)) (SIELER et al., 2005). Os autores sugerem a partir destes resultados, que enxertos que não expressam moléculas MHC de classe I similares às do paciente podem ser potenciais alvos para a lise mediada por células NK, com conseqüências para o resultado do transplante renal (SIELER et al., 2005).

2.6. Interações entre receptores KIR e seus ligantes HLA de classe I

Testes de citotoxicidade de células NK do receptor contra células mononucleares de sangue periférico do doador permitiram demonstrar que a reatividade das células NK contra células alvo é *HLA mismatch* dependente

(VAMPA et al., 2003). Este ensaio de reatividade foi realizado dois dias antes, no dia e dois dias após ao transplante renal. A citotoxicidade das células NK do paciente, anti-células do doador, mostrou-se inalterada apesar da imunossupressão com Ciclosporina A, nos dias anteriores ao transplante. Além disso, dois dias após o transplante a citotoxicidade aumentou em 71% dos pacientes. Estes pacientes que apresentaram um acréscimo na reatividade pós-transplante possuíam um número maior de genes *KIR* ativadores para ligantes HLA de classe I do doador quando comparados com aqueles que não apresentaram acréscimo de reatividade. Esta ativação das células NK do paciente mesmo após forte imunossupressão permite concluir que o mecanismo de aumento dessa reatividade deva ser melhor estudado no contexto dos transplantes, particularmente as interações *KIR* e seus ligantes HLA de classe I (VAMPA et al., 2003).

O entendimento da estrutura e das relações entre ligantes HLA e os receptores KIR foi obtido com base em estudos de cristalografia das moléculas KIR2D livres (SNYDER et al., 1999; FAN et al., 2001; SAULQUIN et al., 2003;). Contudo, nenhuma estrutura cristalográfica dos receptores KIR3D foi descrita (DENG & MARIUZZA, 2006).

As moléculas KIR2D são formadas por dois domínios N-terminais em tandem (D_1 e D_2), unidos por um conector de 3 a 5 aminoácidos (FIGURA 16). Cada domínio é constituído por duas folhas β antiparalelas. A angulação entre estes dois domínios varia de 60 a 80 graus de acordo com a variação dos resíduos na interface D_1 - D_2 , nos diferentes receptores KIR2D (DENG & MARIUZZA, 2006).

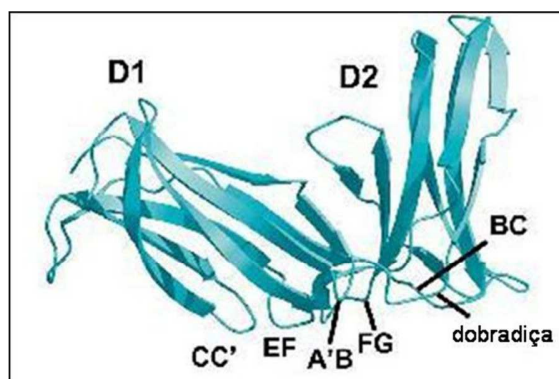


FIGURA 16. ESTRUTURA DA REGIÃO EXTRACELULAR DA MOLÉCULA KIR2D.

Nota: Estrutura dos domínios extracelulares D₁ e D₂ de um receptor KIR2D. CC', EF, A'B, FG e BC = alças ou "loops" que interagem com a molécula HLA.

FONTE: Modificado de BOYINGTON, J.C.; MOTYKA, S.A.; SCHUCK, P.; BROOKS, A.G.; SUN, P.D. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature* 405: 537-543; 2000.

2.6.1. Estrutura dos complexos KIR2D/HLA-C

Epítomos presentes nas moléculas HLA-C são os principais ligantes dos receptores KIR. Estas proteínas ligam-se a 3 receptores KIR inibidores (dos receptores com ligantes conhecidos até o momento) e a 2 receptores ativadores. As relações entre as moléculas HLA-C e os receptores KIR inibidores e ativadores são apresentadas na tabela 3.

TABELA 3. RECEPTORES KIR E SEUS LIGANTES HLA-C

Epítomos HLA-C	Receptores KIR			
		INIBIDORES	ATIVADORES	
ASN77 e LYS80	C4	Grupo 1 (C1)	2DL1	2DS1
	C2			
	C5			
	C6			
SER77 e ASN80	C3	Grupo 2 (C2)	2DL2	2DS2
	C1			
	C7			
	C8			

Nota: Relações entre receptores KIR e seus ligantes HLA-C. Os epítomos HLA-C estão reunidos em dois grupos distintos: Grupo 1 ou C1= a proteína HLA-C que possui o aminoácido Lisina na posição 80 (LYS-80) e Grupo 2 ou C2= onde a mesma possui o aminoácido Asparagina na mesma posição (ASN-80). FONTE: O Autor (2007)

Se os indivíduos forem genotipados para o loco *HLA-C*, é necessária a conversão destes dados moleculares em dados sorológicos onde se pode prever a estrutura da proteína, a fim de se estabelecer a qual grupo (C1 ou C2) o indivíduo pertence. Tais conversões podem ser estabelecidas a partir da tabela 4.

TABELA 4. CONVERSÃO SOROLÓGICA DAS TIPAGENS MOLECULARES DE *HLA-C*

HLA-C	
Molecular (DNA)	Sorologia (Proteína)
HLA-C*01	C1
HLA-C*02	C2
HLA-C*03	C9(3), C10(3)
HLA-C*04	C4
HLA-C*05	C5
HLA-C*06	C6
HLA-C*07	C7
HLA-C*08	C8
HLA-C*12	indef
HLA-C*14	C1/indef
HLA-C*15	indef
HLA-C*16	indef
HLA-C*17	C7/indef
HLA-C*18	C6/indef

Nota: Nem todos os dados moleculares possuem dados sorológicos, sendo assim identificados por "indef". FONTE: O Autor (2007)

A interação entre receptores KIR e alótipos HLA-C ocorre por meio de domínios α_1 e α_2 das proteínas HLA de classe I; porções C-terminais do peptídeo ligado à fenda desta última molécula, além dos domínios D₁ e D₂ do receptor KIR2D (FIGURA 17). No complexo formado KIR2D-HLA de classe I, o eixo dos domínios D₁-D₂ da molécula KIR é aproximadamente ortogonal ao eixo do peptídeo ligado ao sulco formado pelas hélices α_1 e α_2 do HLA, alinhando assim o

domínio D_1 com a hélice α_1 e o D_2 com a α_2 . Os KIR estabelecem contato com seus ligantes por meio de 5 alças (FIGURA 17).

A tabela 5 apresenta as principais características dos receptores KIR e seus ligantes (quando conhecidos).

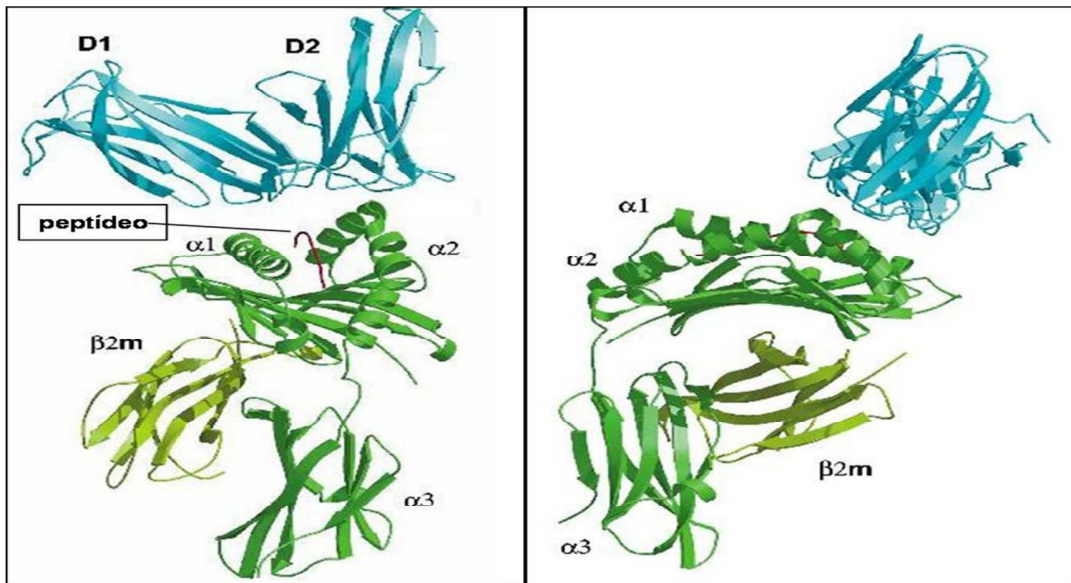


FIGURA 17. INTERAÇÃO MOLECULAR ENTRE AS PROTEÍNAS KIR2D E HLA DE CLASSE I ESPECÍFICOS

NOTA: Interação molecular entre receptores KIR2D e moléculas HLA-C. Azul = estrutura dos domínios semelhantes à Ig (D_1 e D_2) da molécula KIR; verde = estrutura da molécula HLA de classe I (domínios α_1 , α_2 e α_3 , além da β_2 -microglobulina) HLA-C; vermelho = peptídeo na fenda da molécula HLA.

FONTE: Modificado de BOYINGTON, J.C.; MOTYKA, S.A.; SCHUCK, P.; BROOKS, A.G.; SUN, P.D. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature* 405: 537-543; 2000.

TABELA 5. CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DOS RECEPTORES KIR

KIR	Região extracelular (domínios Ig)	Aminoácido carregado em domínio transmembrânico	Nº de aác. no domínio citoplasmático; Nº de ITIMs *	Ligantes conhecidos	Função
3DL1	D ₀ -D ₁ -D ₂	—	84; 2	HLA-Bw4	Inibidora
3DL2	D ₀ -D ₁ -D ₂	—	95; 2	HLA-A3, outros?	Inibidora
3DS1	D ₀ -D ₁ -D ₂	Lys	22 ou 27; 0	?	Ativadora
2DL1	D ₁ -D ₂	—	84; 2	HLA-C com Lys80	Inibidora
2DL2,3	D ₁ -D ₂	—	84 ou 76; 2	HLA-C com Asn80	Inibidora
2DS1	D ₁ -D ₂	Lys	39; 0	HLA-C com Lys80	Ativadora
2DS2	D ₁ -D ₂	Lys	39; 0	HLA-C com Asn80	Ativadora
2DS3,5	D ₁ -D ₂	Lys	39; 0	?	Ativadora
2DS4	D ₁ -D ₂	Lys	39; 0	HLA-C	Ativadora
2DL4	D ₀ -D ₂	Arg	115; 1 ou 11; 0	HLA-G	Inibidora/Ativadora
2DL5	D ₀ -D ₂	—	115; 2	?	Inibidora

NOTA: * ITIM (motivos inibidores baseados em tirosina); aa = aminoácidos.

FONTE: Modificado de: VILCHES, C.; PARHAM, P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 20, p.217-251, 2002.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar se a incidência de episódios de Rejeição Aguda em Pacientes Transplantados renais está associada com a presença dos genes *KIR* e/ou (para os locos *KIR2DS2* e *KIR2DS4*) com sua expressão gênica, além da aloreatividade das células NK baseada na hipótese de “*missing-self*”.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar, separadamente, a frequência para ambos os genes (*HLA-C* e *KIR*), possíveis associações entre os grupos ligantes *HLA-C* e a presença dos locos *KIR* com ocorrência de episódios de rejeição aguda renal.
- Analisar o potencial de reatividade para interações entre *HLA-C* e *KIR* e possíveis associações com episódios de rejeição aguda.
- Analisar o perfil de expressão dos genes *KIR2DS2* e *KIR2DS4* em linfócitos de pacientes renais nos estádios pré e pós transplante.
- Comparar os níveis de expressão dos genes *KIR2DS2* e *KIR2DS4* entre pacientes com e sem rejeição aguda.

4. JUSTIFICATIVA

O transplante de rim se tornou uma terapia padrão para doenças renais de estágio final. A rejeição aguda ao aloenxerto mediada pelo sistema imune do paciente necessita ainda de maiores esclarecimentos dos mecanismos nela envolvidos.

O atual estudo tem como justificativa a sugestiva atuação dos receptores KIR das células *Natural Killer* no processo imunomodulador da resposta imune no sentido de induzir ou impedir a rejeição aguda (dependendo da combinação de seu repertório com seus ligantes *HLA* de classe I), e da alta frequência desta apesar da compatibilidade *HLA* e do uso de modernos agentes imunossuppressores, tais observações justificam a realização de estudos nessa área, cujos resultados esperamos que possam contribuir para elucidar a importância dos genes *KIR* na aceitação do aloenxerto renal.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foi conduzido um estudo caso-controle numa amostra constituída por 110 pares Pacientes/Receptor-Doador (n=220 indivíduos), submetidos a transplante renal no período entre 2007 e 2010, no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba (HUEC). Com base nos prontuários médicos, os pacientes transplantados renais foram subdivididos em dois grupos: a) duplas onde o Receptor paciente apresentou quadro de rejeição aguda (Pacientes, n=57) identificada por altos níveis de creatinina durante exames de rotina; b) duplas onde o Receptor não apresentou episódios de rejeição (Controles, n=53), também consideradas como amostra controle. A avaliação do episódio de rejeição (ER) ocorreu no período compreendido entre uma semana até um mês após o transplante. Os pares Receptor/Doador foram segregados de acordo com os seguintes critérios: a) grau de similaridades *HLA* (número de *mismatches* nos locos *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DR*); b) grupo étnico (predominantemente euro-brasileiros); c) idade (semelhantes entre Doador e Receptor), protocolo de imunossupressão (Ciclosporina (CsA), Prednisona, Mofetil Micofelonato (MMF) e Metil-Prednisona. A tabela 6 apresenta as principais características da amostra.

As duplas Receptor/Doador foram genotipadas para caracterização da presença e ausência dos 16 genes do repertório *KIR*, bem como para identificação da diversidade alélica de *HLA-C*. Para análise da expressão gênica de dois genes *KIR* (*KIR2DS2* e *KIR2DS4*) esta amostra foi subdividida em 33 indivíduos (19 pacientes e 14 doadores) nos quais a extração do RNA foi possível.

TABELA 06. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Parâmetros			C/ Rejeição Aguda		S/ Rejeição Aguda	
	Receptores	Doadores	Receptores	Doadores	Receptores	Doadores
Número de Indivíduos	110	110	57	57	53	53
Idade (média±desv.pad.)	37.06±13.67	38.57±10.47	34.84±12.84	38.57±11.92	40.32±13.24	37.27±10.44
Dif. Idade (média±desv.pad.)	15.85±14.82		13.33±10.43		18.15±18.11	
Grau de Parentesco						
1° grau	61/110 (55%)		37/57 (65%)		24/53 (45%)	
2° grau	6/110 (5%)		3/57 (5%)		3/53 (6%)	
3° grau ou ã relac.	20/110 (18%)		11/57 (19%)		9/53 (17%)	
Ñ informado	23/110 (21%)		6/57 (11%)		17/53 (32%)	
Grupo Étnico						
Caucasóide	38/110 (37%)	13/110 (12%)	28/57 (49%)	7/57 (12%)	14/53 (26%)	6/53 (11%)
Negróide	5/110 (5%)	2/110 (2%)	3/57 (5%)	1/57 (2%)	2/53 (4%)	1/53 (2%)
Indígena	0/110 (0%)	1/110 (1%)	0/57 (0%)	1/57 (2%)	0/53 (0%)	0/53 (0%)
Ñ informado	61/110 (59%)	94/110 (85%)	26/57 (46%)	48/57 (84%)	37/53 (70%)	46/53 (87%)
Sexo Rec/Doa						
Fem/Fem	19/110 (17%)		8/57 (14%)		11/53 (21%)	
Fem/Mas	26/110 (24%)		13/57 (23%)		13/53 (25%)	
Mas/Fem	28/110 (25%)		19/57 (33%)		9/53 (17%)	
Mas/Mas	28/110 (25%)		16/57 (28%)		12/53 (23%)	
Ñ informado	9/110 (8%)		1/57 (2%)		8/53 (15%)	
Transp. Prévio						
0	88/110 (80%)		52/57 (91%)		36/53 (68%)	
1	9/110 (8%)		3/57 (5%)		6/53 (11%)	
Ñ Informado	13/110 (12%)		2/57 (4%)		11/53 (21%)	

Nota: Desv.Pad. = Desvio Padrão; Dif.Idade = Diferença entre as idades; Ñ relac. = Não relacionado; Ñ Informado = Não Informado; Rec = Receptores; Doa = Doadores.

FONTE: O Autor (2011)

5.2. COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE

5.2.1. Obtenção das Amostras

Para a coleta de 10 ml de sangue periférico, destinadas à extração de RNA total, utilizou-se de 2 tubos de cinco mililitros (10 ml) estéreis com EDTA, por meio

de punção venosa, seguido de armazenamento em gelo e transporte imediato ao laboratório. Ao todo, 33 indivíduos, entre Receptores (n=19) e Doadores (n=14) renais, cederam amostras sanguíneas para análise de expressão gênica. Para os pacientes as coletas atenderam ao seguinte cronograma: 1) Amostra Pré-transplante; 2) Pós-transplante: 2a) logo após a imunossupressão; 2b) em episódios de rejeição hiperaguda; 2c) um mês após o transplante ou durante episódios de rejeição aguda. A distribuição das amostras coletadas pode ser observada na tabela 7.

Para a extração de DNA, apenas um tubo com EDTA pré-transplante foi coletado para receptores (110 indivíduos) e doadores (100 indivíduos).

TABELA 7 – DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE RNA ENTRE PACIENTES E SEUS DOADORES (DOA)

Pacientes	PRE-TX	IIMUNO	HA	d30	REJA	DOA	Total
1R	X	X	X			X	4
3R	X	X		X		X	4
4R	X	X		X		X	4
5R	X		X			X	3
6R	X	X				X	3
7R	X		X			X	3
8R	X	X				X	3
9R	X	X					2
10R	X	X		X		X	4
11R	X				X		2
12R		X				X	2
13R	X				X		2
14R	X						1
15R	X			X			2
16R	X						1
17R	X	X	X		X	X	5
18R		X			X	X	3
19R		X				X	2
20R		X		X		X	3
21R	X						1
22R	X	X				X	3
23R	X	X			X	X	4
24R	X	X		X			3
Total	19	15	4	6	5	15	64

Nota: Distribuição das amostras de RNA. PRÉ-TX = amostra pré-transplante; IMUNO = pós-imunossupressão; HA = rejeição hiperaguda; d30 = 30 dias pós-transplante; REJA = rejeição aguda; DOA = amostra dos respectivos doadores. FONTE: O Autor (2011).

5.3. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO E RNA TOTAL

As amostras de sangue foram transportadas em recipiente refrigerado para o laboratório imediatamente após a coleta pela equipe do Serviço de Transplantes do HUEC. As amostras foram centrifugadas a 2500rpm por 15 minutos para separação dos componentes do sangue e obtenção da camada de leucócitos da qual foi extraído o DNA pela técnica de *salting-out* (JOHN et al., 1990, modificado por LAHIRI e NURNBERGER, 1991) (ANEXO II). Utilizou-se o kit comercial QIAamp RNA blood Mini (Qiagen), seguindo as instruções do Fabricante, para extração do RNA total.

Para descontaminação com possíveis enzimas RNAses presentes na bancada de trabalho e em plásticos empregados durante a extração de RNA utilizou-se, em etapa prévia ao processo, o reagente RNaseZap Solution (Ambion®).

Para evitar a contaminação do produto da extração de RNA por gDNA residual (DNA Genômico), utilizou-se o kit RNase-Free DNase Set, conforme orientações do fabricante Qiagen, prevenindo assim a amplificação deste. Todo o procedimento de extração do RNA foi realizado sobre gelo.

5.4 CONCENTRAÇÕES DE DNA E RNA TOTAL

As concentrações de DNA e RNA total das amostras foram quantificadas pela leitura de densidade ótica utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Os valores resultantes das razões dos comprimentos de onda (260 e 280) possuem como referência os intervalos: 1,6 e 2,0 (referente à pureza da amostra) para 260/280; e 2,0 e 2,2 (Contaminação) para 260/230. Valores de 260/280 fora do intervalo indicado representam amostras com baixa pureza do ácido nucleico analisado, enquanto que valores externos ao intervalo de 2,0 – 2,2

para 260/230 sugerem contaminação com compostos fenólicos presentes nos reagentes da extração. As concentrações de RNA total resultantes foram padronizadas em 50ng/uL para posterior reação de transcrição reversa para produção do cDNA (DNA complementar ao RNAm).

5.5. GENOTIPAGEM DOS GENES *KIR* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR-SSOP

O método para tipificação para presença e ausência dos 16 genes *KIR* (*KIR2DL1*, *KIR2DL2/L3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1/S1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e dois pseudogenes, *KIR2DP1* e *KIR3DP1*) utilizado no presente estudo foi a PCR-SSOP (Reação em Cadeia da Polimerase Sonda Oligonucleotídica Sequência Específica - *Polymerase Chain Reaction Sequence-Specific Oligonucleotide Probe*) empregando-se o “kit” *KIR SSO Genotyping Test* fabricado pela empresa One Lambda Inc. A amplificação do produto específico foi feita através de três pares de iniciadores (*Primers*) específicos para os exons 3, 5 e 7 até o 9 (7, 8 e 9). Tais iniciadores estão presentes já no “kit” para tipagem de genes *KIR*. A concentração inicial do DNA utilizado foi de 50ng/uL. Após a amplificação, o produto foi aplicado em gel de agarose 2,5% e corado com brometo de etídio, com a finalidade de se verificar quais amostras tiveram seus produtos amplificados. Para a realização da reação de amplificação é necessário uma DNA polimerase, neste caso utilizou-se a enzima *Taq Platinum* da empresa *Invitrogen*, sendo que os demais reagentes da Mistura de Reação (dNTPs, tampão da enzima, cofatores da enzima) estão presentes no “mix” de tipagem. A realização da amplificação do segmento específico foi realizada no aparelho termociclador Perkin-Elmer 9600 e as condições de amplificação são mostradas na Tabela 8.

TABELA 08. CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR SSOP

TEMPERATURA	TEMPO	Nº DE CICLOS
96 °C	3 minutos	1 ciclo
96 °C	20 segundos	
60 °C	20 segundos	5 ciclos
72 °C	20 segundos	
96 °C	10 segundos	
60 °C	15 segundos	30 ciclos
72 °C	20 segundos	
72 °C	10 minutos	1 ciclo
4 °C	∞	1 ciclo

FONTE: O Autor (2008)

A técnica de PCR-SSOP baseia-se na desnaturação química da dupla fita de DNA do produto já amplificado com iniciadores marcados com Biotina (reagente fluorescente), seguida por neutralização química de ambas as fitas do DNA abertas e posterior hibridização com sondas oligo-específicas. Tais sondas estão pré-conjugadas em micro-esferas (“pérolas”), sendo que cada micro-esfera possui um tipo específico de sonda. Em seguida, as sondas que hibridizaram são marcadas com um produto fluorescente, a SAPE (Estreptavidina conjugada com R-Ficoeritrina - *R-Phycoerythrin-conjugated Streptavidin*). A leitura das micro-esferas marcadas é realizada com a ajuda de um citômetro de fluxo (LABScan™), equipamento que através de laser na cor vermelha, comprimento de onda de 633nm, reconhece a cor da microesfera e outro laser verde, comprimento de onda 532nm, reconhece se esta microesfera está ou não marcada com SAPE, o que determinaria sua positividade. Para a interpretação dos resultados utilizou-se o software *HLA FUSION RESEARCH* Versão 2.0 (cedido pela empresa) que analisa as combinações de sondas nas micro-esferas detectadas pelo aparelho, o qual consulta um banco de dados interno e sugere quais são os locos presentes. As concentrações dos reagentes não são fornecidas e os volumes foram utilizados conforme recomendado pela empresa.

O “kit” e o software para realização dos testes são desenvolvidos pela empresa Norte-Americana *One Lambda Inc.* Todos os procedimentos para seu uso foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

5.6 GENOTIPAGEM DO GENE *HLA-C* ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO E DE PCR-SSP

O sequenciamento do gene *HLA-C* foi realizado para os 19 Receptores renais e 14 doadores (os quais foram também analisados para expressão dos genes *KIR2DS2* e *KIR2DS4*) através do kit de sequenciamento *Allele SEQR HLA-C Plus KIT* (Atria Genomics). Este kit inclui: Dna Polimerase AmpliTaq Gold, Enzima de Purificação Exo-SAP-IT, DNA controle, Tampão NaOAc/EDTA, Pré Mix de PCR *HLA-C*, Mix de Sequenciamento com ddNTPs para exon 2 *Foward* e *Reverse*, e Mix de Sequenciamento para o exon 3 *Foward*. Foram realizadas as seguintes etapas: 1) Amplificação do gene de interesse; 2) Purificação do produto amplificado; 3) Reação de sequenciamento; 4) Purificação do DNA amplificado; 5) Corrida em polímero. O polímero utilizado foi o 3130 POP-7 e o equipamento foi o *Applied ABI 3130 (Applied Biosystems)*. A análise das seqüências resultantes e a identificação alélica foram realizadas através do programa *Assign 3.5* da *Conexio Genomics*. As demais duplas (Receptores, N=87 e Doadores, N=85) foram genotipados para o gene *HLA-C* por meio da técnica de PCR-SSP (Reação em Cadeia da Polimerase Iniciador Seqüência-Específico - *Polymerase Chain Reaction Sequence-Specific Primer*) empregada pelo “kit” de tipagem *Micro SSP™ HLA Class I C Locus Specific Typing Tray*, da empresa *One Lambda, Inc.* As condições de amplificação da PCR-SSP podem ser observados na Tabela 9. Os princípios destas duas técnicas são apresentados no Anexo II.

TABELA 9. CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DA PCR - SSP PARA TIPAGEM *HLA-C*

TEMPERATURA	TEMPO	Nº DE CICLOS
96°C	2,1 minutos	1 ciclo
63 °C	1 minuto	
96 °C	10 segundos	9 ciclos
63 °C	1 minuto	
96 °C	10 segundos	20 ciclos
59 °C	50 segundos	
72 °C	30 segundos	
4 °C	∞	1 ciclo

5.7. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *KIR*

5.7.1. TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA TOTAL

As análises da expressão dos genes *KIR* (*KIR2DS2*, *KIR2DS4*) genes de referência (*GAPDH* - *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* e *HPRT1* - *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) foram realizadas a partir da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real em conjunto com a reação de Transcrição Reversa do RNA em cDNA (qRT-PCR ou PCR quantitativa) no aparelho Mastercycler® EP Realplex (Eppendorf®). O cDNA foi produzido a partir do RNA total através do uso de iniciadores randômicos e da reação de Transcrição Reversa (RT-qPCR) pelo kit *Superscript III First Stand Synthesis Supermix for qRT-PCR* da empresa Invitrogen. Os parâmetros utilizados na reação de transcrição reversa são apresentados na Tabela 10 e os princípios da técnica são apresentados no Anexo II.

TABELA 10. PARÂMETROS DA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA

Reagentes	Vol/1reação	Parâmetros para Transcrição Reversa		
		Temperatura	Tempo	Procedimento
2x Mix de TR	10uL			
Mix da enzima de TR	2uL	25°C	10Minutos	
Vol RNA uso	8uL	50°C	30Minutos	
DEPC	0uL	85°C	5Minutos	
RNase E. Coli	1uL			Pôr no gelo
Total	21uL			1uL de RNase
[RNA uso]	50ng/uL	37°C	20Minutos	
[cDNA estoque]	50ng/uL			
[cDNA uso]	3ng/uL			

Nota: TR = Transcrição Reversa; [RNA uso] = Concentração do RNA utilizado na reação de transcrição reversa; [cDNA estoque] = Concentração de cDNA após a TR; [cDNA uso] = Concentração do cDNA utilizado na reação de PCR tempo real em um volume de 5uL.

FONTE: KIT *Superscript III First Stand Synthesis Supermix* – Invitrogen ® (2008)

5.7.2. QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DOS GENES *KIR2DS2* E *KIR2DS4* POR PCR EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

Para a análise da expressão dos genes *KIR2DS2* E *KIR2DS4* optou-se pela Quantificação Relativa por meio do método do Cq (Ciclo de Quantificação) Comparativo ($\Delta\Delta Cq$) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Esta notação de Cq, anteriormente nomeada de Ct (*Cycle Threshold*, ponto onde a curva de amplificação ultrapassa o limiar), é sugerida por Bustin e colaboradores (2009). A amostra utilizada como calibradora interplacas foi a 12d, por se tratar de um indivíduo doador, que possui ambos os genes e cuja dupla não foi analisada. No presente estudo utilizamos o sistema *SYBR® Green* (Applied Biosystems), pois como agente fluorescente intercalante de fita dupla, possibilita a determinação da especificidade dos iniciadores e da produção indesejada de possíveis dímeros de iniciadores através da curva de dissociação (*melting curve*). O equipamento utilizado foi o MasterCycler® EP Realplex da Eppendorf e os dados de quantificação obtidos após análise no software Realplex 2.2 da empresa Eppendorf.

5.7.2.1. INICIADORES E REAÇÃO qRT-PCR

Dois oligonucleotídeos iniciadores são necessários para realizar a quantificação relativa, ou seja, aqueles específicos para genes referência, os quais possuem expressão constitutiva e os iniciadores para os genes alvo. Os genes referência atuam como normalizadores da expressão gênica entre as diferentes amostras e as distintas condições experimentais. O uso destes destina-se a corrigir eventuais variações relativas ao: Número total de células provenientes da extração; eficiências da extração de RNA, da reação de Transcrição Reversa e da amplificação; pipetagem e degradação dos ácidos nucleicos (RNA ou cDNA) (MENDES, 2010).

Algumas características devem ser apresentadas por estes genes, como por exemplo, a expressão próxima à faixa do gene de estudo e homogênea entre as diferentes amostras e condições experimentais (MENDES, 2010).

No presente estudo dois genes de referência foram utilizados: o *GAPDH* gene que codifica uma enzima atuante na glicólise (*Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase*) (BARBER, 2005); e *HPRT1* que codifica a *Hipoxantina Fosforibosiltransferase 1* que desempenha um papel central na geração de nucleotídeos purina.

Os iniciadores para estes genes são apresentados na tabela 11 e o teste de estabilidade na figura 18.

TABELA 11. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA OS GENES REFERÊNCIA (*GAPDH* e *HPRT1*) E ALVOS (*KIR2DS2* e *KIR2DS4*)

	Iniciador	5'- Sequência -3'	pb	PrimerBlast			OligoAnalyzer			Média			Concentração			
				TM	TM	TM	TM	TA (°C)	GC%	Start	Stop	pb	Fragm	Estoque	Uso	FONTE
Referência	GAPDHf	5'- GAAATCCCATCACCATCTCCAGG -3'	24	55,24	57,60	56,42	61,40	50,00%	314	337	119	200pM	10pM	B		
	GAPDhr	5'- GAGCCCCAGCCTTCTCCATG -3'	20	56,72	60,50	58,61	61,40	60,00%	414	433		200pM	10pM	B		
	HPRT1F	5'- TGACACTGGCAAACAATGCA -3'	21	53,68	56,00	54,84	61,40	42,86%	578	598	94	200pM	10pM	B		
	HPRT1R	5'- GGTCCTTTTACCCAGCAAGCT -3'	21	55,20	58,00	56,60	61,40	52,38%	651	671		200pM	10pM	B		
Alvo	KIR2DS2F	5'- CTGCACAGAGAGGGGAAGTA -3'	20	52,56	56,00	54,28	61,40	55,00%	197	206	260	200pM	10pM	A		
	KIR2DS2R	5'- GTCACGCTCTCTCCTGCCAA -3'	20	56,36	59,50	57,93	61,40	60,00%	437	456		200pM	10pM	A		
	KIR2DS4F	5'- CTGGCCCTCCAGGTCA -3'	17	54,35	59,90	57,13	61,40	70,59%	140	156	200pM	10pM	C			
	KIR2DS4R2	5'- TCTGTAGGTTCTGCAAGGACAG -3'	23	52,89	55,70	54,30	61,40	50,00%	322	344	204	200pM	10pM	C		

Nota: pb = pares de base; TM = temperatura de *melting*; *PrimerBlast* TM = temperatura de *melting* fornecida pelo software *PrimerBlast*; *OligoAnalyzer* TM = temperatura de *melting* fornecida pela

software *OligoAnalyzer*; TA (°C) = temperatura de anelamento utilizada nas reações; GC% = conteúdo de bases G e C em porcentagem; *Start* e *Stop* = posições de início e fim do anelamento do iniciador na sequência do cDNA do gene alvo; pb Fragm = tamanho do fragmento amplificado.
 FONTE: A) McERLEAN, C.; GONZALEZ, A.A.; CUNNINGHAM, R.; MEENAGH, A.; SHOVLIN, T.; MIDDLETON, D. Differential RNA expression of KIR alleles. *Immunogenetics* 62: 431-440; 2010.
 B) Disponível em <http://www.rtpimerdb.org/> Último acesso em: 2010. C) O Autor (2009).

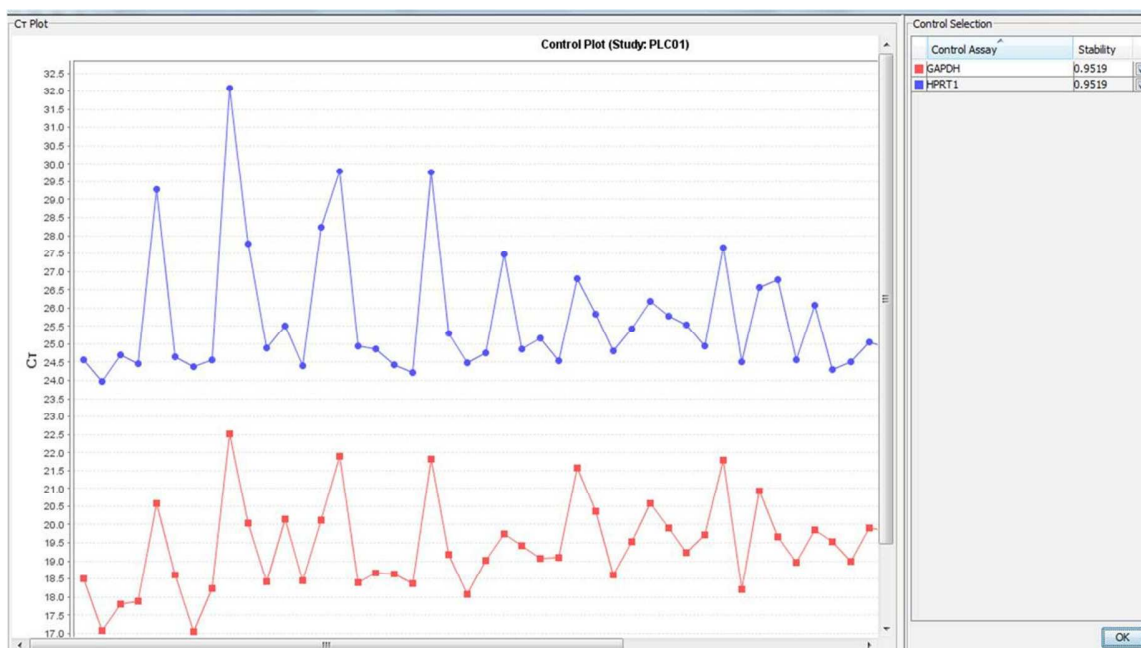


FIGURA 18. TESTE DE ESTABILIDADE DOS GENES DE REFERÊNCIA GAPDH E HPRT1 (95,19%)

FONTE: DataAssit® software (2011)

A ferramenta *Primer Blast* (recentemente desenvolvida e incorporada ao site do NCBI, união entre o programa *Primer3* e o banco de dados do *Blast* (Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/iprimer-blast/primerinfo.html>; Último acesso em: 16/08/10)) foi empregada para obtenção do melhor par de iniciadores para o gene *KIR2DS4*. Para analisar a formação de dímeros, heterodímeros e grampos de todos os iniciadores utilizamos a ferramenta *OligoAnalyzer* fornecida pela empresa IDT (Disponível em: <http://www.idtdna.com/ANALYZER/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx> Último acesso em: 16/08/10). Posteriormente, com o auxílio da curva de dissociação,

podemos alterar as concentrações de iniciadores *forward* ou *reverse* para reduzir a formação destas estruturas indesejadas.

Os constituintes da reação de qPCR são: o Mix de *SYBR®* Green, os iniciadores (*Forward* e *Reverse*) e o volume de água ultrapura (TABELA 12). A termociclagem utilizada na qPCR é apresentada na Tabela 13.

TABELA 12. VOLUMES DOS COMPONENTES DA REAÇÃO DE qPCR.

Reagentes	Volumes/Reação (uL)			
	<i>GAPDH</i>	<i>HPRT1</i>	<i>KIR2DS2</i>	<i>KIR2DS4</i>
Mix SYBR Green	12,5	12,5	12,5	12,5
Forward	0,5	0,5	0,5	1,0
Reverse	0,5	0,5	0,5	0,5
H ₂ O	6,5	6,5	6,5	6,0
Total	20,0	20,0	20,0	20,0
cDNA [3ng/uL]	5,0	5,0	5,0	5,0
Volume Total	25,0	25,0	25,0	25,0

FONTE: O Autor (2010).

TABELA 13. CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DA qPCR

Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
50	2 minutos	1
95	10 minutos	1
95	15 segundos	40
61,4	1 minuto	
Curva de Dissociação		

FONTE: O Autor (2010).

Para assegurar uma maior confiabilidade dos dados da quantificação relativa em qPCR são necessários alguns passos iniciais: a) Validação da qPCR; b) Verificação da estabilidade dos genes de referência; c) Definição da amostra calibradora; d) Delineamento dos experimentos.

5.7.3. VALIDAÇÃO DA qPCR

O método do Cq Comparativo exige a validação das reações através da construção de curva padrão (uma amplificação do gene através de uma diluição seriada com fator de diluição de 10 vezes) (FIGURA 19) para verificar a eficiência da reação (concentração ideal dos reagentes e da amostra, além do anelamento específico dos iniciadores ao fragmento de interesse). A eficiência de reação é a medida da taxa em que a polimerase converte os reagentes (dNTPs, oligonucleotídeos e cDNA) em produto amplificado (TAYLOR *et al.*, 2010). Esta curva padrão deve ser realizada para cada gene de interesse (ou alvo) e para os genes de referência e, deve possuir ao menos cinco diluições. Um exemplo de curva padrão, para o *GAPDH*, pode ser observado na figura 20.

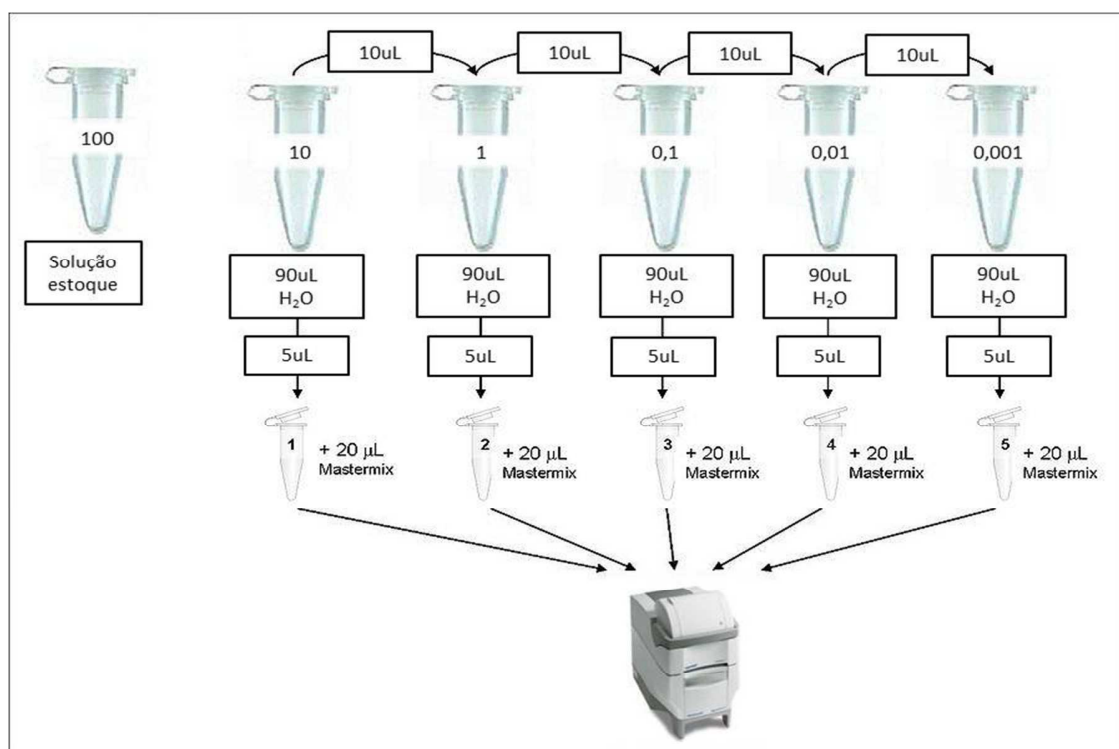


FIGURA 19. DILUIÇÃO SERIADA PARA PRODUÇÃO DA CURVA PADRÃO DE UM GENE ALVO.

FONTE: Modificado de: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3b/Serial_Dilution_\(to_PCR\).jpg/900px-Serial_Dilution_\(to_PCR\).jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3b/Serial_Dilution_(to_PCR).jpg/900px-Serial_Dilution_(to_PCR).jpg) Acesso em: 20/05/10.

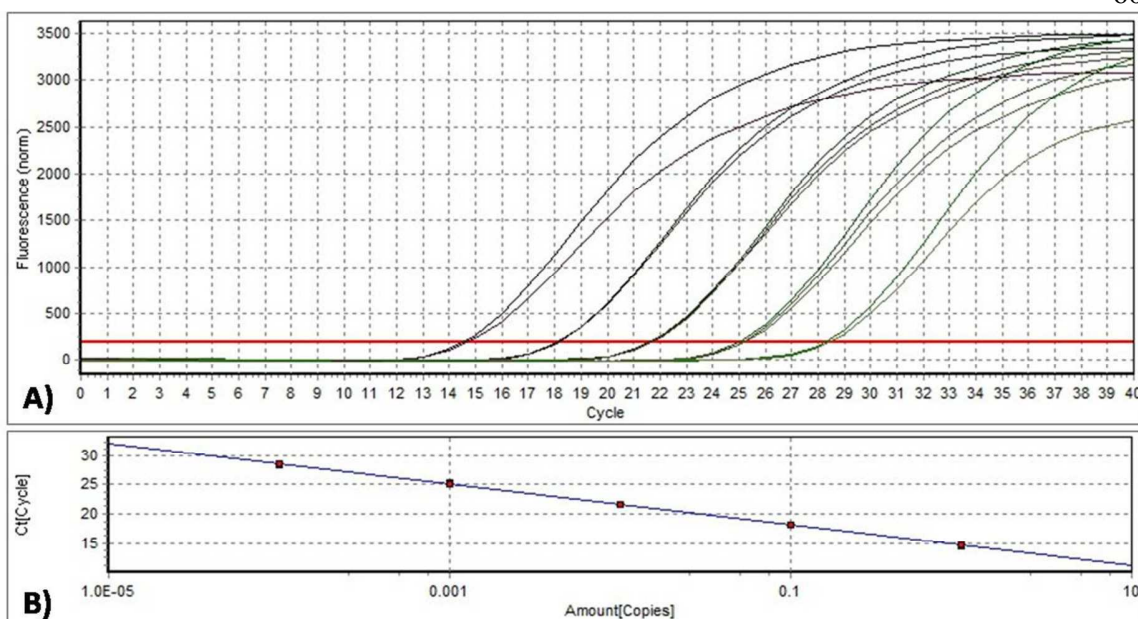


FIGURA 20. CURVA PADRÃO PARA O GENE REFERÊNCIA *GAPDH*.

Nota: A) Vista não logarítmica da curva de amplificação. B) Gráfico de eficiência da reação.

FONTE: Software realplex 2.2 (2010).

Os valores de *Slope*, interseção do eixo Y, Eficiência e R^2 para as curvas padrão das validações dos genes *GAPDH*, *HPRT1*, *KIR2DS2* e *KIR2DS4*, são apresentados na tabela 14.

TABELA 14. VALORES DE SLOPE, INTERSEÇÃO DO EIXO Y, EFICIÊNCIA E R^2 DAS CURVAS PADRÃO

GENES	SLOPE	Interseção Y	EFICIÊNCIA	R^2
GAPDH	-3,449	14,73	0,95	1,000
HPRT1	-3,455	20,60	0,95	0,995
KIR2DS2	-3,441	16,20	0,95	0,999
KIR2DS4	-3,445	15,47	0,95	0,999

Nota: Os genes referência estão em negrito.

A representação gráfica da comparação dois a dois das curvas padrão entre os genes referência e os genes alvo é apresentada nas figuras 21 e 22. As diferenças entre os Cqs devem ser próximas para cada uma das diluições (BUSTIN et al, 2009).

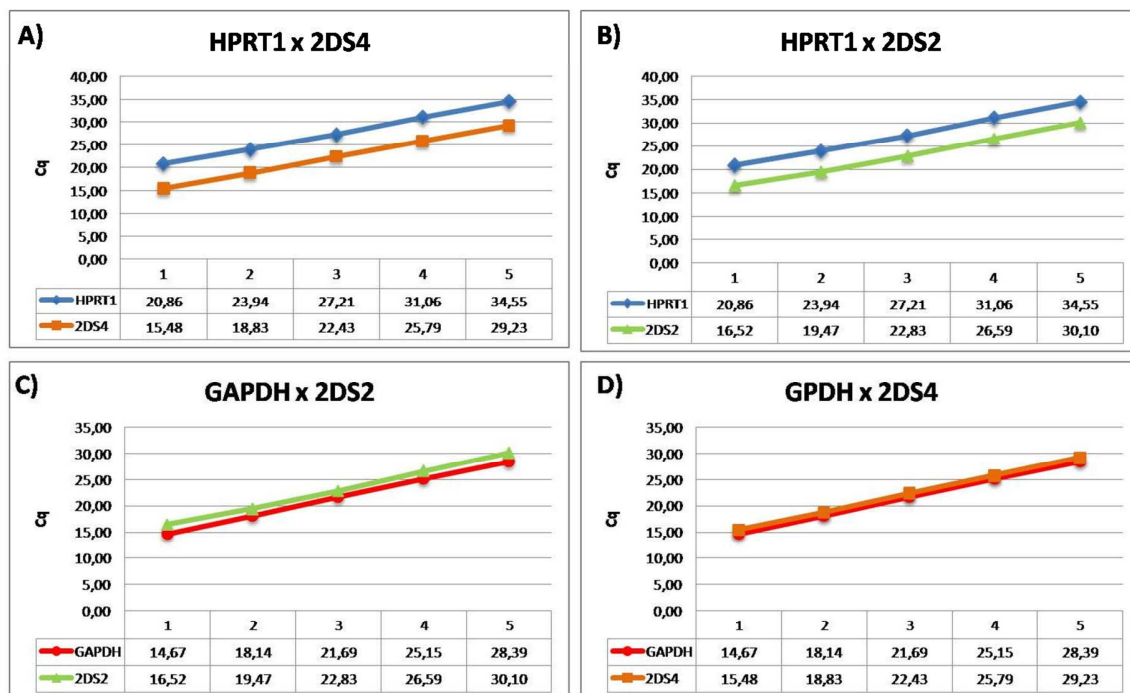


FIGURA 21. COMPARAÇÃO ENTRE AS CURVAS PADRÃO DOS GENES REFERÊNCIA E OS GENES ALVO. FONTE: O Autor (2011)

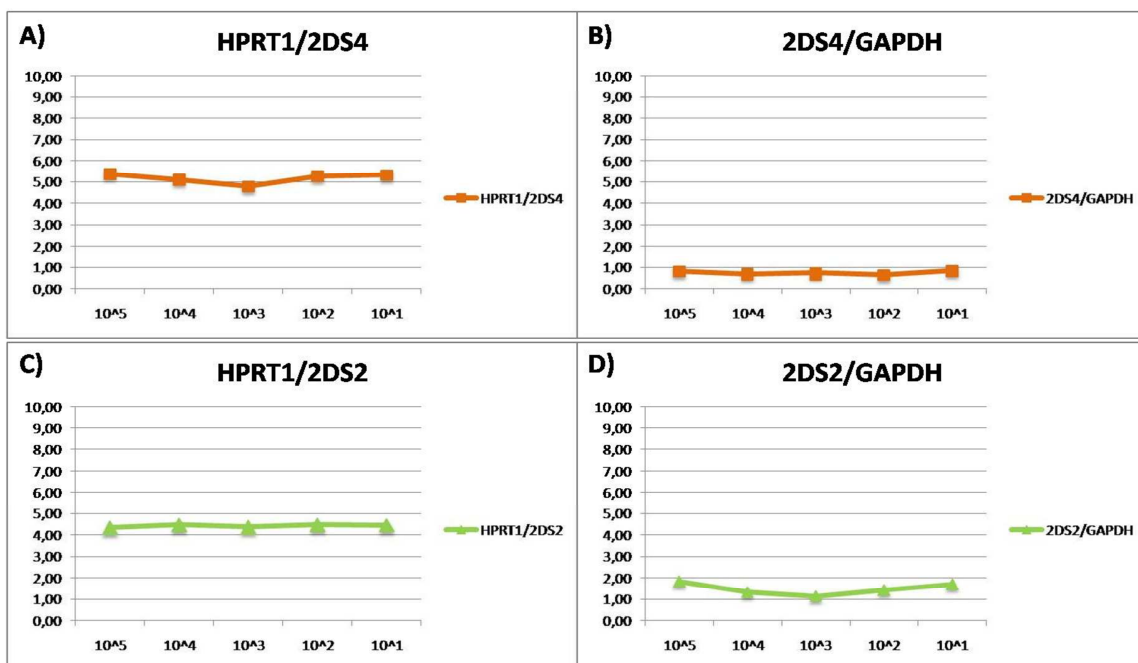


FIGURA 22. ΔC_q ENTRE OS GENES REFERÊNCIA E OS GENES ALVO.

Nota: As diferenças entre os pontos de uma mesma comparação não superam 1 unidade.

FONTE: O Autor (2011).

5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças, entre as médias de idade dos receptores com rejeição e sem foram testadas a partir do teste de *Student* ou teste de *t* realizado com o auxílio do programa BioEstat 5.0 (2007). As análises do grau de parentesco entre paciente-doador foram realizadas a partir de tabelas de contingência com o auxílio do programa BioEstat 5.0 (2007).

A freqüência da presença de cada um dos 16 genes *KIR* para todas as amostras, dentro do grupo de Receptores e do grupo de Doadores, foram obtidas por contagem direta a partir de uma tabela geral de dados produzida no programa Microsoft Excel (2007).

Para calcular as freqüências gênicas, primeiramente assumiu-se que as freqüências observadas para os genes *KIR* seguem as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Duas formas de cálculo de freqüência gênica foram adotadas, sendo que para uma delas convencionou-se que a freqüência de ausência do gene é igual a q^2 , onde extraindo-se a raiz quadrada obtém-se o valor de q , sendo $p = 1 - q$, temos o valor de p . O erro padrão destas freqüências foi calculado a partir da fórmula $\sqrt{(pq)/2N}$. Para os genes cuja freqüência da presença não era 100%, foi possível estimar a freqüência dos heterozigotos a partir de $2pq$ (duas vezes a freqüência de p vezes a freqüência de q). A freqüência de p^2 foi calculada levando-se em conta que a soma das freqüências, p^2 , $2pq$ e q^2 é igual a 1 (ou seja, 100%). Foi também calculado o erro padrão destas freqüências segundo a fórmula: $\sqrt{(pq)/2N}$, onde N é igual ao tamanho total da amostra utilizada.

O segundo método empregado para se calcular a freqüência gênica foi através da fórmula de Bernstein, onde: freqüência gênica = $1 - \sqrt{(1-f)}$, sendo f a freqüência da presença do gene observada. Esta formula também assume proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Ambos os métodos coincidem em um mesmo resultado.

As freqüências dos portadores serão comparadas (dentro de cada grupo) através de tabelas de contingência 2x2 e Teste Exato de Fisher, com o uso do

programa BioEstat 5.0 (ano 2007). Quando o número amostral do grupo analisado foi inferior a 10, o que poderia reduzir a acurácia do teste de χ^2 , utilizou-se a correção de Yates. Esta correção consiste na subtração de 0,5 dos desvios entre as frequências observada e esperada.

Para as comparações que mostraram significância ($p < 0,05$) foi calculado o risco relativo (Odds Ratio – OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%, através do método de Woolf. Se algum dado da tabela apresentou o valor zero, foi utilizada a correção de Haldane que consiste em acrescentar o valor de 0,5 a todas as células da tabela de contingência. Esta correção tem como objetivo prevenir impossibilidades do cálculo do OR quando da divisão de um valor por zero.

Em uma das análises das frequências dos genes *KIR*, foi utilizada uma razão entre o número de locos ativadores e inibidores para estabelecer perfis ativadores ou inibidores representados por diferentes classes (Inibição, Média Inibição, Média Ativação e Ativação), onde razões igual a 0,0 representam um perfil Inibidor, 0,5 para Médio Inibidor, 1,0 para Médio Ativador e para a situação onde existem mais ativadores do que inibidores um perfil Ativador.

As análises para comparação dos perfis de expressão dos genes *KIR* nos diferentes estádios do transplante, foram analisados no *software* DataAssist[®], através do método do Cq Comparativo conforme apresentado na metodologia deste trabalho (XIA et al., 2010).

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISE DA PRESENÇA DOS LOCOS *KIR*

Genes codificantes para receptores Inibidores

As freqüências de presença/ausência dos 16 genes *KIR* para Receptores e Doadores, assim como os valores estimados de p , q , p^2 , $2pq$ e q^2 , são apresentados na tabela 15.

No grupo dos pacientes receptores renais, os genes *KIR2DL* que codificam moléculas inibidoras, apresentaram as seguintes freqüências: *KIR2DL1* (79%), *KIR2DL2* (51%), *KIR2DL3* (93%) e *KIR2DL5* (46%). Entre os Doadores, as freqüências observadas foram *KIR2DL1* (88%), *KIR2DL2* (51%), *KIR2DL3* (87%), *KIR2DL5* (53%). O gene de moldura *KIR2DL4* estava presente em todos os indivíduos analisados (Receptores e Doadores).

Os genes *KIR3DL* foram observados com freqüência de 95% para *KIR3DL1* e 100% para os genes *KIR3DL2* e *KIR3DL3* (estes últimos, genes de “moldura”) para os indivíduos Receptores. Entre os Doadores, estes genes apresentaram as freqüências de 94% (*KIR3DL1*) e 100% (*KIR3DL2* e *KIR3DL3*).

Genes codificantes para receptores Ativadores

Entre os genes codificantes de receptores *KIR* com função ativadora, na amostra de Receptores Renais observou-se: *KIR2DS1* (34%), *KIR2DS2* (51%), *KIR2DS3* (26%), *KIR2DS4* (91%) e *KIR2DS5* (23%). O gene *KIR3DS1*, que é o único gene codificante para receptor ativador com três domínios extracelulares, apresentou uma freqüência de 36% entre os indivíduos Receptores e 37% entre Doadores. Entre os Doadores, o gene *KIR2DS1* esteve presente em 35% dos indivíduos, o *KIR2DS2* em 51%, o *KIR2DS3* em 38%, *KIR2DS4* em 87% e o *KIR2DS5* em 19% dos indivíduos analisados.

Os dois pseudogenes (*KIR2DP1* e *KIR3DP1*) mostraram-se presentes em 99% e 100% dos Pacientes renais (Receptores), respectivamente. Entre os

Doadores estes genes apresentaram freqüências de 98% (*KIR2DP1*) e 100% (*KIR3DP1*).

Estas freqüências foram comparadas entre Receptores e seus Doadores, e não demonstraram diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos ($\chi^2= 3,782$; $p=0,9984$; $GL=15$).

TABELA 15. FREQUÊNCIA DOS GENES *KIR* (PORTADORES E GÊNICAS) EM RECEPTORES E DOADORES RENAI

	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DP1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DL1	3DL2	3DL3	3DP1	3DS1
REC (110)	87	56	102	110	51	109	37	56	29	100	25	105	110	110	110	40
freq portador	0,79	0,51	0,93	1,00	0,46	0,99	0,34	0,51	0,26	0,91	0,23	0,95	1,00	1,00	1,00	0,36
freq p	0,54	0,30	0,73	1,00	0,27	0,90	0,19	0,30	0,14	0,70	0,12	0,79	1,00	1,00	1,00	0,20
desv.pad.	± 0,03	± 0,03	± 0,03	NE	± 0,03	± 0,02	± 0,03	± 0,03	± 0,02	± 0,03	± 0,02	± 0,03	NE	NE	NE	± 0,03
freq q	0,46	0,70	0,27	0,00	0,73	0,10	0,81	0,70	0,86	0,30	0,88	0,21	0,00	0,00	0,00	0,80
desv.pad.	± 0,03	± 0,03	± 0,03	NE	± 0,03	± 0,02	± 0,03	± 0,03	± 0,02	± 0,03	± 0,02	± 0,03	NE	NE	NE	± 0,03
p ²	0,29	0,09	0,53	1,00	0,07	0,82	0,03	0,09	0,02	0,49	0,01	0,62	1,00	1,00	1,00	0,04
2pq	0,50	0,42	0,39	NE	0,39	0,17	0,30	0,42	0,24	0,42	0,21	0,34	NE	NE	NE	0,32
q ²	0,21	0,49	0,07	0,00	0,54	0,01	0,66	0,49	0,74	0,09	0,77	0,05	0,00	0,00	0,00	0,64
DOA (100*)	88	51	87	100	53	98	35	51	38	87	19	94	100	100	100	37
freq portador	0,88	0,51	0,87	1,00	0,53	0,98	0,35	0,51	0,38	0,87	0,19	0,94	1,00	1,00	1,00	0,37
freq p	0,65	0,30	0,64	1,00	0,31	0,86	0,19	0,30	0,21	0,64	0,10	0,76	1,00	1,00	1,00	0,21
desv.pad.	± 0,03	± 0,03	± 0,03	NE	± 0,03	± 0,02	± 0,03	± 0,03	± 0,03	± 0,03	± 0,02	± 0,03	NE	NE	NE	± 0,03
freq q	0,35	0,70	0,36	0,00	0,69	0,14	0,81	0,70	0,79	0,36	0,90	0,24	0,00	0,00	0,00	0,79
desv.pad.	± 0,03	± 0,03	± 0,03	NE	± 0,03	± 0,02	± 0,03	± 0,03	± 0,03	± 0,03	± 0,02	± 0,03	NE	NE	NE	± 0,03
p ²	0,43	0,09	0,41	1,00	0,10	0,74	0,04	0,09	0,05	0,41	0,01	0,57	1,00	1,00	1,00	0,04
2pq	0,45	0,42	0,46	NE	0,43	0,24	0,31	0,42	0,33	0,46	0,18	0,37	NE	NE	NE	0,33
q ²	0,12	0,49	0,13	0,00	0,47	0,02	0,65	0,49	0,62	0,13	0,81	0,06	0,00	0,00	0,00	0,63

Nota: Os genes de “moldura” são apresentados em negrito. REC = Receptores renais; DOA = Doadores dos receptores; freq portador = frequência de indivíduos portadores do gene, são denominados de portadores pois não é possível distinguir indivíduos heterozigotos e homozigotos quando o gene está presente. Desv.pad. = Desvio Padrão. Freq p = Estimativa da frequência de p; Freq q = Estimativa da frequência de q. * Os valores de indivíduos analisados (ou frequência absoluta) discordantes entre REC e DOA são resultantes de doadores cadáveres em que a genotipagem não foi possível. FONTE: O Autor (2011).

Os dados de Receptores renais e Doadores foram subdivididos em dois grupos, aqueles cujo receptor da dupla (REC/DOA) apresentou episódios de rejeição aguda (REC P e DOA P) e os que não apresentaram (REC C e DOA C). As frequências dos portadores dos genes *KIR* destes grupos foram comparadas e são apresentadas na tabela 16. Nenhuma das comparações (REC P vs REC C ($\chi^2= 8,625$; $p=0,90$; $GL=15$) DOA P vs DOA C ($\chi^2= 4,868$; $p=0,99$; $GL=15$) REC P vs DOA P ($\chi^2= 3,653$; $p=0,99$; $GL=15$) REC C vs DOA C ($\chi^2= 6,558$; $p=0,97$; $GL=15$)) apontaram diferenças significativas entre as frequências dos genes nestes grupos.

Foram comparadas ainda as frequências de portadores para cada gene *KIR* entre os grupos Receptores (REC P e REC C) (TABELA 17). A comparação entre os REC P e os REC C apresentou diferenças significativas para os genes *KIR2DL1* ($p=0,009$) (OR = 4,0139; IC 95% = 1,4418-11,1743), *KIR2DS4* ($p=0,02$) (OR = 0,10; IC 95% = 0,01 – 0,89) e *KIR2DS5* ($p=0,02$) (OR = 3,03; IC 95% = 1,1478-8,4106). O gene *KIR3DL1* apresentou apenas uma tendência a significância ($p=0,06$) (OR = 0,20; IC 95% = 0,0226-1,7714). O Gráfico 01 representa estas comparações. Contudo, a estratificação dos grupos RECP e RECC pelo número de *mismatches* HLA, apresenta estas diferenças como não mais estatisticamente significantes. Entretanto, o gene *KIR2DL1* apresenta uma tendência a esta para duas classes de mismatches HLA (0-2MM $p = 0,09$; e 3MM $p = 0,08$) (TABELA 17).

TABELA 16. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS PORTADORES DOS GENES *KIR* EM RECEPTORES E DOADORES RENAIIS COM E SEM REJEIÇÃO AGUDA

	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DP1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DL1	3DL2	3DL3	3DP1	3DS1		
	freq	freq	freq	freq	freq	freq	freq	freq	freq	freq	freq	freq	freq	freq	freq	freq		
	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	(N)	REC P x REC C	REC P x DOA P
REC P (57)	0,89	0,51	0,95	1,00	0,47	1,00	0,40	0,51	0,26	0,84	0,32	0,91	1,00	1,00	1,00	0,42		
	51	29	54	57	27	57	23	29	15	48	18	52	57	57	57	24	$\chi^2 = 8,625$ $p = 0,90$	$\chi^2 = 3,653$ $p = 0,99$
REC C (53)	0,68	0,51	0,91	1,00	0,45	0,98	0,26	0,51	0,26	0,98	0,13	1,00	1,00	1,00	1,00	0,30		
	36	27	48	53	24	52	14	27	14	52	7	53	53	53	53	16		
																	DOA P x DOA C	REC C x DOA C
DOA P (50*)	0,92	0,42	0,92	1,00	0,50	1,00	0,36	0,42	0,34	0,86	0,18	0,92	1,00	1,00	1,00	0,36		
	46	21	46	50	25	50	18	21	17	43	9	46	50	50	50	18	$\chi^2 = 4,868$ $p = 0,99$	$\chi^2 = 6,558$ $p = 0,97$
DOA C (47*)	0,83	0,62	0,81	1,00	0,57	0,96	0,36	0,62	0,43	0,87	0,21	0,96	1,00	1,00	1,00	0,40		
	39	29	38	47	27	45	17	29	20	41	10	45	47	47	47	19		

Nota: Os genes de "moldura" são apresentados em negrito. REC P= Receptores renais que apresentaram episódio de rejeição aguda; DOA P= Doadores dos receptores REC P; REC C= Receptores sem rejeição; DOA C= Doadores de REC C; N= Frequência absoluta. * Os valores de frequência absoluta discordantes entre REC e DOA são resultantes de doadores cadáveres em que a genotipagem não foi possível.

FONTE: O Autor (2011).

TABELA 17. COMPARAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE PORTADORES (LOCO A LOCO) ENTRE OS GRUPOS DE RECEPTORES COM E SEM REJEIÇÃO E POSTERIOR ESTRATIFICAÇÃO POR NÚMERO DE *MISMATCHES* HLA.

	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DP1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DL1	3DL2	3DL3	3DP1	3DS1
REC P (57)	51	29	54	57	27	57	23	29	15	48	18	52	57	57	57	24
<i>freq port</i>	0,89	0,51	0,95	1,00	0,47	1,00	0,40	0,51	0,26	0,84	0,32	0,91	1,00	1,00	1,00	0,42
REC C (53)	36	27	48	53	24	52	14	27	14	52	7	53	53	53	53	16
<i>freq port</i>	0,68	0,51	0,91	1,00	0,45	0,98	0,26	0,51	0,26	0,98	0,13	1,00	1,00	1,00	1,00	0,30
	p=0,009	p=1,00	p=0,48	p=1,00	p=0,85	p=0,48	p=0,16	p=1,00	p=1,00	p=0,02	p=0,02	p=0,06	p=1,00	p=1,00	p=1,00	p=0,24
REC P (57)	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DP1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DL1	3DL2	3DL3	3DP1	3DS1
0-2MM	13	8	13	15	8	15	7	8	6	14	6	14	15	15	15	7
<i>freq port</i>	0,87	0,53	0,87	1,00	0,53	1,00	0,47	0,53	0,40	0,93	0,40	0,93	1,00	1,00	1,00	0,47
3MM	26	13	26	27	11	27	8	13	6	23	7	26	27	27	27	10
<i>freq port</i>	0,96	0,48	0,96	1,00	0,41	1,00	0,30	0,48	0,22	0,85	0,26	0,96	1,00	1,00	1,00	0,37
4-6MM	12	8	15	15	8	15	8	8	3	11	5	12	15	15	15	7
<i>freq port</i>	0,80	0,53	1,00	1,00	0,53	1,00	0,53	0,53	0,20	0,73	0,33	0,80	1,00	1,00	1,00	0,47
REC C (53)	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DP1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DL1	3DL2	3DL3	3DP1	3DS1
0-2MM	19	16	29	32	16	31	9	16	9	31	5	32	32	32	32	12
<i>freq port</i>	0,59	0,50	0,91	1,00	0,50	0,97	0,28	0,50	0,28	0,97	0,16	1,00	1,00	1,00	1,00	0,38
3MM	9	6	11	12	4	12	3	6	2	12	1	12	12	12	12	3
<i>freq port</i>	0,75	0,50	0,92	1,00	0,33	1,00	0,25	0,50	0,17	1,00	0,08	1,00	1,00	1,00	1,00	0,25
4-6MM	7	4	7	8	3	8	1	4	2	8	1	8	8	8	8	1
<i>freq port</i>	0,88	0,50	0,88	1,00	0,38	1,00	0,13	0,50	0,25	1,00	0,13	1,00	1,00	1,00	1,00	0,13
0-2MM	p=0,09	p=1,00	p=0,99	p=1,00	p=1,00	p=1,00	p=0,32	p=1,00	p=0,51	p=1,00	p=0,14	p=1,00	p=1,00	p=1,00	p=1,00	p=0,75
3MM	p=0,08	p=1,00	p=1,00	p=1,00	p=0,73	p=1,00	p=1,00	p=1,00	p=1,00	p=0,29	p=0,39	p=1,00	p=1,00	p=1,00	p=1,00	p=0,71
4-6MM	p=1,00	p=1,00	p=0,35	p=1,00	p=0,67	p=1,00	p=0,09	p=1,00	p=0,99	p=0,26	p=0,37	p=0,29	p=1,00	p=1,00	p=1,00	p=0,18

Nota: Os genes de “moldura” são apresentados em negrito. REC P= Receptores renais que apresentaram episódio de rejeição aguda; REC C= Receptores sem rejeição. MM = número de *mismatches* HLA (A, B e DR). FONTE: O Autor (2011).

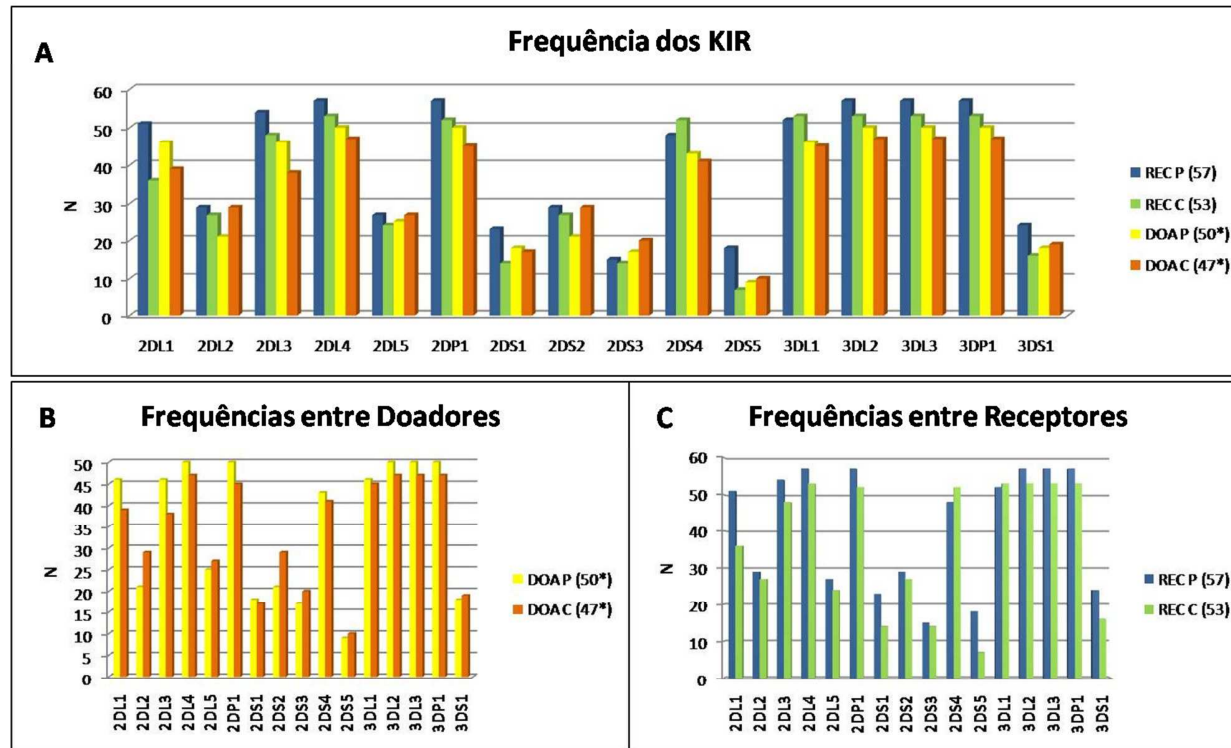
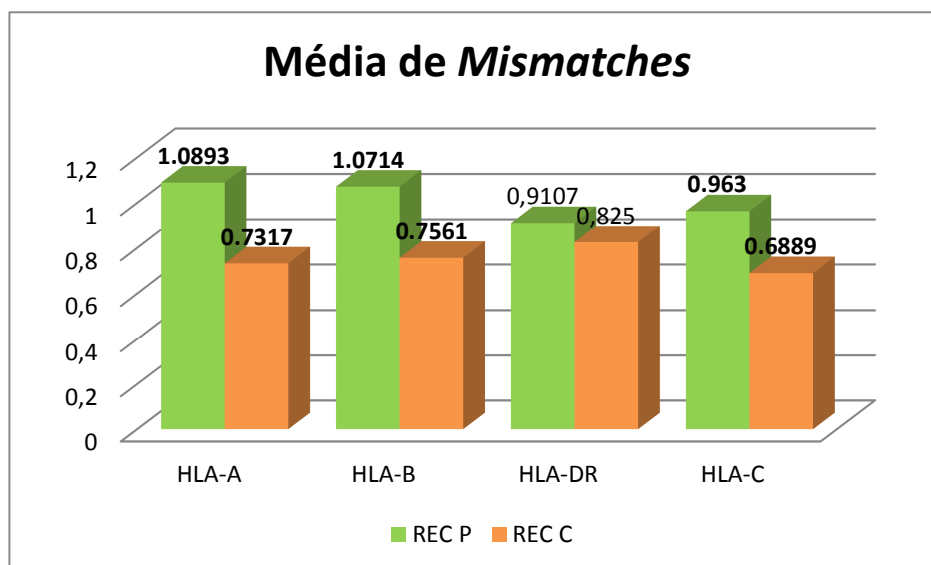


GRÁFICO 01. A) FREQUÊNCIA DOS GENES *KIR* ENTRE OS RECEPTORES E DOADORES COM E SEM REJEIÇÃO AGUDA; B) FREQUÊNCIA DOS GENES *KIR* EM DOADORES EM QUE A DUPLA APRESENTOU OU NÃO REJEIÇÃO; C) FREQUÊNCIA DOS GENES *KIR* EM RECEPTORES RENAIIS COM E SEM REJEIÇÃO.

Nota: REC P = Receptores Pacientes (apresentaram episódio de rejeição aguda); REC C = Receptores Controles (não apresentaram episódios de rejeição aguda); DOA P = Doadores de REC P; DOA C = Doadores de REC C. * Os valores de frequência absoluta discordantes entre REC e DOA são resultantes de doadores cadáveres em que a genotipagem não foi possível. FONTE: O Autor (2011)

O número médio de *mismatches* (MM, Incompatibilidades) para os genes *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-DR* e *HLA-C* foi comparado entre Receptores e Doadores COM e SEM rejeição. O gráfico 02 representa esta análise. Ao todo três locos apresentaram diferenças significativas entre as médias de *mismatches*, sendo estes o *HLA-A* ($t = 2,80$; $p = 0,006$), *HLA-B* ($t = 2,59$; $p = 0,011$) e *HLA-C* ($t = 2,24$; $p = 0,03$). Entre as duplas Receptor/Doador sem episódios de rejeição aguda 60% dos indivíduos apresentam de zero a dois *mismatches HLA*, 25% com três MM e 15% com quatro a seis MM. Já as duplas que apresentaram rejeição estas frequências são: 26% com zero a dois MM, 47% com três e 26% com quatro a seis *mismatches HLA*.

GRÁFICO 02. PERFIL DA COMPATIBILIDADE HLA ENTRE RECEPTORES E DOADORES CONSIDERANDO-SE O NÚMERO MÉDIO DE *MISMATCHES* PARA OS LOCOS *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-DR* E *HLA-C*.



Nota: REC P = Receptores Pacientes (apresentaram episódio de rejeição aguda); REC C = Receptores Controles (não apresentaram episódios de rejeição aguda). FONTE: O Autor (2011).

As duplas foram analisadas quanto sua identidade dos locos *KIR* (com ligantes *HLA-C*) entre os Receptores renais e seus doadores nos diferentes níveis de *mismatches HLA* (0-2, 3 e 4-6) (TABELA 18). A identidade *KIR* pode ser definida como a presença de um determinado loco tanto no Receptor quanto no

Doador ou a ausência deste em ambos. A análise não apresentou diferenças significativas para nenhum dos locos testados, apenas tendências para os genes *KIR2DL1* (Teste-G = 5,37; p = 0,07) e *KIR2DS1* (Teste-G = 5,69; p = 0,06). O *Odds Ratio* foi testado (Identidade para Sucesso e Não identidade para Insucesso) para todas as classes de *mismatches* e nenhuma apresentou significância estatística.

TABELA 18. NÚMERO DE INDIVÍDUOS COM IDENTIDADE DOS GENES *KIR* ENTRE RECEPTORES E SEUS DOADORES COM DIFERENTES GRAUS DE *MISMATCHES* HLA.

	2DL1				2DL2				2DL3				2DS1				2DS2				2DS4			
	I		N		I		N		I		N		I		N		I		N		I		N	
	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC
0-2MM	13	17	1	1	9	13	5	5	12	16	2	2	9	16	5	2	9	13	5	5	12	14	2	4
%	25%	47%	100%	50%	33%	50%	19%	42%	25%	47%	40%	50%	25%	52%	30%	29%	33%	50%	19%	42%	28%	42%	20%	80%
3MM	27	11	0	1	13	8	14	4	25	12	2	0	21	10	6	2	13	8	14	4	23	11	4	1
%	52%	31%	0%	50%	48%	31%	54%	33%	52%	35%	40%	0%	58%	32%	35%	29%	48%	31%	54%	33%	53%	33%	40%	20%
4-6MM	12	8	0	0	5	5	7	3	11	6	1	2	6	5	6	3	5	5	7	3	8	8	4	0
%	23%	22%	0%	0%	19%	19%	27%	25%	23%	18%	20%	50%	17%	16%	35%	42%	19%	19%	27%	25%	19%	24%	40%	0%
Total	52	36	1	2	27	26	26	12	48	34	5	4	36	31	17	7	27	26	26	12	43	33	10	5

Nota: I = Duplas com identidade do loco entre Receptor renal e seu Doador; N = Duplas sem identidade *KIR*. REC P = Receptores Pacientes (apresentaram episódio de rejeição aguda); REC C = Receptores Controles (não apresentaram episódios de rejeição aguda); MM = Número de *mismatches* HLA entre Receptor e Doador.

Foram também comparadas as médias do número total de genes que compõem o repertório *KIR* de Receptores transplantados renais e seus Doadores, bem como o número de genes *KIR* codificantes para receptores *KIR* inibidores e para os ativadores. As análises não demonstraram diferenças significativas entre as médias do número de genes, conforme pode ser observado na Tabela 19. As médias são representadas no gráfico 03.

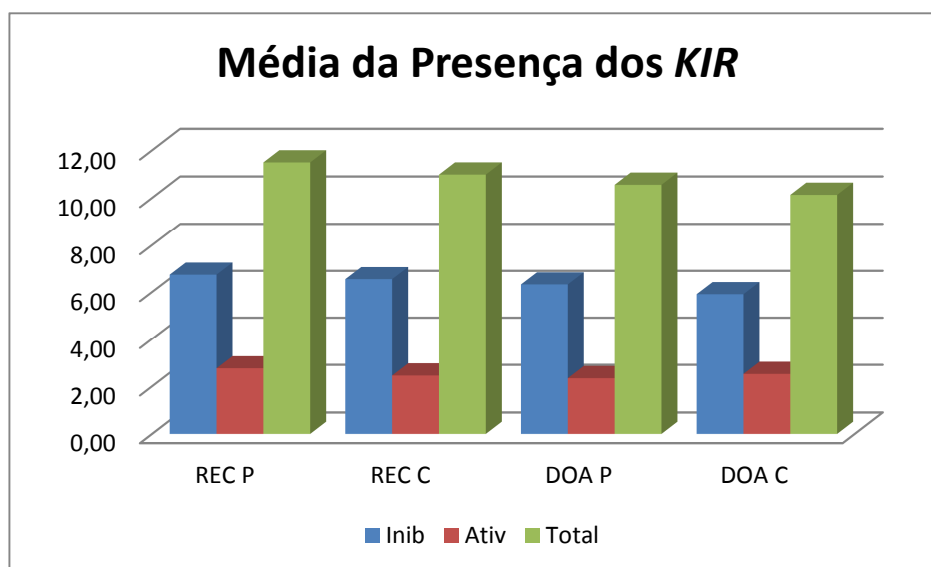
TABELA 19. COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DO NÚMERO DE GENES INIBIDORES, ATIVADORES E TOTAL ENTRE RECEPTORES E DOADORES

		Inibidores	Ativadores	Total de Genes
REC P	Média	6.7368	2.6091	11.4912
	Variância	0.8045	2.2219	5.1472
REC C	Média	6.5472	2.4035	10.9811
	Variância	0.9064	1.9236	4.7881
	t	1.0759	0.865	1.1986
	p (Bilateral)	0.2843	0.3887	0.2332
	IC 99%	-0.2760 a 0.6554	-0.4066 a 0.8178	-0.6142 a 1.6344
DOA P	Média	6.6792	2.4717	11.1509
	Variância	0.7221	2.5617	5.3229
DOA C	Média	6.7872	2.8936	11.6383
	Variância	0.9972	2.271	5.3228
	t	-0.5842	-1.3522	-1.0543
	p (Bilateral)	0.5604	0.1793	0.2943
	IC 99%	-0.5979 a 0.3819	-1.2489 a 0.4051	-1.7125 a 0.7378
REC P	Média	6.7368	2.7544	11.4912
	Variância	0.8045	2.4386	5.1472
DOA P	Média	6.6792	2.4717	11.1509
	Variância	0.7221	2.5617	5.3229
	t	0.3451	-0.9374	0.7796
	p (Bilateral)	0.7307	0.3506	0.4373
	IC 99%	-0.3832 a 0.4984	-1.0794 a 0.5140	-0.8127 a 1.4933
REC C	Média	6.5472	2.4528	10.9811
	Variância	0.9064	1.9833	4.7881
DOA C	Média	6.7872	2.8936	11.6383
	Variância	0.9972	2.271	5.3228
	t	-1.2299	-1.5115	-1.4611
	p (Bilateral)	0.2216	0.1338	0.1471

IC 99% -0.7574 a 0.2773 -1.2137 a 0.3321 -1.8492 a 0.5349

Nota: REC P = Receptores Pacientes (apresentaram episódio de rejeição aguda); REC C = Receptores Controles (não apresentaram episódios de rejeição aguda); DOA P = Doadores de REC P; DOA C = Doadores de REC C.

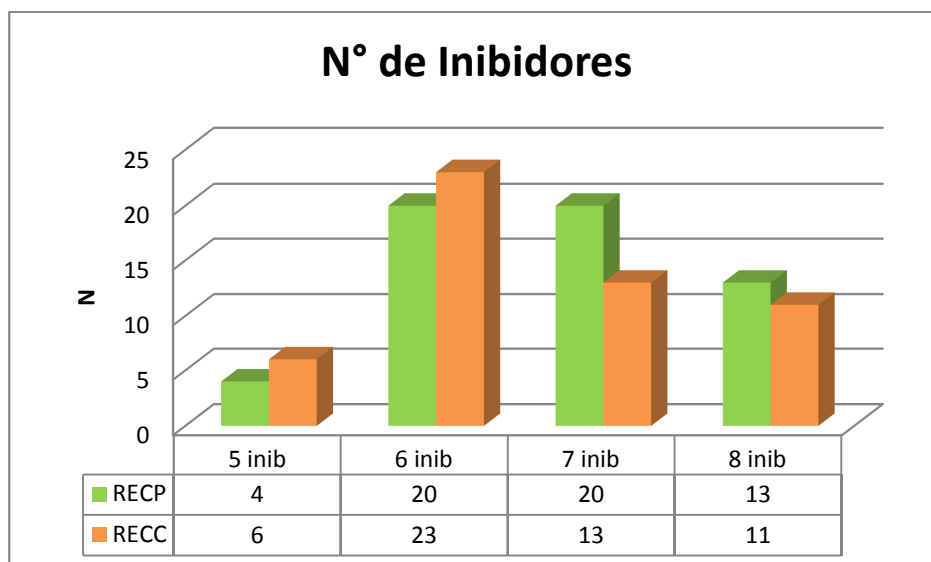
GRÁFICO 03. REPRESENTAÇÃO DAS MÉDIAS DA PRESENÇA DOS GENES *KIR* EM RECEPTORES E DOADORES.



Nota: REC P = Receptores Pacientes (apresentaram episódio de rejeição aguda); REC C = Receptores Controles (não apresentaram episódios de rejeição aguda); DOA P = Doadores de REC P; DOA C = Doadores de REC C; Inib = Genes Inibitórios; Ativ = Genes Ativadores; Total = Somatório de genes inibitórios, ativadores e pseudogenes. FONTE: O Autor (2011)

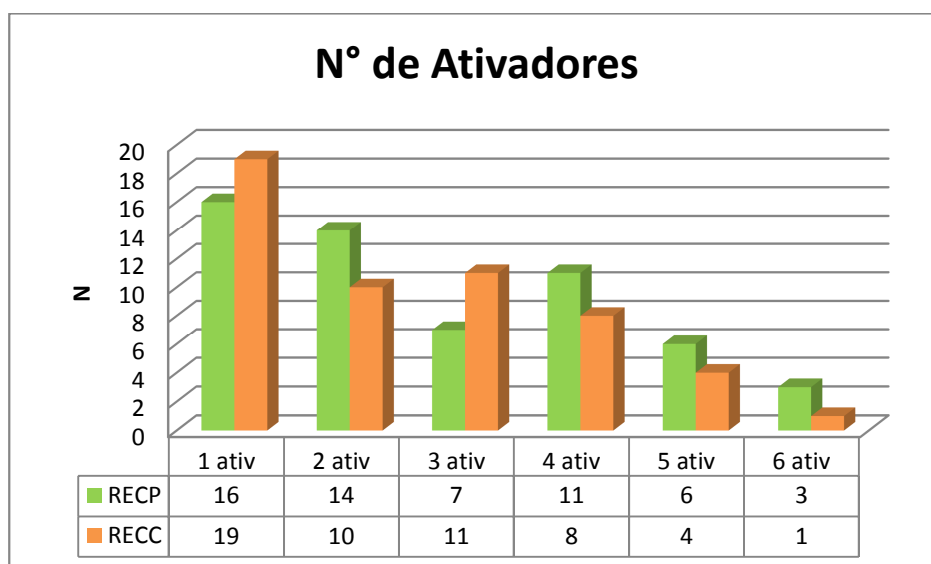
O número de locos *KIR* foi comparado separadamente para aqueles codificantes de receptores inibidores e ativadores entre os Receptores que apresentaram rejeição aguda e aqueles os quais esta não foi observada. A análise não permitiu a distinção de ambos os grupos (com e sem rejeição) para locos inibidores (Teste-G = 2,13; p = 0,55), nem ativadores (Teste-G = 3,60; p = 0,61). Estas comparações são representadas pelos gráficos 04 e 05.

GRÁFICO 04. DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE LOCOS INIBIDORES *KIR* ENTRE RECEPTORES COM E SEM REJEIÇÃO



NOTA: REC P = Receptores Pacientes (apresentaram episódio de rejeição aguda); REC C = Receptores Controles (não apresentaram episódios de rejeição aguda); inib = indicação do número de locos inibidores analisado. FONTE: O Autor 2011.

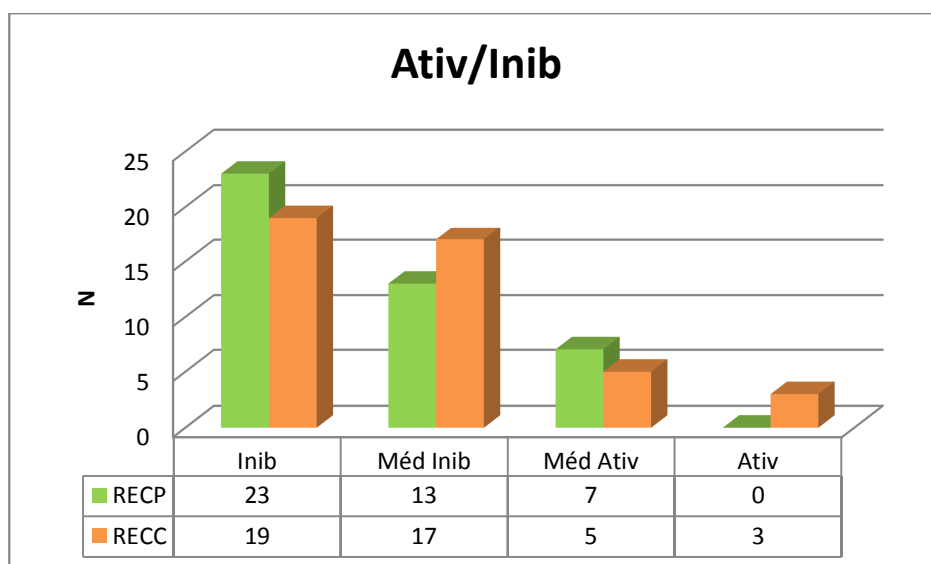
GRÁFICO 05. DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE LOCOS ATIVADORES *KIR* ENTRE RECEPTORES COM E SEM REJEIÇÃO



NOTA: REC P = Receptores Pacientes (apresentaram episódio de rejeição aguda); REC C = Receptores Controles (não apresentaram episódios de rejeição aguda); ativ = indicação do número de locos ativadores analisado. FONTE: O Autor 2011.

Com a finalidade de verificar se o repertório dos Pacientes Renais possui um perfil mais ativador ou inibidor, foi realizada uma análise onde as diferentes proporções entre o número de locos ativadores e inibidores foram comparadas entre Duplas com e sem Rejeição. Os perfis foram definidos como Inibidor quando a razão foi igual a 0,0, Médio Inibidor para 0,5, Médio Ativador para 1,0 e Ativador para a situação onde existem mais ativadores do que inibidores (GRÁFICO 6). Os grupos não apresentaram diferenças significativas (Teste-G = 5,40; p = 0,15).

GRÁFICO 06. COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE INDIVÍDUOS ENTRE RECEPTORES COM E SEM REJEIÇÃO PARA DIFERENTES RAZÕES ENTRE O NÚMERO DE RECEPTORES KIR INIBIDORES E ATIVADORES



NOTA: REC P = Receptores Pacientes (apresentaram episódio de rejeição aguda); REC C = Receptores Controles (não apresentaram episódios de rejeição aguda); Diferentes proporções entre inibidores e ativadores apresentadas: Inib = (N Ativ/N Inib = 0,0); Méd Inib = (N Ativ/ N Inib = 0,5); Méd Ativ = (N Ativ/N Inib = 1,0); Ativ = Número maior de ativadores do que inibidores.

FONTE: O Autor 2011.

As diferentes combinações dos grupos ligantes HLA-C, C1 e C2, foram comparadas e não apresentaram diferenças significativas entre Receptores e Doadores que apresentaram ou não, episódios de rejeição aguda (TABELA 20).

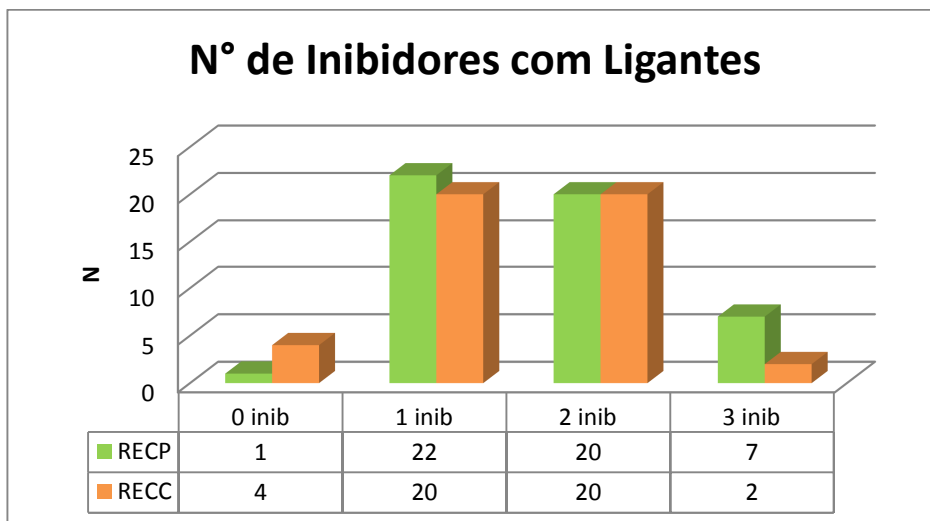
TABELA 20. COMPARAÇÃO ENTRE RECEPTORES E DOADORES COM E SEM REJEIÇÃO PARA OS GRUPOS LIGANTES C1 E C2

Grupo ligante		RECP (N)	RECC (N)	DOAP (N)	DOAC (N)	RECPxRECC	RECPxDOAP
C1	C1	4	5	5	4	Teste-G = 11,07 GL = 6	Teste-G = 4,57 GL = 6
C1	C2	13	18	13	11		
C2	C2	9	15	13	12	p = 0,09	p = 0,60
C2	INDEF	13	7	10	13		
C1	INDEF	12	4	6	3	DOAPxDOAC Teste-G = 2,94	RECCxDOAC Teste-G = 4,20
INDEF	C1	2	0	1	0		
INDEF	C2	1	1	3	2	GL = 6	GL = 6
INDEF*	INDEF*	3	3	6	8		
Total		57	53	57	53	p = 0,82	p = 0,65

Nota: C1 = Grupo de alelos *HLA-C* contendo os produtores dos alotipos sorológicos C2, C4, C5 e C6 (ligante dos *KIR2DL1* e *KIR2DS1*); C2 = Grupo contendo os alelos *HLA-C* produtores dos alotipos sorológicos C1, C3, C7 e C8 (ligante dos *KIR2DL2*, *KIR2DL3* e *KIR2DS2*). INDEF = Alelos cujos correspondentes sorológicos não se enquadram em nenhum dos grupos C1 ou C2. * = Os números de indivíduos indef/indef não foram incluídos na análise. FONTE: O Autor (2011).

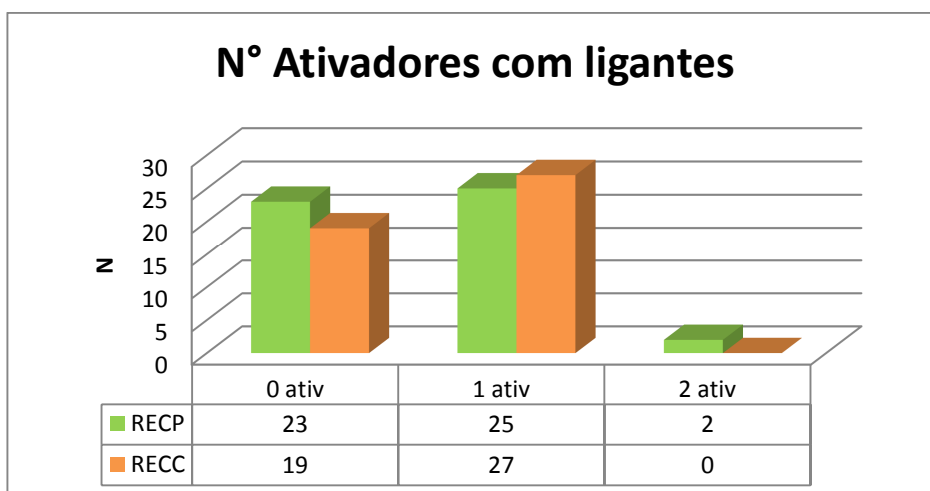
A fim de verificar se a presença dos locos *KIR* em Pacientes Renais (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DS1* e *KIR2DS2*), conjuntamente com seu ligante (C1 e/ou C2 proveniente do doador, denominada Compatibilidade KIR-Ligante), predispõe ou previne episódios de rejeição aguda comparou-se entre RECP e RECC o número de indivíduos que possuem 0, 1, 2 e 3 locos inibidores e 0, 1 e 2 locos ativadores, com seus ligantes presentes no Doador. Os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes para os locos Inibidores (Teste-G = 4,80; p = 0,18) (GRÁFICO 07) e nem para os Ativadores (Teste-G = 3,06; p = 0,22) (GRÁFICO 08).

GRÁFICO 07. COMPARAÇÃO ENTRE RECEPTORES COM E SEM REJEIÇÃO COM DIFERENTES NÚMEROS DE GENES *KIR* INIBIDORES APRESENTANDO LIGANTES



Nota: REC P = Receptores Pacientes (apresentaram episódio de rejeição aguda); REC C = Receptores Controles (não apresentaram episódios de rejeição aguda). inib = número de genes *KIR* no paciente renal que codificam receptores inibidores cujo Doador da dupla apresentou o ligante HLA-C específico. N = Número de indivíduos. FONTE: O Autor (2011).

GRÁFICO 08. COMPARAÇÃO ENTRE RECEPTORES COM E SEM REJEIÇÃO COM DIFERENTES NÚMEROS DE GENES *KIR* ATIVADORES APRESENTANDO LIGANTES



Nota: REC P = Receptores Pacientes (apresentaram episódio de rejeição aguda); REC C = Receptores Controles (não apresentaram episódios de rejeição aguda). inib = número de genes

KIR no paciente renal que codificam receptores inibidores cujo Doador da dupla apresentou o ligante HLA-C específico. N = Número de indivíduos. FONTE: O Autor (2011).

A compatibilidade KIR-Ligante, e a incompatibilidade KIR-Ligante (a presença do locus *KIR* em Pacientes Renais, onde seu doador não continha ligante específico (C1 e/ou C2)) foram analisadas sob a divisão de RECP e RECC por classes de mismatches (MM) *HLA* (*A*, *B* e *DR*) entre as duplas Receptor/Doador: de zero a dois MM (0-2MM); com três MM (3MM); e de quatro a seis MM (4-6MM) (TABELA 21).

Essa divisão da amostra em grupos por *mismatches HLA* tem como objetivo verificar se compatibilidade e a incompatibilidade KIR-Ligante entre Receptores e seus Doadores pode influenciar ou não, na ocorrência de episódios de rejeição aguda, reduzindo a influência do MM *HLA*.

As análises para a compatibilidade e incompatibilidade KIR-Ligante não apresentaram quaisquer diferenças entre os grupos de Receptores (RECP e RECC) (TABELA 22).

TABELA 21. DISTRIBUIÇÃO DAS COMPATIBILIDADES E INCOMPATIBILIDADES KIR-LIGANTE ENTRE OS GRUPOS RECEPTORES COM (RECP) E SEM (RECC) REJEIÇÃO.

Mismatches HLA (A, B e DR)	2DL1				2DL2				2DL3				2DS1				2DS2			
	C		I		C		I		C		I		C		I		C		I	
	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC
0-2MM	6	8	7	20	5	14	8	14	10	21	3	7	3	4	10	24	5	14	8	14
%	24%	67%	28%	59%	26%	70%	26%	54%	26%	62%	28%	59%	28%	67%	26%	60%	28%	67%	25%	56%
3MM	13	3	11	9	9	4	15	8	20	8	4	4	4	2	20	10	8	4	16	8
%	52%	25%	44%	26%	47%	20%	48%	31%	51%	23%	36%	33%	36%	33%	51%	25%	44%	19%	50%	32%
4-6MM	6	1	7	5	5	2	8	4	9	5	4	1	4	0	9	6	5	3	8	3
%	24%	8%	28%	15%	26%	10%	26%	15%	23%	15%	36%	8%	36%	0%	23%	15%	28%	14%	25%	12%
Total	25	12	25	34	19	20	31	26	39	34	11	12	11	6	39	40	18	21	32	25

Nota: C = Compatibilidade KIR-Ligante, presença do gene KIR no indivíduo Receptor renal + a presença de seu ligante específico (C1 ou C2) em seu doador; I = Incompatibilidade KIR-Ligante, presença do gene KIR no indivíduo Receptor renal + a ausência de seu ligante específico (C1 ou C2) em seu doador. MM = *Mismatches HLA*.

FONTE: O Autor (2011).

TABELA 22. ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS GRUPOS RECEPTORES COM (RECP) E SEM (RECC) REJEIÇÃO PARA AS COMPATIBILIDADES E INCOMPATIBILIDADES KIR-LIGANTE.

		2DL1		2DL2		2DL3		2DS1		2DS2	
		RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC	RECP	RECC
0-2MM	C I	p = 0,307		p = 0,524		p = 1,000		p = 0,659		p = 0,524	
3MM	C I	p = 0,157		p = 1,000		p = 0,397		p = 0,989		p = 0,999	
4-6MM	C I	p = 0,333		p = 1,000		p = 0,631		p = 0,255		p = 1,000	

Nota: C = Compatibilidade KIR-Ligante, presença do gene KIR no indivíduo Receptor renal + a presença de seu ligante específico (C1 ou C2) em seu doador; I = Incompatibilidade KIR-Ligante, presença do gene *KIR* no indivíduo Receptor renal + a ausência de seu ligante específico (C1 ou C2) em seu doador. MM = *Mismatches HLA*.

FONTE: O Autor (2011).

6.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *KIR2DS2* E *KIR2DS4*

Ao todo 19 Pacientes Renais e 14 Doadores foram analisados quanto à sua expressão gênica para os genes *KIR2DS2* e *KIR2DS4*, pelo método do $\Delta\Delta Cq$. A diferença entre Receptores e Doadores é devido, a uma porcentagem de Doadores cadáveres. Para os Pacientes as análises foram divididas conforme os momentos: Pré-transplante e Pós-transplante, onde este último foi subdividido em: IMUNO (após a imunossupressão), HA (durante episódios de rejeição hiperaguda), d30 (30 dias após o transplante) e REJA (durante a rejeição aguda), totalizando 64 amostras analisadas. A distribuição das amostras dos pacientes nestes diferentes tratamentos foi apresentada na tabela 07 - página 49).

O perfil de expressão do gene *KIR2DS2* nos receptores em seus diferentes momentos é apresentado na figura 23. O mesmo pode ser observado para o gene *KIR2DS4* na figura 24.

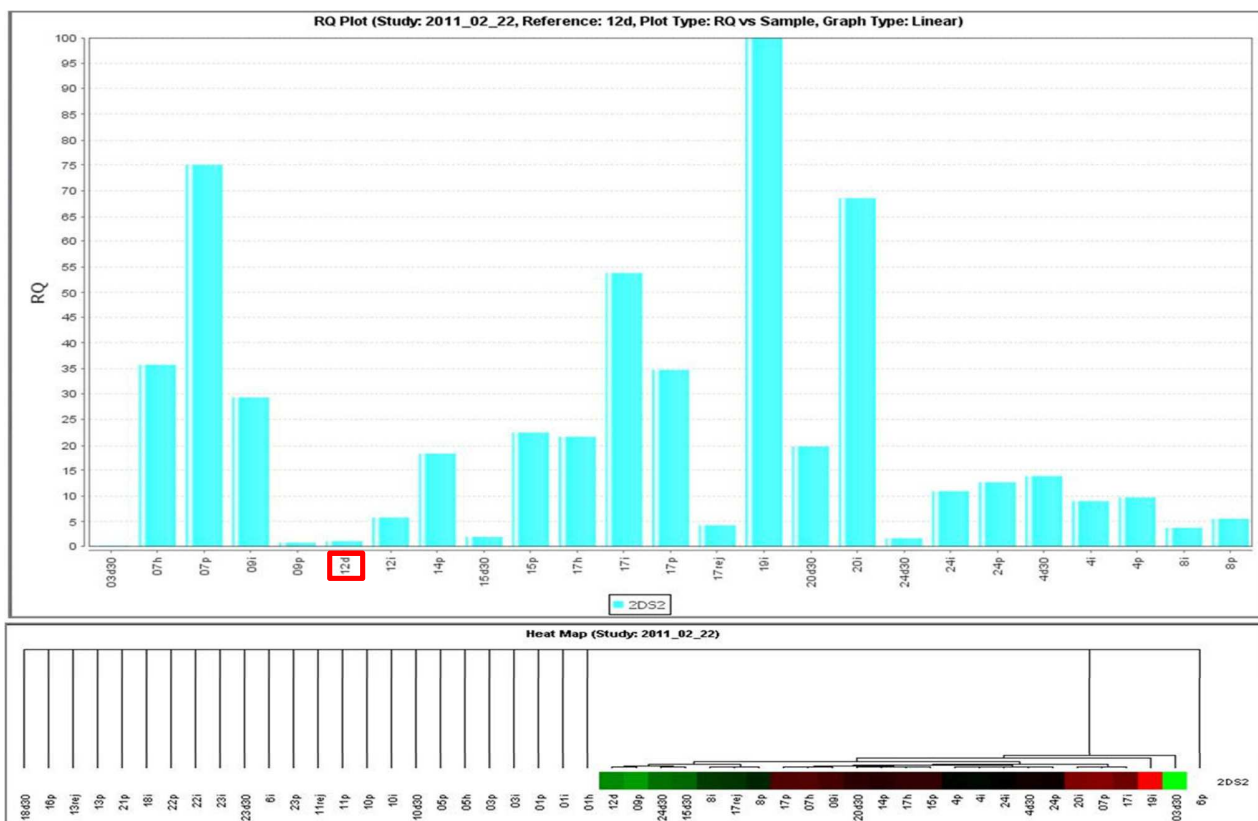


FIGURA 23. PERFIL DE EXPRESSÃO DO *KIR2DS2* NOS PACIENTES (N=25).

Nota: As amostras não representadas no gráfico não apresentaram expressão para o gene *KIR2DS2*. A amostra 12d (quadrado vermelho) utilizada como calibradora nas análises, é de um indivíduo Doador não aparentado e apresenta a expressão tanto do gene *KIR2DS2* quanto de *KIR2DS4*.

FONTE: DataAssit® Software (2011).

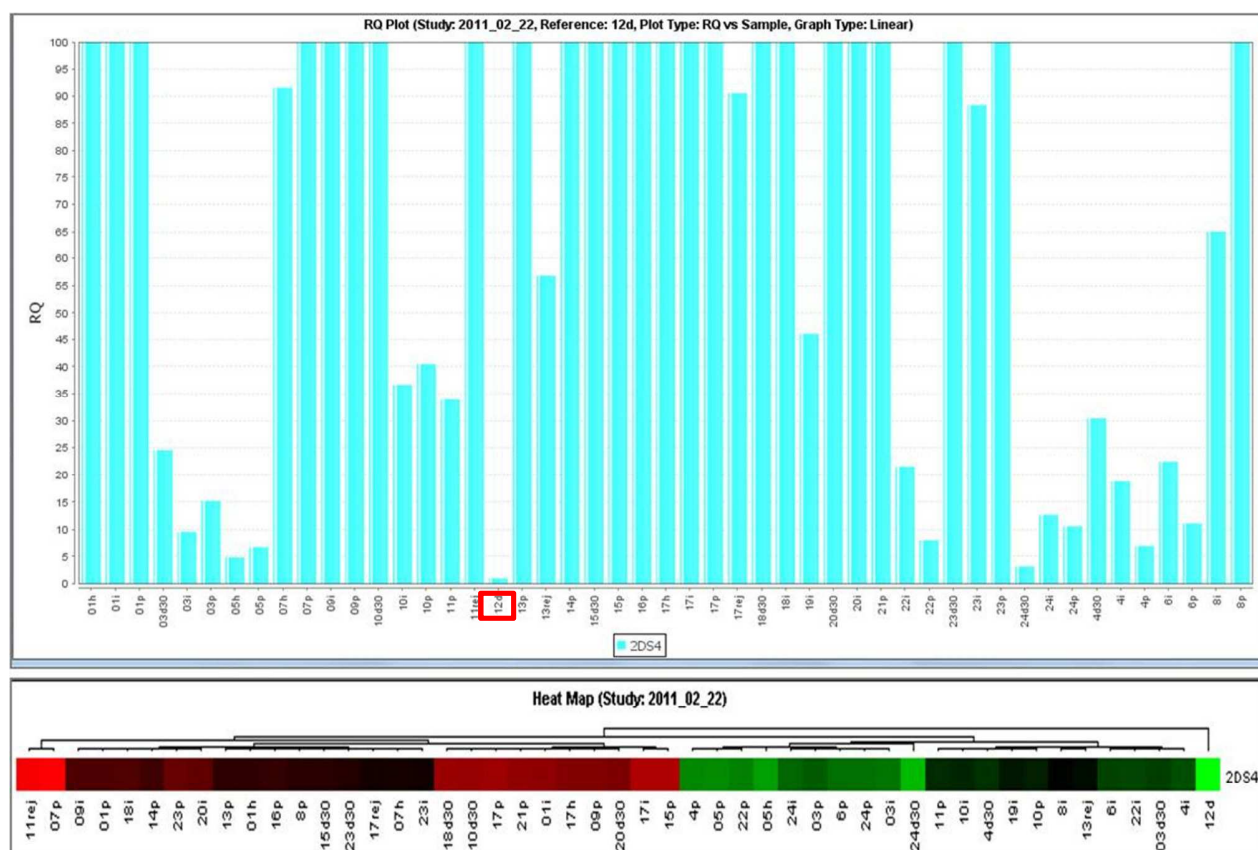


FIGURA 24. PERFIL DE EXPRESSÃO DO *KIR2DS4* NOS PACIENTES (N=49).

Nota: A amostra 12d utilizada como calibradora nas análises, é de um indivíduo Doador não aparentado e apresenta a expressão tanto do gene *KIR2DS2* quanto de *KIR2DS4*.

FONTE: DataAssit® Software (2011).

As médias dos RQs (quantidade relativa), geradas após o cálculo do $\Delta\Delta Cq$, do conjunto de amostras Pré-transplante dos Receptores e em seus Doadores não apresentaram diferenças significativas para os genes *KIR2DS2* ($p = 0,5630$) e *KIR2DS4* ($p = 0,2954$) (TABELA 23 e FIGURA 25).

TABELA 23. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE RQ ENTRE AMOSTRAS PRÉ-TRANSPLANTE (Pré-tx) E DOADORES.

	<i>KIR2DS2</i>	<i>KIR2DS4</i>
Média Pré-tx	20,6895	224,6314
Média Doa	27,9730	135,0062
Variância	481,9776	7008,2795
t	-0,5963	1,0706
Diferenças entre as médias	-7,2835	89,6252
Graus de liberdade	11	24
p (bilateral)	0,5630	0,2954

Nota. O teste de t foi realizado para amostras independentes. Pré-tx = Amostra Pré-transplante dos pacientes; Doa = Amostra dos Doadores. FONTE: O Autor 2011.

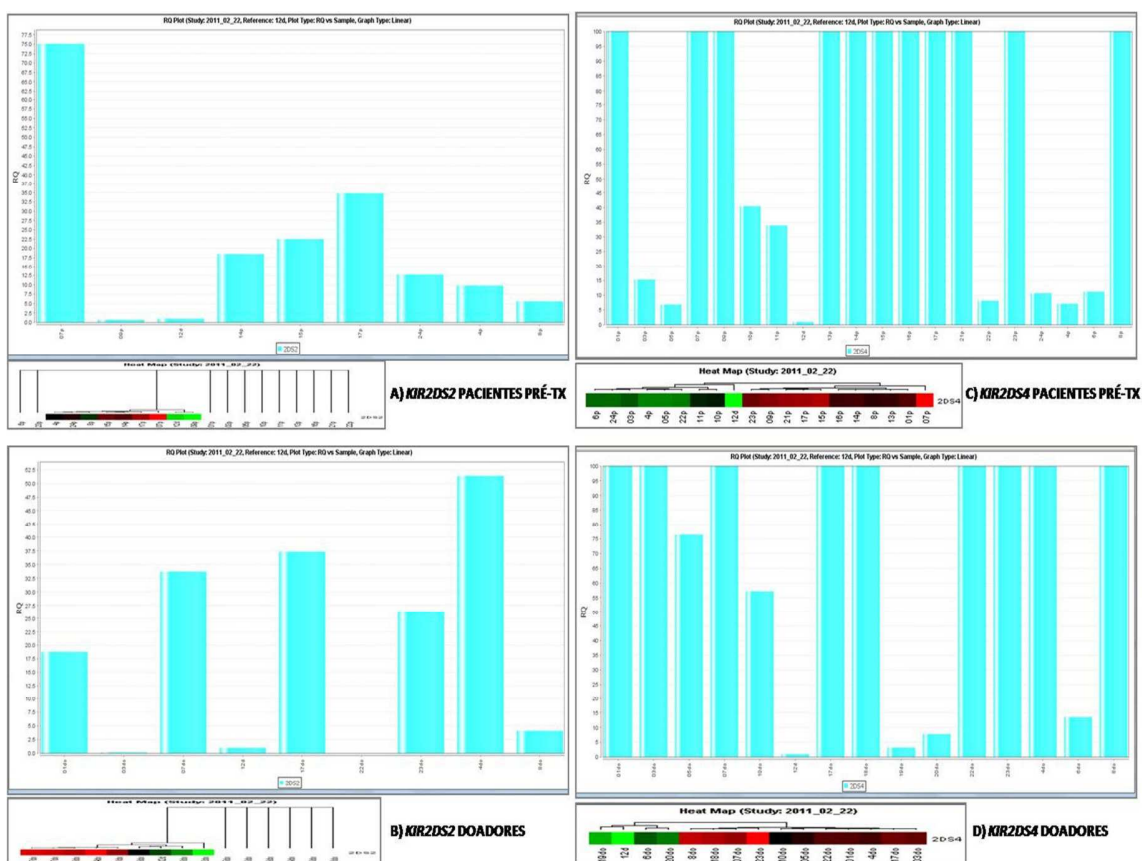


FIGURA 25. PERFIL DE EXPRESSÃO DOS *KIR2DS2* E *KIR2DS4* EM PACIENTES PRÉ-TRANSPLANTE E SEUS DOADORES.

Nota: A) Perfil de expressão de *KIR2DS2* nas amostras Pré-transplante em Pacientes; B) Expressão de *KIR2DS2* em Doadores; C) Expressão de *KIR2DS4* nas amostras Pré-transplante

em Pacientes; D) Expressão de *KIR2DS4* em Doadores. As amostras não representadas no gráfico de *KIR2DS2* não apresentaram expressão para o gene.

FONTE: DataAssit® Software (2011).

A tabela 24 apresenta a análise de variância para os valores médios de RQ referentes à expressão dos genes *KIR2DS2* e *KIR2DS4* nos pacientes em seus diferentes tratamentos. Diferenças significativas entre as variâncias não foram constatadas para quaisquer dos dois genes (*KIR2DS2*: $F = 0,8133$, $p = 0,5308$ e *KIR2DS4*: $F = 0,9519$, $p = 0,5550$).

TABELA 24. ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE OS TRATAMENTOS PRÉ-TRANSPLANTE, IMUNOSSUPRESSÃO, REJEIÇÃO HIPERAGUDA, REJEIÇÃO AGUDA E 30 DIAS APÓS O TRANSPLANTE.

FONTES DE VARIAÇÃO	<i>KIR2DS2</i>			<i>KIR2DS4</i>		
	GL	SQ	QM	GL	SQ	QM
Tratamentos	4	21,1 e+03	52,7 e+02	4	34,3 e+04	85,6 e+03
Erro	24	15,5 e+04	64,8 e+02	43	38,7 e+05	90,0 e+03
F =		0,8133			0,9519	
p =		0,5308			0,5550	

Nota: GL = Graus de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; QM = Quadrados médios.

FONTE: O Autor (2011).

Para estabelecer se existem diferenças entre as médias de RQ entre a amostra Pré-transplante e os demais tratamentos, realizamos o teste de t para amostras pareadas. Este teste, conforme pode ser observado na tabela 25, não demonstrou diferenças significativas entre as médias de RQ para os genes *KIR2DS2* (Pré-tx vs IMUNO: $t = -1,3639$ e $p = 0,2443$; vs HA: $t = 2,0001$ e $p = 0,2951$; vs d30: $t = 1,278$ e $p = 0,3234$) e *KIR2DS4* (Pré-tx vs IMUNO: $t = 1,2295$ e $p = 0,2406$; vs HA: $t = 1,0166$ e $p = 0,3842$; vs REJA: $t = -0,6828$ e $p = 0,5437$; vs d30: $t = 0,0591$ e $p = 0,9557$). Para o gene *KIR2DS2* o tratamento REJA (pacientes que apresentaram rejeição aguda) não apresentou um número suficientes de indivíduos com expressão do gene para que fosse possível a análise.

TABELA 25. COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DE RQ DE AMOSTRAS PAREADAS PRÉ-TRANSPLANTE vs TRATAMENTOS

	<i>KIR2DS2</i>				<i>KIR2DS4</i>			
	IMUNO	HA	REJA	d30	IMUNO	HA	REJA	d30
Média 1	21,3685	28,7501	---	5,7561	126,6789	137,1497	405,6057	119,1175
Desvio Padrão 1	20,5093	9,9623	---	7,0373	167,5316	137,4919	643,2721	176,0156
Erro Padrão 1	9,1720	7,0444	---	4,0630	44,7747	68,7460	321,636	78,7166
Média Pré-tx	12,7129	54,9285	---	14,9893	277,5971	489,1531	157,6313	126,9285
Desvio Padrão Pré-tx	13,1427	28,4722	---	6,6771	378,2764	662,1100	99,2097	243,1464
Erro Padrão Pré-tx	5,8776	20,1329	---	3,8550	101,0986	331,0550	49,6048	108,7384
Média das diferenças	-8,6556	26,1784	---	9,2331	150,9181	352,0034	-247,9744	7,8110
(t)=	-1,3639	2,0001	---	1,2782	1,2295	1,0166	-0,6828	0,0591
Graus de Liberdade	4	1	---	2	13	3	3	4
p (bilateral)	0,2443	0,2951	---	0,3294	0,2406	0,3842	0,5437	0,9557
IC (99%)	-37,8743 a20,5631	-806,7345 a859,0913	---	-62,4609 a80,9272	-218,7830 a520,6192	-1670,5179 a2374,5248	-2369,2350 a1873,2863	-601,1032 a616,7253

Nota: Média 1, Desvio Padrão 1 e Erro Padrão 1 referem-se a cada um dos tratamentos apresentados na coluna (IMUNO - imunossupressão, HA – rejeição hiperaguda, REJA – rejeição aguda e d30 – 30 dias pós-transplante). Pré-tx = Pré-transplante.

FONTE: O Autor (2011)

As médias de RQ foram comparadas entre cada tratamento (dois a dois), onde todas as amostras disponíveis dentro de cada tratamento foram utilizadas para obtenção da média destes. Como pode ser observado na tabela 26, a análise não demonstrou diferenças significativas entre as médias. Somente a comparação entre as médias para HA e d30 para o gene *KIR2DS2*, apresentou uma tendência a significância entre as diferenças ($t = 2,412$ e p bilateral = $0,0733$).

Os indivíduos que não apresentaram expressão do gene *KIR2DS2*, pois não apresentam o gene, conforme foi constatado pela genotipagem dos genes *KIR*, não foram analisados pelo software DataAssist® devido a características intrínsecas do método $\Delta\Delta Cq$. Desta forma, avaliamos se o número de indivíduos que não expressam o gene é diferente para Receptores renais entre aqueles que apresentaram rejeição aguda e aqueles sem rejeição. A análise dos dados através do teste Exato de Fisher não demonstrou diferenças significativas entre os dois grupos (com e sem rejeição) (p bilateral = $0,1045$).

TABELA 26. COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DE RQ DE TODOS OS TRATAMENTOS

	KIR2DS2				KIR2DS4			
	IMUNO	HA	REJA	d30	IMUNO	HA	REJA	d30
Média PRÉ-TX	22,4527	22,4527	---	22,4527	224,6314	224,6314	224,6314	224,6314
Variância PRÉ-TX	564,0937	564,0937	---	564,0937	113940,6	113940,6	113940,6	113940,6
Média x	76,9142	28,7501	---	9,2817	126,6789	137,1497	412,3001	150,5936
Variância x	21394,94	99,2471	---	82,7332	28066,84	18904,02	310573,3	30729,69
Variância	3498,889	505,9879	---	419,6855	8001,646	100363,9	149692	95851,25
t	-1,0924	-0,3541	---	1,0499	1,095	0,502	-0,965	0,5107
Graus de liberdade	6	8	---	10	28	21	22	23
p (bilateral)	0,3165	0,7324	---	0,3184	0,2831	0,6209	0,3450	0,6144
Média IMUNO		87,0673	---	87,0673		126,6789	126,6789	126,6789
Variância IMUNO		23998,64	---	23998,64		28066,84	28066,84	28066,84
Média x		28,7501	---	9,2817		137,1497	412,3001	150,5936
Variância x		99,2471	---	82,7332		18904,02	310573,3	30729,69
Variância		3478	---	3449,06		26348,81	64119,43	28806,52
t		-0,9889	---	1,3245		0,1138	-1,128	-0,2888
Graus de liberdade		6	---	6		16	4	18
p (bilateral)		0,3609	---	0,2335		0,9108	0,3224	0,7761
Média HA			---	28,7501		137,1497	137,1497	
Variância HA			---	99,2471		18904,02	18904,02	
Média x			---	9,2817		412,3001	150,5936	
Variância x			---	82,7332		310573,3	30729,69	
Variância			---	86,8617		66840,66	26295,06	
t			---	2,412		-1,0643	-0,1284	
Graus de liberdade			---	4		5	8	
p (bilateral)			---	0,0733		0,3471	0,901	
Média REJA			---				412,3001	
Variância REJA			---				310573,3	
Média x			---				150,5936	
Variância x			---				30729,69	
Variância			---				67236,27	
t			---				-1,0093	
Graus de liberdade			---				5	
p (bilateral)			---				0,3699	

Nota: Média x e Variância x referem-se a cada um dos tratamentos apresentados na coluna (IMUNO - imunossupressão, HA – rejeição hiperaguda, REJA – rejeição aguda e d30 – 30 dias pós-transplante).

FONTE: O Autor (2011)

7. DISCUSSÃO

7.1. FREQUÊNCIAS DOS GENES KIR E A INCOMPATIBILIDADE KIR-LIGANTE

O transplante de rim tem se tornado uma terapia padrão para doenças renais de estágio final. A rejeição aguda ao aloenxerto mediada pelo sistema imune do paciente frequentemente conduz à permanente disfunção do enxerto ou à perda deste (VAMPA *et al.*, 2003). A rejeição é o problema mais comum dos primeiros três meses imediatamente após o transplante de rim (ETTENGER *et al.*, 1990; McENERY *et al.*, 1992) e necessita ainda de maiores esclarecimentos sobre os mecanismos nela envolvidos.

Um destes mecanismos, ainda pouco estudado, é aquele onde se observa a atividade aumentada das células *Natural Killer* (NK) logo após o transplante, mesmo estando o paciente sob um regime forte de imunossupressão (VAMPA *et al.*, 2003). Em humanos, o aumento do número de células NK circulantes foi observado durante a rejeição aguda de aloenxertos renais (COOKSEY *et al.*, 1984), podendo haver infiltração destas células no tecido transplantado (HANCOCK *et al.*, 1985; TOTTERMAN *et al.*, 1989). A atividade das células NK resulta de um balanço, mediado por receptores presentes na membrana dessas células, de sinais de inibição e ativação, sendo que os receptores mais conhecidos são os KIR (do inglês, *Killer-cell Ig-like Receptors*), cujos ligantes, em sua grande maioria, são epítomos presentes nas moléculas HLA de Classe I, que desempenham um importante papel na aceitação do aloenxerto.

Em nosso trabalho, 110 duplas Receptor/Doador foram analisadas quanto à presença dos 16 locos *KIR*. Esta amostra foi subdividida em dois grupos distintos, de Receptores Renais, ou seja, aqueles que apresentaram episódio de rejeição aguda (RA) (RECP) e Receptores, que não apresentaram, também chamados de Controles (RECC).

Três dos genes analisados apresentaram frequências diferentes entre os grupos de Receptores com e sem rejeição. Os genes codificantes para o receptor inibidor KIR2DL1 e para o ativador KIR2DS5 estiveram mais presentes nos Pacientes com

episódios de Rejeição Aguda do que no grupo controle sem episódios de rejeição. Entretanto, observamos que, no grupo de Receptores sem rejeição, o gene *KIR2DS4* possui maior frequência que o grupo de pacientes.

As frequências dos genes *KIR* não apresentaram diferenças quando comparadas entre: 1) os grupos de Receptores e nem de Doadores, com e sem rejeição; 2) após a subdivisão da amostra entre duplas (Receptor/Doador), com e sem rejeição aguda. Porém, em análises individualizadas para cada loco para Receptores com e sem RA, alguns genes apresentaram frequências de presença discordantes entre os indivíduos analisados (RECPxRECC). O loco *KIR3DL1* apresentou uma tendência a significância ($p = 0,06$). Os indivíduos que apresentaram episódio de rejeição possuem uma maior frequência dos genes *KIR2DL1* e *KIR2DS5*, em relação aqueles sem rejeição, onde a razão das probabilidades estimada foi de (segundo o cálculo de OR) 4,01 e 3,03, de mais chances de apresentarem rejeição aguda, respectivamente. Contudo, indivíduos Receptores que apresentam o locus *KIR2DS4*, segundo a análise, apresentariam uma proteção contra o desenvolvimento da rejeição de 0,10 vezes sobre aqueles onde este gene estivesse ausente.

Estes dados são contrários à natureza dos locos acima citados, onde a inibição mediada por receptores inibidores poderia evitar a ocorrência da RA, enquanto que a ativação, mediada por receptores ativadores, desencadeá-la. Apesar do que foi observado, onde Pacientes com ocorrência de episódios de rejeição aguda apresentam uma frequência maior de um gene codificante para um receptor inibidor e o grupo controle (sem rejeição aguda) para um ativador, deve-se observar que a citotoxicidade das células NK é mediada pela interação e balanço de sinais de todos os seus receptores com seus respectivos ligantes. Desta forma, analisar apenas a presença dos genes pode não refletir a real condição para ativação das células NK contra as células alvo.

Entretanto, após refazermos a análise comparativa estratificando-se os grupos por número de mismatches HLA (A, B e DR), observamos que as diferenças não eram mais significativas, reafirmando assim que os mismatches HLA tem um papel crucial na aloreatividade contra o órgão transplantado. Além disso, a inibição ou a ativação da

citotoxicidade mediada pelas células NK necessita da interação dos KIR com seus ligantes específicos e em nossa análise foram considerados apenas os ligantes HLA-C. Devemos lembrar que alguns KIR possuem outros ligantes não HLA, e que o balanço entre os sinais para ativação e inibição de todos os KIR deve ser considerado para estabelecer se a citotoxicidade será ativada ou não.

Segundo Vampa e colaboradores (2003), a citotoxicidade das células NK pode variar de, virtualmente nula entre duplas *HLA*-idênticas, reduzida entre duplas aparentadas em primeiro grau (com conseqüente baixo número de *mismatches*) e, alta entre as duplas não aparentadas com alto grau de *mismatches* (VAMPA, *et al* 2003). Isto sugere que durante episódios de rejeição aguda, além do alorreconhecimento mediado por células T, é provável que a citotoxicidade das células NK, mediada pelo balanço de sinais obtidos pela ligação de receptores ativadores, inibidores e seus ligantes, seja um fator adicional nesse processo.

Na literatura, Cirocco e colaboradores observaram que para duplas *HLA*-idênticas, indivíduos Receptores com RA não apresentavam os locos *KIR2DL2* e *KIR2DS2* (CIROCCO *et al*, 2007). A baixa frequência dos locos *KIR2DL1*, *KIR2DL2* e *KIR2DS2* foi observada em pacientes renais que apresentaram rejeição aguda no trabalho de Kunert *et al.* (KUNERT *et al.*, 2007). Entretanto, Kreijveld e colaboradores, não encontraram associações entre as frequências dos genes *KIR* e o aparecimento de episódios de Rejeição Aguda em Pacientes transplantados renais, sugerindo que a análise prévia da aloreatividade das células NK, não permita identificar indivíduos com propensão a sofrer episódios de RA (KREIJVELD, *et al* 2007).

No presente estudo, não foram observadas diferenças entre os grupos de Receptores com (RECP) e sem (RECC) rejeição, quando pareados quanto a ausência/presença dos genes *KIR* (identidades dos genes *KIR*) em Receptores renais e seus Doadores. Entretanto, as análises para os locos *KIR2DL1* e *KIR2DS1* apresentam valores de *p* muito próximos ao limite de 5%. O número médio de genes *KIR* que constituem os repertórios de Receptores e Doadores e a distribuição do número de locos ativadores e inibidores foi similar entre os grupos analisados. Para Kreijveld e colaboradores, a não identidade *KIR* entre Receptor e Doador pode facilmente ocorrer

devido à vasta variação na composição dos repertórios *KIR* (KREIJVELD, *et al* 2007). Contudo, isto pode não refletir uma associação entre a identidade *KIR* (ou *KIR match*) e a ocorrência de episódios de rejeição aguda, como constatado em seu trabalho.

Não havendo diferenças entre o número de genes para os Grupos RECP (Receptores com rejeição aguda – Pacientes) e RECC (Receptores sem rejeição – Controles), hipotetizamos se os indivíduos com rejeição poderiam apresentar um repertório *KIR* mais agressivo, onde contariam com um número maior de ativadores e menor de inibidores quando comparado ao repertório *KIR* do grupo RECC. A análise da razão utilizada entre o número de ativadores e inibidores para estabelecer diferentes classes de perfil *KIR* (Inibição, Média Inibição, Média Ativação e Ativação) e verificar se existe associação entre estes perfis e a ocorrência de episódios de rejeição aguda não demonstrou diferenças significativas entre RECP e RECC, sugerindo, deste modo, que apenas a análise da presença dos genes possa não ser um bom indicativo da atuação das células NK.

A comparação das distribuições dos grupos ligantes HLA-C (C1 e C2) entre Duplas com e sem RA, também não demonstrou diferenças estatisticamente significantes. Todavia, deve-se notar a tendência a significância apresentada pela comparação entre RECP e RECC ($p = 0,09$). Atualmente, a importância do HLA-C em transplantes vem gradualmente aumentando, em especial pelo fato de ser ligante de 5 genes *KIR*, os quais podem auxiliar as células NK a modularem sua aloreatividade contra as células do doador. O estudo de Frohn e colaboradores ilustra o impacto do HLA-C na rejeição aguda ao aloenxerto (FROHN *et al.*, 2001). Impacto este que pode ser observado no trabalho de Bishara e colaboradores, que descreve uma associação entre diversidade de epítomos HLA-C e a rejeição aguda em pacientes de transplante de fígado (BISHARA *et al.*, 2005).

Grande parte dos estudos que analisam o papel dos genes *KIR* na rejeição aguda de rins transplantados, possuem seu foco na incompatibilidade KIR-Ligante entre indivíduos Receptores e seus Doadores (VAMPA *et al.*, 2003; HIEN TRAN *et al.*, 2005; KUNERT *et al.*, 2007; KREIJVELD *et al.*, 2007). A incompatibilidade KIR-Ligante pode ser definida como a ausência no Doador de alelos *HLA* de classe I que expressam

epítomos específicos reconhecidos por receptores KIR das células NK do Receptor. Essa definição considera a hipótese de que a incompatibilidade KIR-Ligante poderia influenciar a aloreatividade anti-doador mediada por células NK do receptor e consequentemente alterar a taxa de sobrevida do enxerto (HIEN TRAN *et al.*, 2005)

Contudo, a análise da incompatibilidade KIR-Ligante em nossa amostra não apresentou diferenças significativas para os genes *KIR* inibidores e ativadores (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DS1* e *KIR2DS2*) testados dentro de cada classe (0-2; 3 e 4-6 MM) de *mismatches HLA* (TABELA 22).

Vampa e colaboradores, utilizando ensaios de citotoxicidade das células NK do receptor contra células do sangue periférico do doador, observaram que os pacientes que exibiram um aumento desta citotoxicidade três dias após o transplante, apresentavam significativamente mais genes ativadores *KIR* específicos para moléculas HLA de classe I dos Doadores do que Pacientes onde a citotoxicidade não aumentou (VAMPA *et al.*, 2003). Para Kunert e colaboradores, certas combinações de KIR-Ligante, como por exemplo a homozigose para o grupo ligante C1 e a presença dos genes *KIR2DL2/S2*, podem favorecer a inibição, devido a uma ligação mais eficiente do ligante com o receptor inibidor, e assim evitar a rejeição aguda (KUNERT *et al.*, 2007). Segundo Hien Tran e colaboradores a compatibilidade KIR-Ligante pode não ser a melhor estratégia para aumentar a sobrevida do aloenxerto renal (HIEN TRAN *et al.*, 2005).

Nossos dados estão de acordo com os resultados apresentados por Hien Tran e colaboradores, sugerindo assim uma ausência do efeito da incompatibilidade KIR-Ligante na ocorrência de Rejeição aguda de rins transplantados.

7.2. EXPRESSÃO DOS GENES *KIR2DS2* E *KIR2DS4*

A expressão dos genes *KIR* é bastante diversificada, seja por seu extenso polimorfismo e consequente expressão diferencial dos diferentes alelos dos genes (McEARLEAN *et al.*, 2010), ou devido a mecanismos de regulação gênica que permanecem ainda não muito esclarecidos (URBERG, 2005; GOMEZ-LOZANO *et al.*,

2007; MULROONEY *et al.*, 2008). Os mecanismos transcricionais e pós-transcricionais que governam a expressão dos genes KIR são ainda desconhecidos (McEARLEAN *et al.*, 2010).

Neste trabalho, 19 Pacientes Receptores renais foram analisados para a expressão de dois genes *KIR* ativadores (*KIR2DS2* e *KIR2DS4*) em diferentes estádios durante o transplante renal. A frequência do *KIR2DS2* na amostra de Receptores com rejeição (RECP) foi de 33% e 44% para os pacientes com rejeição. Para o gene *KIR2DS4* ambos os grupos RECP e REC apresentaram uma frequência de 100% deste loco.

Nenhum trabalho utilizando um objeto de estudo semelhante ao nosso foi encontrado na literatura. Alguns artigos recentes discutem a expressão dos genes KIR com focos variados. Um destes estudos avalia a expressão diferencial dos alelos conhecidos dos genes *KIR* (McEARLEAN *et al.*, 2010).

No presente estudo, as médias de RQ (Quantidade Relativa), geradas pela análise de $\Delta\Delta Cq$, não demonstraram diferenças significativas entre as amostras Pré-Tx (Pré-transplante) dos Receptores e a amostras de seus doadores para ambos os genes (*KIR2DS2* $p = 0,5630$; *KIR2DS4* $p = 0,2954$). Entretanto, se observarmos apenas as amostras de Receptores Pré-tx e de Doadores (Figura 23), a expressão do *KIR2DS2* mostra-se inconstante entre as amostras analisadas, enquanto que a expressão do gene *KIR2DS4* apresenta uma maior uniformidade, contando apenas com dois grupos facilmente distinguíveis, de alta e de baixa expressão. Estes dados confrontam as informações apresentadas por McEarlean e colaboradores em sua análise da expressão diferencial dos alelos KIR. Neste trabalho os pesquisadores apresentam a expressão do gene *KIR2DS2* como sendo uniforme e a do *KIR2DS4* como uma das mais variáveis. Uma das explicações seria, como o próprio autor apresenta, que alguns alelos do *KIR2DS4* produzem um RNA truncado e assim sua estabilidade seria reduzida perante o RNA produzido pelos demais alelos (McEARLEAN *et al.*, 2010). Devemos observar que os oligo iniciadores utilizados em nosso trabalho tiveram por objetivo anelar no maior número de alelos possível. Todavia, alguns indivíduos analisados podem estar apresentando este alelo “truncado”, pois se observarmos o perfil de

expressão para o gene *KIR2DS4*, cada amostra apresenta um perfil muito semelhante de expressão (apenas alto ou apenas baixo) nos diferentes estádios analisados. Outro fator que pode contribuir tanto na variabilidade de expressão deste gene quanto no *KIR2DS2* é a influência do número de cópias do gene na abundância do transcrito (McEARLEAN *et al.*, 2010). Uma vez que nossa metodologia não nos permite distinguir indivíduos homocigotos para a presença do loco de indivíduos hemizigotos esta pode ser uma explicação plausível para a expressão variada entre as amostras. Este fenômeno foi observado pelos autores para três genes analisados (*KIR2DL1*, *KIR2DL3* e *KIR3DL1*).

A análise de variância realizada entre nossas diferentes amostras de Receptores Renais e seus distintos estádios, não demonstraram diferenças significativas (*KIR2DS2*: $F = 0,8133$, $p = 0,5308$ e *KIR2DS4*: $F = 0,9519$, $p = 0,5550$), sugerindo assim que a magnitude da variação das amostras seja similar.

Desta forma, testamos se existiam diferenças entre as médias de RQ para cada um dos genes (*KIR2DS2* e *KIR2DS4*) para a amostra Pré-tx e os demais estádios Pós-tx do Paciente. Esta análise não demonstrou diferenças estatisticamente significantes para nenhum dos genes analisados (*KIR2DS2* e *KIR2DS4*). Para o gene *KIR2DS2* o tratamento REJA (pacientes que apresentaram rejeição aguda) não apresentou um número suficiente de indivíduos com expressão do gene para que fosse possível a análise. Esta análise sugere que nos diferentes estádios analisados, as médias de RQ são similares entre si. Ou seja, as diferenças de expressão dos genes analisados nos diferentes momentos do transplante renal não são significantes estatisticamente.

Além disso, as médias, quando comparadas de forma pareada dentro de cada tratamento, também não demonstraram diferenças significativas entre o grupo com e sem rejeição.

Na análise da expressão do gene *KIR2DS2* observamos que uma frequência substancial dos indivíduos analisados não apresentou este loco (67% para RECP e 56% para RECC). Consequentemente, sua expressão deveria ser nula nestes indivíduos. Ao analisarmos a expressão deste gene, em indivíduos que não possuem o loco, buscamos verificar se aqueles cujos Doadores possuem o gene *KIR2DS2* em seu

repertório apresentavam uma expressão basal, representando assim a existência de células NK residuais do Doador em seu Receptor. Porém, tal fato não foi observado em nossa amostragem.

Entretanto, sabendo que a frequência do gene *KIR2DS2* foi diferente de 100%, e que os indivíduos que não apresentaram expressão para este não foram incluídos na análise da expressão deste gene, devido a características intrínsecas do método $\Delta\Delta Cq$, avaliamos se o número de indivíduos que não expressam o gene é diferente para Receptores renais entre aqueles com rejeição aguda e aqueles sem rejeição. A análise dos dados através do teste Exato de Fisher não demonstrou diferenças significativas entre os dois grupos (com e sem rejeição) (p bilateral = 0,1045). Esta análise não foi realizada para o gene *KIR2DS4* devido sua presença em 100% dos indivíduos analisados.

Estes dados sugerem que a expressão dos locos analisados (*KIR2DS2* e *KIR2DS4*) não varia de forma significativa nos diferentes momentos Pós-tranplante do aloenxerto renal e assim podem não estar contribuindo de forma direta para aumentar a aloreação mediada pelas células NK ao enxerto transplantado.

Os dados apresentados neste trabalho sugerem um papel secundário da aloreatividade das células NK, modulada por interações dos receptores KIR e seus ligantes HLA-C, no processo de rejeição ao aloenxerto renal. Contudo, outros fatores devem ser preponderados como: o papel dos demais receptores KIR com ligantes ainda desconhecidos e a outros receptores das células NK que modulam sua ação citolítica, como por exemplo os CD94/NKG2 e LILR, os quais devem ser investigados a fim de estabelecer o balanço necessário para ativação ou inibição desta citotoxicidade das NK. Outro aspecto interessante que deve ser analisado, visto que neste estudo não foi possível obter tais amostras, é a expressão dos alelos *HLA-C* em biópsia de órgãos rejeitados pelo Paciente transplantado. Dessa forma, os dados de tipagem dos genes *KIR*, de seus ligantes e a análise da expressão destes, auxiliarão no melhor entendimento da dinâmica de ativação e inibição das células Natural Killer no contexto da rejeição aguda ao rim transplantado.

8. CONCLUSÕES

- Com base nos resultados apresentados em nosso trabalho, observamos que a simples presença dos locos *KIR* ou a identidade destes entre Receptores e seus Doadores não permite estabelecer uma associação entre a aloreatividade das células NK e a ocorrência de episódios de Rejeição Aguda em Transplantados Renais. Desta forma, o papel dos ligantes não-HLA KIR deve ser considerado;
- A identidade ou a não-identidade para Grupos Ligantes HLA-C (C1 e C2), entre Receptores e Doadores, não estão associados à ocorrência de episódios de Rejeição Aguda;
- Nossos dados sugerem que a ocorrência de Rejeição Aguda pós-Transplante Renal possa não estar associada com a incompatibilidade KIR-Ligante (para os genes *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DL1*, *KIRDL2*, *KIR2DL3* e seu ligante HLA-C), e que potenciais alorreatividades das NK mediadas por este mecanismo, possam não ter um papel adicional no resultado do transplante;
- Variações na expressão dos genes *KIR2DS2* e *KIR2DS4* não estão associadas com a presença de Rejeição Aguda em Pacientes transplantados;

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology** 5ed., Saunders, 2005.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology** 4ed., Saunders, 2000.

BARBER RD, HARMER DW, COLEMAN RA, CLARK BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 11;21(3):389-95, 2005.

BARNARDO, M. C.; DAVEY, N. J.; BUNCE, M.; BROOKES, P. A.; LECHLER, R. I.; WELSH, K. I.; BATCHELOR, J. R. A correlation between HLA-C matching and donor antirecipient CTL precursor frequency in the bone marrow transplantation. **Transplantation** 61: 1420-1423; 1996.

BELL, J. Chromosome crawling in the MHC. **Trends in Genetics** 5: 289-290; 1989.

BENFIELD, M. R.; McDONALD, R.; SULLIVAN, E. K.; STABLEIN, D. M.; TEJANI, A. The 1997 Annual Renal Transplantation in Children Report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study (NAPRTCS). **Pediatr Transplant** 3:152-67; 1999.

BISHARA. A.; BRAUTBAR, C.; COHEN, I.; NAGLER, A. Positivity in a modified mixed leukocyte reaction test correlates with molecular HLA-C disparity in prediction of unrelated bone marrow transplantation outcome. **Human Immunology** 60: 833-839; 1999.

BISHARA A, BRAUTBAR C, ZAMIR G, et al. Impact of HLA-C and Bw epitopes disparity on liver transplantation outcome. *Hum Immunol*; 66: 1099, 2005.

BIX, M.; LIAO, N-S.; ZIJLSTRA, M.; LORING, J.; JAENISCH, R.; RAULET, D. Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. **Nature**, 349:329–31, 1991.

BOYINGTON, J. C.; SUN, P. D. A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptors. **Mol Immunol** 38:1007; 2002.

BOYINGTON, J.C.; MOTYKA, S.A.; SCHUCK, P.; BROOKS, A.G.; SUN, P.D. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. **Nature** 405: 537-543; 2000.

BRUTKIEWICZ, R. R.; WELSH, R. M. Major histocompatibility complex class I antigens and the control of viral infections by natural killer cells. **J Virol** 69:3967– 71; 1995.

BUHLER, S.; MEGARBANE, A.; LEFRANC, G.; TIERCY, J. M.; SANCHES-MAZAS, A. HLA-C molecular characterization of Lebanese population and genetic structure of 39 populations from Europe to India-Pakistan. **Tissue Antigens** 68: 44 – 57; 2006.

BUSTIN SA, BENES V, GARSON JA, HELLEMANS J, HUGGETT J, KUBISTA M, MUELLER R, NOLAN T, PFAFFL MW, SHIPLEY GL, VANDESOMPELE J, WITTEWER CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**. 55(4):611-22, 2009.

CARRINGTON, M.; NORMAN, P. The KIR Gene Cluster. 2003

CARVALHO, R. F. I Curso de inverno de manipulação de ácidos nucléicos – UNESP – Campus Botucatu; 2006.

CECKA, J. M. The UNOS renal transplant registry. **Clin Transpl** p. 1-18; 2001.

CERWENKA, A.; BARON, J. L.; LANIER, L. L. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 98:11521–26; 2001.

CHAN, H. W.; KURAGO, Z. B.; STEWART, C. A.; WILSON, M. J.; MARTIN M. P.; MACE, B. E.; CARRINGTON, M.; TROWSDALE, J.; LUTZ, C. T. DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. **J Exp Med** 197:245-255; 2003.

CHRISTANSEN, O.B.; MATHIENSES, O.; HUSTH, M.; LAURITSEN, J.G.; JERSIL, C.; GRUNNET, N. Prognostic significance of maternal DR histocompatibility type Danish women with recurrent miscarriages. **Human Reproduction** 8: 1843-1847; 1993.

CIROCCO, R. E.; MATHEW, J. M.; BURKE ILL, G. W.; ESQUENAZI, V.; MILLER J. Killer cell immunoglobulin-like receptor polymorphisms in HLA-identical kidney transplant recipients: lacks of 2DL2 and 2DS2 may be associated with poor graft function. **Tissue Antigens** 69: 123 – 124; 2007.

COLONNA, M.; BORSELLINO, G.; FALCO, M. et al. HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1-and NK2-specific natural killer cells. **Proc Natl Acad Sci** 90: 12000; 1993.

COLONNA, M.; SAMARIDIS, J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. **Science** 268:405-8; 1985.

COOK, M. A.; MILLIGAN, D. W.; FEGAN, C. D.; DARBYSHIRE, P. J.; MAHENDRA, P.; CRADDOCK, C. F.; MOSS, P. A. H.; BRIGGS, D. The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. **Blood** 103: 1521-1527: 2004.

COOKSEY, G.; ROBINS, R. A.; BLAMEY, R. W. Natural killer cells in renal allograft rejection. **Br J Surg** 71(11): 874; 1984.

DENG, L.; MARIUZZA, R.A. Structural basis for recognition of MHC and MHC-like ligands by natural killer cell receptors. **Seminars in Immunology** 18: 159-166; 2006.

DIEFENBACH, A.; JENSEN, E. R.; JAMIESON, A. M.; RAULET, D. H. Rae1 and H60

ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. **Nature** 413:165–71; 2001.

Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/dsra/integram.htm> Acesso em: Julho de 2010.

Disponível em: http://portal.saude.gov.br/saude/area.cfm?id_area=1004 Acesso em: Dezembro de 2010

Disponível em: <http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?268> Acesso em: Agosto de 2007.

Disponível em: http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/populacao/rbt/anoXVI_n4/index.aspx, Acesso em Janeiro de 2011

Disponível em http://nejm.org/teaching_tools/jpegs_large/klei.fig1.jpg, Acesso em Novembro de 2007

Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: julho de 2007

Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/index.html> Acesso em: Janeiro de 2011

Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html> Acesso em Janeiro de 2011

Disponível em <http://www.rtprimerdb.org/> Acesso em: Dezembro de 2010

Disponível em: <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html> Acesso em: Janeiro de 2011

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/iprimer-blast/primerinfo.html>; Acesso em: Agosto de 2010

Disponível em: <http://www.idtdna.com/ANALYZER/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx> Acesso em: Agosto de 2010

Disponível em: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3b/Serial_Dilution_\(to_PCR\).jpg/900px-Serial_Dilution_\(to_PCR\).jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3b/Serial_Dilution_(to_PCR).jpg/900px-Serial_Dilution_(to_PCR).jpg) Acesso em: Maio de 2010

DOHRING, C.; SAMARIDIS, J.; COLONNA, M. Alternatively spliced forms of human killer inhibitory receptors. **Immunogenetics** 44:227-30; 1996

DOKUN, A. O.; CHU, D. T.; YANG, L. et al. Analysis of in situ NK cell responses during viral infection. **J Immunol** 167: 5286; 2001.

ETTENGER, R. B.; ROSENTHAL, J. T.; MARIK, J. Cadaver renal transplantation in children: results with long-term cyclosporine immunosuppression. **Clin Transpl** 4:329-36; 1990.

FAN, Q. R.; LONG, E. O.; WILEY, D. C. Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-C4 complex. **Nat Immunol** 2:452; 2001.

FAN, Q. R.; MOSYAK, L.; WINTER, C. C.; WAGTMANN, N.; LONG, E. O.; WILEY, D. C. Structure of the inhibitory receptor for human natural killer resembles haematopoietic receptors. **Nature** 389:96; 1997.

FRENCH, A. R.; YOKOYAMA, W. M. Natural killer cells and viral infections. **Curr Opin Immunol** 15:45– 51; 2003.

FROHN, C.; FRICKE, L.; PUCHTA, J.; KIRCHNER, H. The effect of HLA-C matching on acute renal transplant rejection. **Nephrol Dial Transplant** 16: 355-360; 2001.

GARDINER, C. M.; GUETHLEIN, L. A.; SHILLING, H. G.; PANDO, M.; CARR, W. H.; RAJALINGAM, R.; VILCHES, C.; PARHAM, P. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. **J Immunol** 166:2992; 2001.

GOMEZ-LOZANO, N.; GARDINER, C.M.; PARHAM, P.; VILCHES, C. Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. **Immunogenetics** 54: 314-319; 2002.

GÓMEZ-LOZANO N, TROMPETER HI, DE PABLO R, ESTEFANÍA E, UHRBERG M, VILCHES C. Epigenetic silencing of potentially functional KIR2DL5 alleles: Implications for the acquisition of KIR repertoires by NK cells. **Eur J Immunol**. Jul;37(7):1954-65, 2007.

HANCOCK, W. W.; GEE, D.; De MOERLOOSE, P. et al. Immunohistological analysis of serial biopsies taken during human renal allograft rejection. **Transplantation** 39(4): 430; 1985.

HAREL-BELLAN A., QUILLET A., MARCHIOL C., DeMARS R., TURSZ T., FRADELIZI D. Natural Killer susceptibility of human cells may be regulated by genes in the HLA region on chromosome 6. **Proc Natl Acad Sci** 83:5688; 1986.

HIEN TRAN, T.; MYTILINEOS, J.; SCHERER, S.; LAUX, G.; MIDDLETON, D.; OPELZ, G. Analysis of KIR ligand incompatibility in Human Renal Transplantation. **Transplantation** 80: 1121-1123; 2005.

HOGLUND, P.; OHLEN, C.; CARBONE, E.; FRANKSSON, L.; LJUNGGREN, H-G.; et al. Recognition of β 2-microglobulin-negative (β 2m-) T-cell blasts by natural killer cells from normal but not from β 2m-mice: nonresponsiveness controlled by β 2m-bone marrow in chimeric mice, **Proc. Natl. Acad. Sci.** 88:10332–36, 1991.

HSU, K. C.; CHIDA, S.; DUPONT, B.; GERAGTHY, D. E. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. **Immunology Rev** 190:40; 2002A.

HSU, K. C.; LIU, X. R.; SELVAKUMAR, A.; MICKELSON, E.; O'RELLY, R. J.; DUPONT,

B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. **J Immunol** 169:5118; 2002B.

HUGHES, A. L. Natural selection and diversification of vertebrate immune effectors. **Immunol Rev** 190:161; 2002.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J.D. **Imunobiologia o sistema imunológico na saúde e na doença** 4ed., Artmed, 2000.

JOHN, S. W. M.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C. R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocyte. **Nucleic Acids Research**. 192:408, 1990.

KÄRRE, K. NK Cells, MHC Class I Molecules and Missing Self, **Scandinavian Journal of Immunology**. 55:221-228, 2002.

KÄRRE, K. Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a reevaluation and hypothesis. In Callewaert D. Herberman RB, eds. Mechanisms of Cytotoxicity by NK Cells. San Diego: **Academic Press**. 81-91, 1985.

KIESSLING, R.; KLEIN, E.; WIGZEL, H. Natural killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cell. Specificity and distribution according to genotype. **Eur J Immunol**, 5:122-207, 1975.

KLEIN, J.; SATO, A. The HLA system: first of two parts. **N Engl J Méd** 343:702-9; 2000.

KREIJVELD, E., MEER, A. V. D., TIJSSEN, H. J., HILBRANDS, L. B., & JOOSTEN, I. *KIR* Gene and KIR Ligand Analysis to Predict Graft Rejection After Renal Transplantation. **Transplantation**, 84(8), 1045-1051, 2007.

KUNERT, K., SEILER, M., MASHREIGHI, M. F., KLIPPERT, K., SCHÖNEMANN, C., NEUMANN, K., et al. KIR/HLA Ligand Incompatibility in Kidney Transplantation. **Transplantation**, 84(11), 1527-1533, 2007.

LAMM, L.U.; OLAISEN, B. Report of the committee on the genetic constitution of the chromosome 5 and 6. **Cytogenetics and Cell Genetics** 40: 128; 1985.

LANIER, L. L. NK cell receptors. **Annu Rev Immunol** 16:359–393; 1998.

LANIER, L. L. On guard-activating NK cell receptors. **Nat Immunol** 2:23; 2001.

LANIER, L.L. NK cell recognition. **Annu. Rev. Immunol.** 23: 225-274; 2005.

LIN, Y.; PROUD, G.; TAYLOR, R. M. R. et al. Renal allograft rejection: Protection of renal epithelium from natural killer cells by cytokine-induced up-regulation of class I major histocompatibility antigens. **Immunology** 79: 290; 1993.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods**.25(4):402-8. 2001.

LJUNGGREN, H. G.; KARRE, K.. In search of the “missing self” hypothesis. MHC molecules and NK cell recognition. **Immunol Today** 11:237 – 44; 1990.

LONG, E. O. Tumour cell recognition by natural killer cells. **Semin Cancer Biol** 12:57–61; 2002.

McERLEAN, C., GONZALEZ, A. a, CUNNINGHAM, R., MEENAGH, A., SHOVLIN, T., & MIDDLETON, D. Differential RNA expression of KIR alleles. **Immunogenetics**, 62(7), 431-40, 2010

MAIER, S.; TERTILT, C.; CHAMBRON, N. et al. Inhibition of natural killer cells results in acceptance of cardiac allografts in CD28^{-/-} mice. **Nat Med** 7: 557; 2001.

MARBOE, C. C.; KNOWLES, D. M.; CHESS, L. et al. The immunologic and ultra-structural characterization of the cellular infiltrate in acute cardiac allograft rejection: Prevalence of cells with the natural killer (NK) phenotype. **Clin Immunol Immunopathol** 27(1): 141; 1983.

MARSH, S. G. E.; PARHAM, P.; DUPONT, B.; GERAGHTY, D. E.; TROWSDALE, J.; MIDDLETON, D.; VILCHES, C.; CARRINGTON, M.; WITT, C.; GUETHLEIN, L. A.; SHILLING, H.; GARCIA, C. A.; HSU, K. C.; WAIN, H. Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) Nomenclature Report, 2002
Tissue Antigens 62:79-86; 2003.

MARTIN, A.; KULSKI, J. K.; WITT, C.; PONTAROTTI, P.; CHRISTIANSEN, F. T. Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men. **Immunology** .23: 2; 2002.

MARTIN, M. P. Tipagem de genes *KIR* e sua aplicação em estudos de populações, associação com doenças e transplantes. In: **CONGRESSO DA SBTMO**, 8., 2004, Curitiba.

MAXWEL, L. D.; WALLACE, A.; MIDDLETON, D.; CURRAN, M. D. A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. **Tissue Antigens** 60:254; 2002.

McENERY, P.; STABLEIN, D.; ARBUS, G.; TEJANI, A. Renal transplantation in children. **N Engl J Med** 326:1727-32; 1992.

MINGARI, M. C.; VITALE, C.; CAMBIAGGI, A.; SCHIAVETTI, F.; MELIOLI, G.; FERRINI, S.; POGGI, A. Cytolytic T lymphocytes displaying natural killer (NK)-like activity. Expression of NK-related functional receptors for HLA-class I molecules (p58 and CD94) and inhibitory effect on TCR-mediated target cell lysis or lymphokine production. **Int Immunol** 7:697-703; 1995.

MORETTA A., TAMBUSSI G., BOTTINO C. C., TRIPODI G., MERLI A., CICCONE E., PANTALEO G., MORETTA L., A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3⁺ CD16⁺ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic. **J Exp Med** 171: 695; 1990.

MORETTA, L.; MORETTA, A. Killer immunoglobulin-like receptors. **Immunology** 16:626–633; 2004.

MORETTA, L.; BIASSONI, R.; BOTTINO, C.; CANTONI, C.; PENDE, D.; MINGARI, M. C.; et al. Human NK cells and their receptors. **Microbes Infect** 4:1539– 44; 2002.

MOYA-QUILES, M. R.; MURO, M.; TORIO, A.; SANCHEZ-BUENO, F.; MIRAS, M.; MARIN, L.; GARCIA-ALONSO, A. M.; PARRILA, P.; DAUSSET, J.; ALVAREZ-LOPEZ, M. Human leukocyte Antigen-C in Short nad Long-Term liver graft Acceptance. **Liver Transplantation** 9: 218-227; 2003.

MOYA-QUILES, M. R.; ALVAREZ, R.; MIRAS, M.; GOMEZ-MATEO, J.; LOPEZ-ALVAREZ, M R.; MARIN-MORENO, I.; MARTINEZ-BARBA, E.; SANCHEZ-MOZO, M. P.; GOMEZ, M.; ARNAL, F.; SANCHEZ-BUENO, F.; MARIN, L. A.; GARCIA-ALONSO, A. M.; MINGUELA, A.; MURO, M.; PARRILLA, P.; ALONSO, C.; ALVAREZ-LOPEZ, M. R. Impact of recipient HLA-C in liver transplant: A protective effect of HLA-C*07 on acute rejection. **Human Immunology** 68: 51-58; 2007.

MULROONEY TJ, HOU L, STEINER NK, CHEN M, BELLE I, NG J, HURLEY CK. Promoter variants of KIR2DL5 add to diversity and may impact gene expression. **Immunogenetics**. 60(6):287-94, 2008.

NORMAN, P. G.; STEPHENS, H. A.; VERITY, D. H.; CHANDANAYINGYONG, D.; VAUGHAN, R. W. Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. **Immunogenetics** 52:195; 2001.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. 33: 10 – 13; 2004.

OLCESE, L.; CAMBIAGGI, A.; SEMENZATO, G.; BOTTINO, C.; MORETTA, A.; VIVIER, E. Human Killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells. **J Immunol** 158:5083; 1997.

POPOOLA, J.; WOOD, K. J.; SACKS, S. H. et al. Infiltration of allografts by natural killer cells precedes T cells: Cross talk between the innate and adaptive immune system? **Am J Transplant** 1(S): 168; 2001.

RUGGERI, L.; CAPANNI, M.; MANCUSI, A.; URBANI, E.; PERRUCCIO, K.; BURCHIELLI, E.; TOSTI, A.; TOPINI, F.; AVERSA, F.; MARTELLI, M.F.; VELARDI, A. Alloreactive natural killer cells in mismatched hematopoietic stem cell transplantation. **Blood Cells, Molecules, and Diseases** 33: 216-221; 2004A.

SANTAOURLIDIS, S.; TROMPETER, H-I.; WEINHOLD, S.; EISERMANN, B.; MEYER, K. L., WERNET, P.; UHRBERG, M. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. **J Immunol** 169:4253-4261; 2002.

SAULQUIN, X.; GASTINEL, L.N.; VIVIER, E. Crystal structure of the human natural killer

cell activator receptor KIR2DS2(CD158j). **J Exp Med** 197: 933-938; 2003.

SELVAKUMAR, A.; STEFFENS, U.; DUPONT, B. NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains. **Tissue Antigens** 48:285-94; 1996.

SELVAKUMAR, A.; STEFFENS, U.; DUPONT, B. Polymorphism and domain variability of human killer cell inhibitory receptors. **Immunol Rev** 155:183; 1997A.

SHILLING, H. G.; GUETHLEIN, L. A.; CHENG, N. W.; GARDINER, C. m.; RODRIGUEZ, R.; TYAN, D.; PARHAM, P. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. **J Immunol** 168:2307; 2002.

SIELER, M.; SCHOENEMANN, C.; MASHREGHI, M. F.; REINKE, P. VOLK, H. KOTSCH, K. Incompatibility between KIR2DL1 and its HLA-C ligands is associated with acute rejection in kidney transplantation. **Human Immunology** 66: 58; 2005.

SIVORI, S.; VITALE, M.; MORELLI, L.; SANSEVERINO, L.; AUGUGLIARO, R.; BOTTINO, C.; MORETTA, L.; MORETTA, A. p46, a novel Natural Killer cell-specific surface molecule which mediates cell activation. **J Exp Med** 186:1129-1136; 1997.

SNYDER, G.A.; BROOKS, A.G.; SUN, P.D. Crystal structure of the HLA-C3 allotype-specific killer cell inhibitory receptor KIR2DL2. **Proc Natl Acad Sci USA** 96: 3864-3869; 1999.

SPITS, H.; BLOM, B.; JALECO, A. C.; WEIJER, K.; VERSCHUREN, M. C. Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. **Immunol. Rev.** 165:75–86, 1998.

TAYLOR S, WAKEM M, DIJKMAN G, ALSARRAJ M, NGUYEN M. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. **Methods** 50(4):S1-5, 2010.

TONEVA, M.; LEPAGE, V.; LAFAY, G.; DULPHY, N.; BUSSON, M.; LESTER, S.; VU-TRIEN, A.; MICHAYLOVA, A.; NAUMOVA, E.; McCLUSKEY, J. et al. Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. **Tissue Antigens** 57:358; 2001.

TORKAR, M.; NORGATE, Z.; COLONNA, M.; TROWSDALE, J.; WILSON, M. J. Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex. **Eur J Immunol** 28:3959-67; 1998.

TOTTERMAN, T. H.; HANAS, E.; BERGSTROM, R. et al. Immunologic diagnosis of kidney rejection using FACS analysis of graft-infiltrating functional and activated T and NK cell subsets. **Transplantation** 47(5): 817; 1989.

TRINCHERI, G. Biology of natural killer cells. **Adv Immunol** 47: 187; 1989.

TROWSDALE, J.; BARLEN, R.; HAUDE, A.; STEWART, C. A.; BECK, S.; WILSON, M. J. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. **Immunol Rev** 181:20; 2001.

UHRBERG, M.; VALIANTE, N. M.; SHUM, B. P.; SHILLING H. G.; LIENERT-WEIDENBACH, K.; CORLISS, B.; TYLAN, D.; LANIER, L. L.; PARHAM, P. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. **Immunity** 7:753; 1997.

UHRBERG M. Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at KIR gene regulation. **Mol Immunol.** 42(4):471-5, 2005.

VALES-GOMEZ, M.; REYBURN, H. T.; ERSKINE, R. A.; STROMINGER, J. Differential binding to HLA-C of p50-inhibitory natural killer cell receptors. **Proc Natl Acad Sci** 95:14326; 1998.

VALIANTE, N. M.; UHRBERG, M.; LIENERT-WEIDENBACH, K.; ARNETT, K. L.; D'ANDREA, A.; PHILLIPS, J. H.; LANIER, L. L.; PARHAM, P. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. **Immunity** 7:739; 1997.

VAMPA, M. L.; NORMAN, P. J.; BURNAPP, L.; VAUGHAN, R. W.; SACKS, S. H.; WONG, W. Natural killer-cell activity after human renal transplantation in relation to killer immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigen mismatch. **Transplantation** Vol. 76, 1220–1228, No. 8, October 27, 2003.

VILCHES, C.; GARDINER, C. M.; PARHAM, P. Gene structure and promoter variation of expressed and nonexpressed variants of the KIR2DL5 gene. **J Immunol** 165:6416; 2000A.

VILCHES, C.; PANDO, M. J.; RAJALINGAM, R.; GARDINER, C. M.; PARHAM, P. Discovery of two novel variants of KIR2DS5 reveals this gene to be a common component of human KIR 'B' haplotypes. **Tissue Antigens** 56:453-6; 2000B.

VILCHES, C.; PARHAM, P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. **Annu Rev Immunol** 20:217–251; 2002.

VILCHES, C.; RAJALINGAM, R.; UHRBERG, M.; GARDINER, C. M.; YOUNG, N. T.; PARHAM, P. KIR2DL5, a novel killer-cell receptor with a D0-D2 configuration of Ig-like domains. **J Immunol** 164:5797-804; 2000C.

VIVIER, E.; ANFOSSI, N. Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. **Nat Rev Immunol** 4:190-198; 2004.

WAGTMANN, N.; BIASSONI, R.; CANTONI, C.; VERDIANI, S.; MALNATI, M. S.; VITALE, M.; BOTTINO, C.; MORETTA, L.; MORETTA, A.; LONG, E. O. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. **Immunity** 2:439-49; 1995.

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. **Proc Natl Acad Sci** 97:4778; 2000.

WILSON, M. J.; TORKAR, M.; TROWSDALE, J. Genomic organization of a human killer

cell inhibitory receptor gene. **Tissue antigens** 49:574; 1997.

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.

WITT, C. S.; MARTIN, A.; CHRISTIANSEN, F. T. Detection of KIR2DL4 alleles by sequencing and SSCP reveals a common allele with a shortened cytoplasmic tail. **Tissue Antigens** 56:248; 2000.

YAWATA, M.; YAWATA N.; McQUEEN, K. L.; CHENG, N. W.; GUETHLEIN, L. A.; RAJALINGAM, R.; SHILLING, H. G.; PARHAM, P. Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression. **Immunogenetics** 54:543; 2002.

ANEXO I
TABELA DE SINÔNIMOS DOS LOCOS *KIR*

TABELA 1

Símbolo do gene	Símbolo da proteína	Descrição	Sinônimos
<i>KIR2DL1</i>	KIR2DL1	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática longa, 1	47.11, CD158a, cl-42, nkat1, p58.1
<i>KIR2DL2</i>	KIR2DL2	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática longa, 2	CD158b1, cl-43, nkat6
<i>KIR2DL3</i>	KIR2DL3	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática longa, 3	CD158b2, cl-6, nkat2, nkat2a, nkat2b, p58
<i>KIR2DL4</i>	KIR2DL4	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática longa, 4	15.212, 103AS, CD158d
<i>KIR2DL5A</i>	KIR2DL5A	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática longa, 5A	CD158f, KIR2DL5.1
<i>KIR2DL5B</i>	KIR2DL5B	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática longa, 5B	KIR2DL5.2, KIR2DL5.3, KIR2DL5.4
<i>KIR2DS1</i>	KIR2DS1	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática curta, 1	CD158h, EB6ActI, EB6ActII
<i>KIR2DS2</i>	KIR2DS2	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática curta, 2	183ActI, CD158j, cl-49, nkat5
<i>KIR2DS3</i>	KIR2DS3	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática curta, 3	nkat7
<i>KIR2DS4</i>	KIR2DS4	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática curta, 4	CD158i, cl-39, KKA3, nkat8
<i>KIR2DS5</i>	KIR2DS5	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, cauda citoplasmática curta, 5	CD158g, nkat9
<i>KIR2DP1</i>	KIR2DP1	Receptor semelhante à Ig da célula NK, dois domínios, pseudogene 1	KIR2DL6, KIR15, KIRY, KIRZ
<i>KIR3DL1</i>	KIR3DL1	Receptor semelhante à Ig da célula NK, três domínios, cauda citoplasmática longa, 1	AMB11, CD158e1, cl-2, cl-11, KIR, nkat3, NKB1, NKB1B
<i>KIR3DL2</i>	KIR3DL2	Receptor semelhante à Ig da célula NK, três domínios, cauda citoplasmática longa, 2	CD158k, cl-5, nkat4, nkat4a, nkat4b
<i>KIR3DL3</i>	KIR3DL3	Receptor semelhante à Ig da célula NK, três domínios, cauda citoplasmática longa, 3	CD158z, KIR3DL7, KIR44, KIRC1
<i>KIR3DS1</i>	KIR3DS1	Receptor semelhante à Ig da célula NK, três domínios, cauda citoplasmática curta, 1	CD158e2, nkat10
<i>KIR3DP1</i>	KIR3DP1	Receptor semelhante à Ig da célula NK, três domínios, pseudogene 1	CD158c, KIR2DS6, KIR3DS2P, KIR48, KIRX

ANEXO II
DESCRIÇÃO DA METODOLOGIA

TRANSCRIÇÃO REVERSA

Essa abordagem visa a produção de cDNA (moléculas de DNA complementar) a partir de fitas simples do *RNA*m de interesse extraído e purificado. Pode-se utilizar iniciadores específicos, randômicos ou oligo dT e, no caso do presente trabalho, optou-se pelos iniciadores randômicos para que um mesmo cDNA possa ser utilizado para análise da expressão de diferentes genes. O iniciador randômico anela na seqüência interna do *RNA*m (FIGURA 19) e não na cauda poli-A como o oligo dT (FIGURA 20), a especificidade é dada pelo anelamento de iniciadores específicos durante a qPCR. A transcrição reversa está sendo realizada através do kit *Superscript III First Stand Synthesis Supermix for qRT-PCR* da empresa Invitrogen.



FIGURA 19. EXEMPLO DO ANELAMENTO DE UM INICIADOR RANDÔMICO

FONTE: CARVALHO, R. F. I Curso de inverno de manipulação de ácidos nucléicos – UNESP – Campus Botucatu. Random primer = Iniciador Randômico.

Após o anelamento do iniciador, a enzima transcriptase reversa produzirá uma cadeia de DNA complementar (cDNA) ao *RNA*m fita simples (FIGURA 20). O passo seguinte segue com a degradação da fita de RNA. Contudo essa degradação não é completa, os fragmentos de RNA que restam, atuam como iniciadores para a polimerização (pela DNA polimerase) da outra fita complementar de DNA.

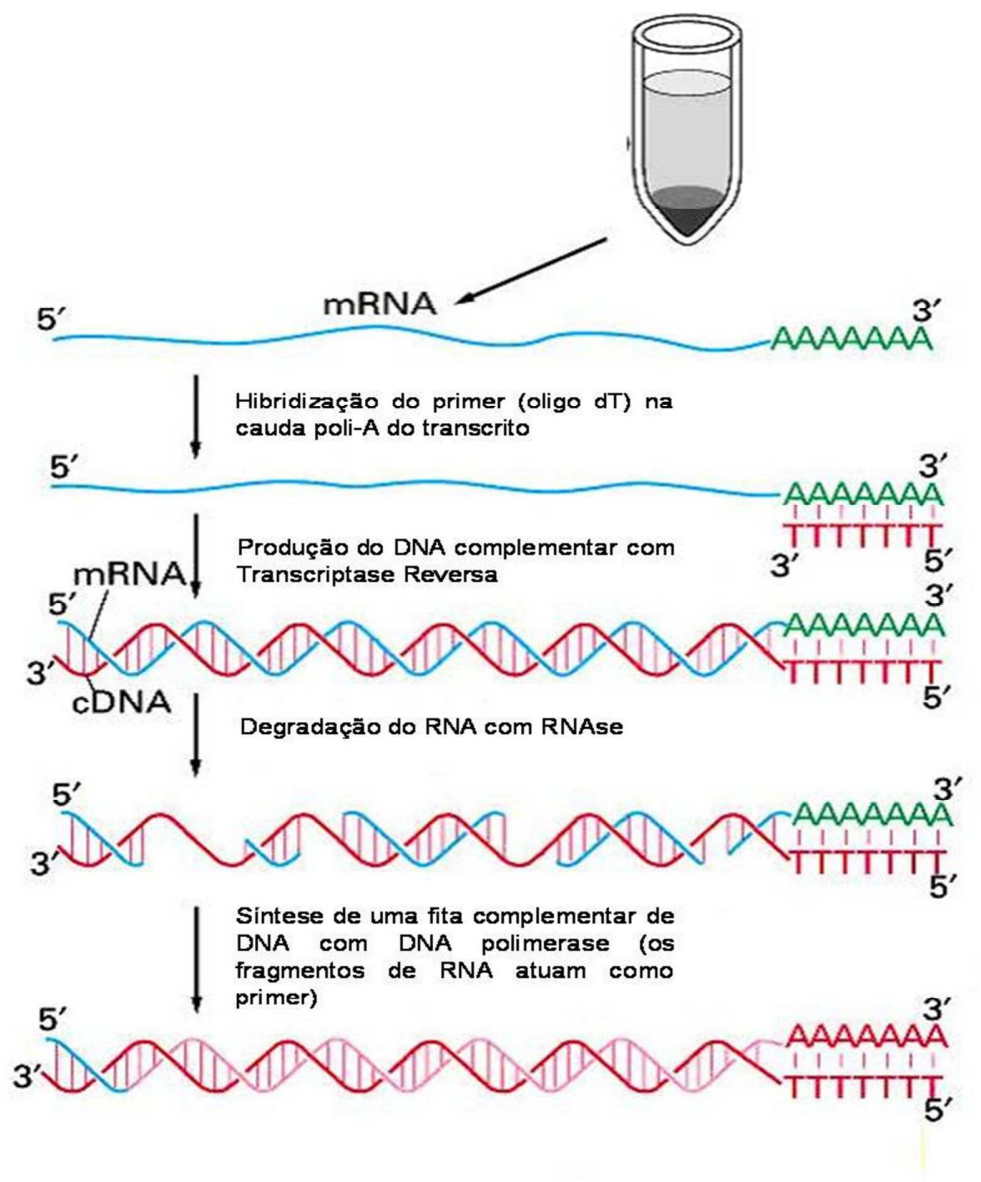


FIGURA 20. PRODUÇÃO DO cDNA (DUPLA FITA) A PARTIR DO RNAm POR TRANSCRIÇÃO REVERSA. NOTA: Nesta figura são utilizados iniciadores do tipo oligo dT

FONTE: CARVALHO, R. F. I Curso de inverno de manipulação de ácidos nucléicos – UNESP – Campus Botucatu.

PCR TEMPO REAL

A PCR em tempo real realiza a quantificação de DNA e cDNA de maneira bastante precisa pois determina os valores durante a fase exponencial de amplificação (*Ciclo de Quantificação* – C_q – ponto onde a reação atinge o limiar da fase exponencial) (FIGURA

21). Esta notação de C_q é sugerida por Bustin e colaboradores (2009). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado em mecanismos de fluorescência. A emissão de compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Sendo assim os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado.

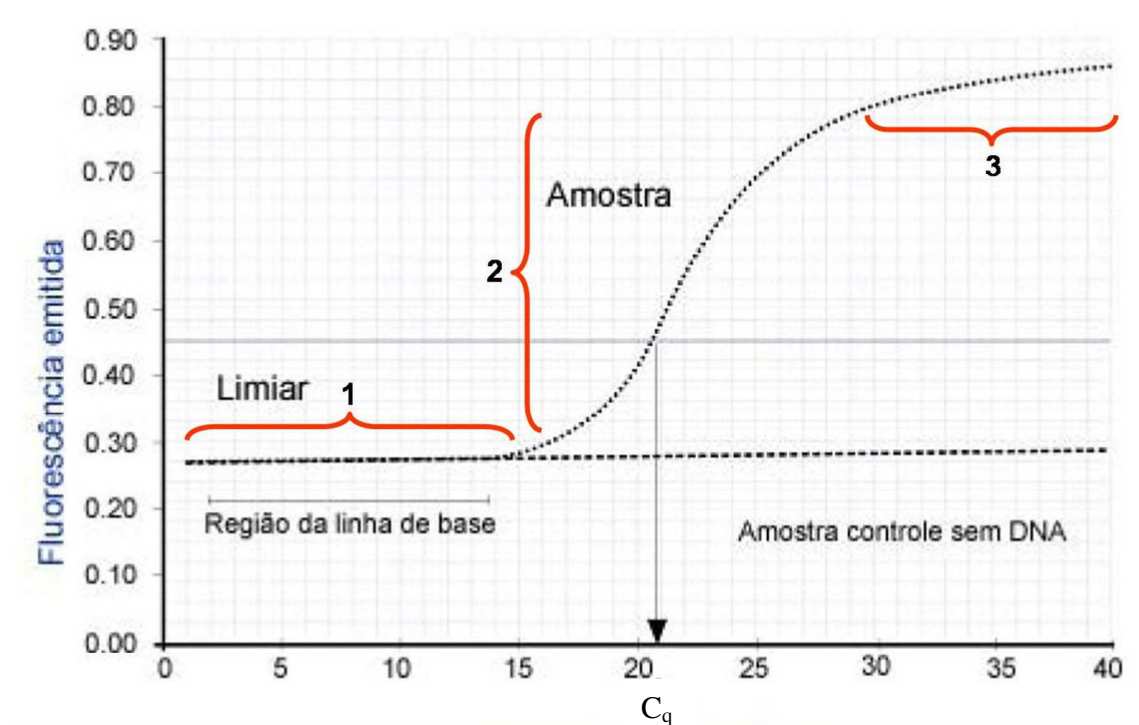


FIGURA 21. Curva de amplificação do PCR em tempo real (qPCR)

Nota: C_q = Ciclo de Quantificação. A amplificação mostra 3 fases distintas: 1) linha basal: não houve produtos de PCR suficientes para detecção de sinais de fluorescência; 2) fase log: a quantidade de produtos de PCR dobra a cada ciclo; 3) fase platô: não há mais aumento do número de produtos.

FONTE: NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. 33: 10-13; 2004.

Dois compostos fluorescentes são mais utilizados, *Taqman*[®] e *SYBR*[®] Green. No presente estudo utilizamos o sistema *SYBR*[®] Green pois como agente fluorescente pois possibilita a determinação da especificidade dos iniciadores e da produção indesejada de possíveis dímeros de iniciadores através da curva de dissociação (*melting curve*). A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que

contém um termociclador com sistema óptico para excitação da fluorescência e coleção da emissão desta, além de um computador com software para detecção e análise dos dados.

O fluoróforo *SYBR® Green* consiste em um agente intercalante da dupla fita do DNA (FIGURA 22) que fluoresce quando intercalado e excitado pelo sistema do termociclador. O *SYBR® Green* não ligado à dupla fita do DNA exibe uma fluorescência muito baixa, entretanto quando ligada à dupla fita esta é realçada. Durante o processo de polimerização catalisada pela DNA Polimerase, as moléculas do fluoróforo vão se ligando ao DNA recentemente sintetizado. Assim a reação é monitorada continuamente e um aumento da fluorescência é observado em tempo real (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004). Desta forma, o número de moléculas pode ser quantificado. O *SYBR® GREEN*, por suas propriedades, permite a realização da curva de dissociação, passo importante para identificação de dímeros de iniciadores e sondas.

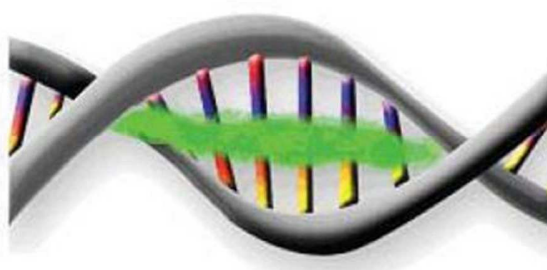


FIGURA 22. MOLÉCULA DE FLUORÓFORO *SYBR® GREEN* INTERCALANDO A DUPLA FITA DE DNA RECÉM SINTETIZADA.

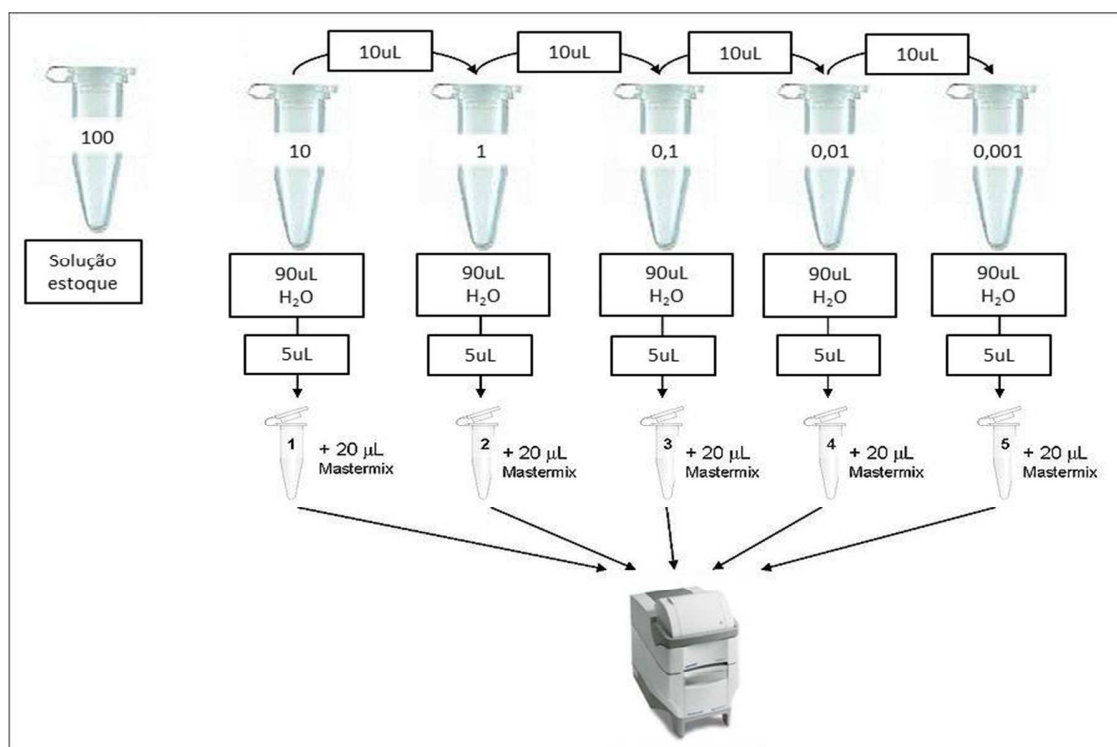
FONTE: NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. 33: 10-13; 2004.

Para assegurar uma maior confiabilidade dos dados da quantificação relativa em qPCR são necessários alguns passos iniciais: Validação da qPCR; Verificar a estabilidade dos genes de referência; Definição da amostra calibradora; Projetar os experimentos.

5.6.1.3. VALIDAÇÃO DA qPCR

A validação da qPCR consiste em uma amplificação do gene através da curva padrão (uma diluição seriada com fator de diluição de 10 vezes) (FIGURA 23) para verificar a eficiência da reação (concentração ideal dos reagentes e da amostra, além do anelamento específico dos iniciadores ao produto de interesse). A eficiência de reação é a medida da taxa em que a polimerase converte os reagentes (dNTPs, oligonucleotídeos e cDNA) em *amplicons* (TAYLOR *et al.*, 2010). Esta curva padrão deve ser realizada para cada gene de interesse, para os genes de referência e possuir ao menos cinco diluições.

FIGURA 23. DILUIÇÃO SERIADA PARA PRODUÇÃO DA CURVA PADRÃO DE UM GENE ALVO.



FONTE: Modificado de: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3b/Serial_Dilution_\(to_PCR\).jpg/900px-Serial_Dilution_\(to_PCR\).jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3b/Serial_Dilution_(to_PCR).jpg/900px-Serial_Dilution_(to_PCR).jpg) Acesso em: 20/05/10.

Os valores ideais, gerados pelo software de análise da curva padrão, para uma diluição com fator 10, devem aproximar-se de: -3,32 para o Slope; 1,00 para eficiência e 0,999 para o R². A proximidade a estes valores demonstra que a eficiência da reação

está próxima a 100%, ou seja, a cada ciclo o número de moléculas presentes na reação é dobrado. Para outros fatores de diluição, o valor ideal para o slope deve ser calculado pela fórmula $2^n = \text{fator de diluição}$, onde n é o número de ciclos entre as curvas de amplificação. Por exemplo, $2^n = 5$, desta forma $n = 2,32$ (TAYLOR *et al.*, 2010).

Posteriormente os dados das curvas padrão são alinhados dois a dois em um gráfico onde o eixo das ordenadas apresenta os Cq e o eixo das abscissas os fatores de diluição (FIGURA 24). Para genes cujas reações de amplificação possuem eficiências similares, a diferença entre os Cq (ΔCq) de ambos os genes analisados para um determinado fator de diluição, deve ser a mesma para os demais fatores ($\Delta Cq_{\text{fator } 10x} = \Delta Cq_{\text{fator } 1x} = \Delta Cq_{\text{fator } 0,1x} \dots$). O valor do *Slope* (inclinação da reta, calculada pela equação $Y = Ax+B$) deve estar entre o intervalo de $-0,1 > x > 0,1$.

FIGURA 24. VALIDAÇÃO DO ENSAIO ENTRE OS GENES

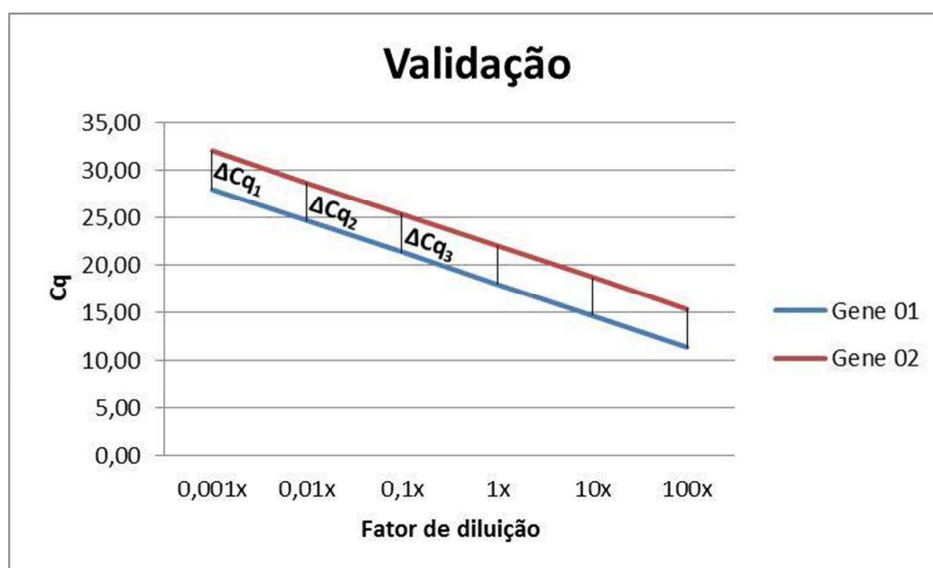


Figura 24. Cq = Ciclo de quantificação; ΔCq = Diferença entre o Cq do gene 1 e o Cq do gene 2 em um determinado fator de diluição.

As eficiências dos ensaios dos genes alvo e genes de referência devem ser similares, podendo assim, possuir um desvio aceitável de 10% (MENDES, 2010).

5.6.1.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES

O método do Cq Comparativo ($\Delta\Delta C_t$) foi utilizado para quantificação relativa da expressão dos genes. Esta metodologia, é realizada através da comparação do Cq do gene alvo com o Cq dos genes de referência para cada amostra. Desta forma, os dados referentes a expressão do gene alvo são normalizados através da expressão constitutiva dos genes de referência. Isto reduz possíveis desvios ocasionados por eventuais diferenças entre tratamentos, quantidades iniciais de tecido e eficiência enzimática dos ensaios (CASTAN, 2010). Outro passo importante é a escolha de uma amostra calibradora onde a expressão de todas as outras serão relativas a esta, por exemplo o sangue do paciente antes de receber a imunossupressão. Esta amostra pode ser mais ou menos expressa que as demais, isto depende do tipo de ensaio. A comparação dos Cqs, realizada conforme a Figura 25, e posteriormente o valor de $\Delta\Delta C_q$ foi colocado na fórmula $2^{-\Delta\Delta C_q}$ e assim teremos a quantidade relativa da expressão do gene analisado.

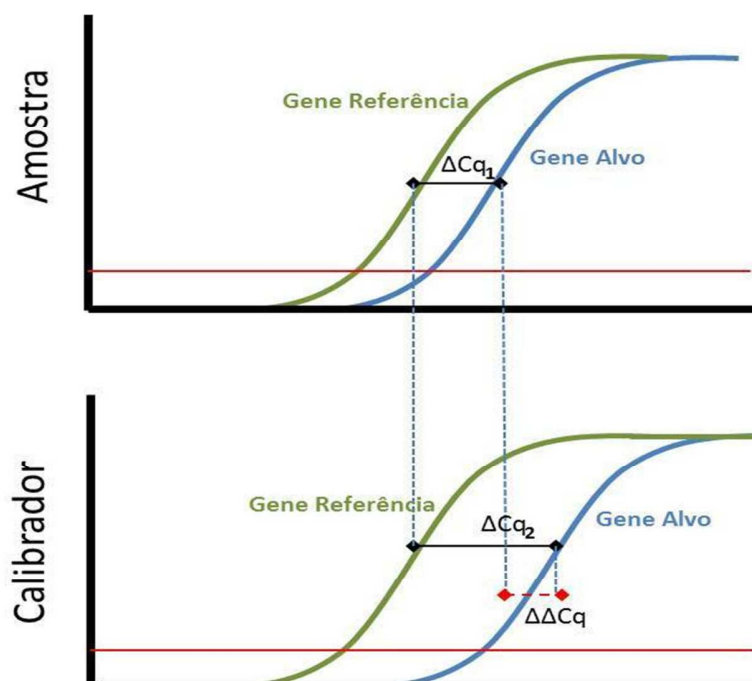


FIGURA 21. MÉTODO DO Ct COMPARATIVO

Nota: ΔCq_1 = Diferença entre os Cqs do gene de referência e do gene alvo para uma amostra a ser testada; ΔCq_2 = Diferença entre os Cqs do gene de referência e do gene alvo para amostra calibradora. $\Delta\Delta Cq$ = Diferença entre ΔCq_1 e ΔCq_2 .

FONTE: O Autor (2010)

Caso a eficiência das reações para os diferentes genes não sejam similares, uma nova fórmula deve ser adotada conforme apresentado na Tabela 9 (MENDES, 2010).

TABELA 9. CÁLCULO PARA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA EXPRESSÃO

Eficiências	Valor	Quantificação Relativa
Gene Alvo = Gene Referência	100%	$2^{-\Delta\Delta Cq}$
Gene Alvo = Gene Referência	<100%	$(1+E)^{-\Delta\Delta Cq}$
Gene Alvo \neq Gene Referência	-	Curva Padrão Relativa

Tabela 9. Cálculo da quantificação realtiva da expressão dos genes alvo. E = eficiência para o gene alvo e para o gene referência, caso estas não sejam idênticas devemos utilizar a média entre as duas eficiências.

SEQUENCIAMENTO DO GENE HLA-C

O objetivo desta técnica é a obtenção de seqüências nucleotídicas das regiões específicas de interesse de um determinado genoma. As etapas necessárias são:

1) Amplificação do gene de interesse;

A partir de iniciadores específicos para o gene de interesse é feita sua amplificação via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase);

2) Purificação do produto amplificado;

Eliminação de iniciadores não hibridizados e resíduos.

3) Reação de sequenciamento;

Durante a reação de sequenciamento, utiliza-se um primer *forward* (5' - 3') ou *reverse* (3' - 5'), nucleotídios livres (dNTPs), nucleotídios marcados com fluorescência (ddNTPs) e a enzima Taq Polimerase. É realizada então uma outra PCR

onde o a partir do anelamento do primer, os nucleotídios são incorporados de acordo com a fita molde. Ocorre tanto a incorporação dos nucleotídios livres não marcados quanto os nucleotídios marcados com fluorescência, onde cada tipo de nucleotídio recebe uma fluorescência de cor diferente (por exemplo: **T**, **A**, **C**, **G**). Os nucleotídios marcados são denominados de “nucleotídios de terminação”, pois sua incorporação determina o término do alongamento da dupla fita (FIGURA 16). No final da reação são gerados fragmentos de vários tamanhos diferentes e conseqüente sobra de primers, ddNTPs, alguns sais entre outros reagentes. Sendo assim se faz necessário o próximo passo.

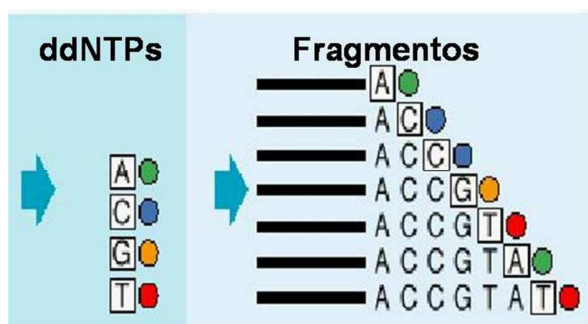


FIGURA 16. FRAGMENTOS DE DIFERENTES TAMANHOS PRODUZIDOS PELA INCORPORAÇÃO DE ddNTPs.

4) Purificação do DNA amplificado;

Esta etapa visa eliminar tais resíduos aumentando a qualidade das seqüências produzidas.

5) Corrida em polímero;

Depois de purificado, o produto de PCR é submetido a corrida eletroforética em capilar no seqüenciador automático. A detecção dos nucleotídios é feita com auxílio de um laser que estimula a fluorescência dos nucleotídios marcados (FIGURA 17) e esta é detectada por uma câmara de detecção. A partir deste ponto,

eletroferogramas são gerados com base nesta detecção dos nucleotídeos e a seqüência já pode ser analisada (FIGURA 18).

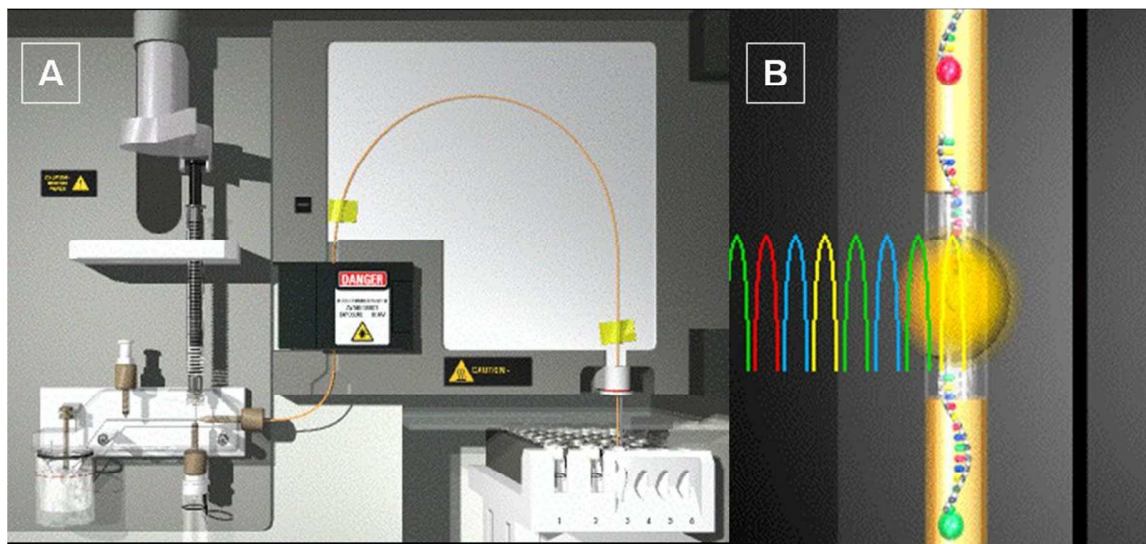


FIGURA 17. ESTIMULAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DOS NUCLEOTÍDIOS MARCADOS (ddNTPs).

Nota: A) Visão geral do seqüenciador automático ABI 3110; B) Estimulação da fluorescência por laser quando os fragmentos marcados atravessam a janela de detecção do capilar de corrida.

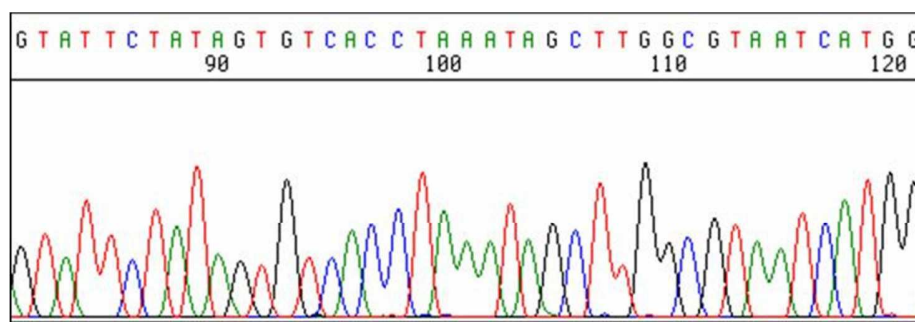


FIGURA 18. ELETROFEROGRAMA GERADO PELO SEQUENCIADOR

FONTE: O Autor (2010)

PCR SSP

Esta técnica baseia-se no princípio de que oligonucleotídeos iniciadores totalmente complementares são mais eficientemente usados para amplificar uma seqüência alvo pela Taq polimerase recombinante, do que oligonucleotídeos iniciadores mal pareados. Pares de oligonucleotídeos iniciadores são confeccionados para terem um pareamento perfeito com apenas um único alelo ou um grupo de alelos. Sob condições de PCR estritamente controladas, pares de oligonucleotídeos iniciadores perfeitamente pareados resultam na amplificação da seqüência alvo (resultado positivo), enquanto pares de oligonucleotídeos iniciadores mal-pareados não resultam em amplificação (resultado negativo). Logo, os iniciadores são sintetizados de duas formas: a forma “normal”, refratária ao DNA “mutante” (com polimorfismo de nucleotídeo único); e a forma “mutante”, refratária ao DNA com a seqüência “normal”. Para garantir que mesmo assim não haja hibridização, são colocadas bases adicionais não complementares na posição 3’ terminal do iniciador.

Os iniciadores com correspondência completa, durante o processo de PCR, hibridizam-se à seqüência alvo do DNA em estudo, amplificando esta seqüência e produzindo um resultado positivo. Contrariamente, os pares de iniciadores sem correspondência não se hibridizam ao DNA, fazendo com que não ocorra amplificação e portando, gerando um resultado negativo.

Após o processo de PCR, os fragmentos de DNA amplificado obtidos são separados por eletroforese em gel de agarose (2,5%) e visualizados por coloração em brometo de etídeo e exposição à luz ultravioleta. A interpretação dos resultados baseia-se na presença ou ausência de um fragmento de DNA amplificado específico (FIGURA 16). Devido ao fato de que a reação de PCR pode ser influenciada por vários fatores, tais como qualidade do DNA, presença de inibidores e erros humanos (na manipulação do DNA, na pipetagem...), adiciona-se à reação um par de iniciadores de controle interno, os quais amplificam uma região conservada de um gene (gene da β -globina humana), que está presente em todas amostras de DNA. Esta é uma prova utilizada para confirmar a integridade da reação de PCR, pois aparecerá a banda controle

(correspondente a essa região conservada do gene) no final das reações. Na presença de uma banda de tipagem positiva (amplificação específica de um alelo *HLA*), o produto dos iniciadores de controle poderá ser fraco ou ausente, devido às diferenças de concentração e de temperaturas de hibridização entre os iniciadores específicos e os de controle interno. Os fragmentos de DNA dos pares de iniciadores específicos são menores que os de controle interno, mas maiores do que a banda de iniciadores não incorporados. Como consequência, a reação positiva é vista no gel como um fragmento de DNA amplificado entre a banda de controle e a banda de iniciador não incorporado. Todos os procedimentos para o uso do "kit" foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

FIGURA 16. INTERPRETAÇÃO DAS BANDAS PARA TIPAGEM DO GENE *HLA-C*

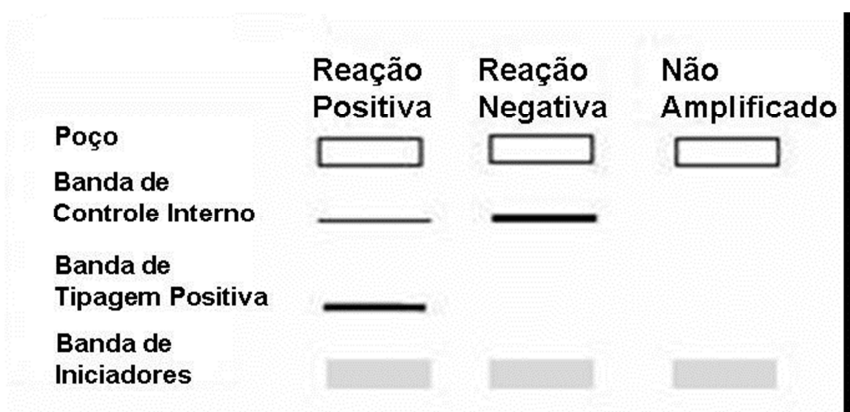


Figura 16. O par de iniciadores, responsáveis pelo controle interno, amplifica uma região conservada do gene da β -globina humana, presente em todas as amostras de DNA. Tal banda é utilizada para se confirmar a integridade da reação da PCR. A banda de controle interno e a de iniciador não incorporado atuam como marcadores de tamanho e deverão ser considerados como marcadores de tipagem positivo.

FIGURA 17- PADRÃO DE BANDAS PARA TIPAGEM DO GENE *HLA-C*

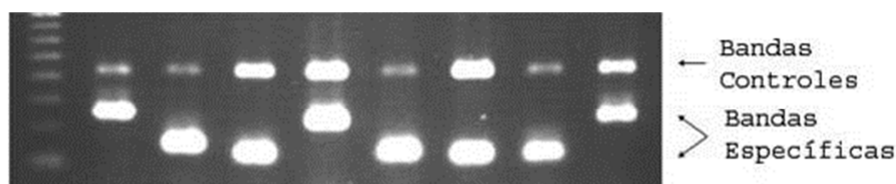


Figura 17. A interpretação do gel deve ser feita de acordo com a Figura 16.