

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

REGINALDO VIEIRA DE SENE

Análise fenotípica e funcional comparativa de diferentes genótipos de *KIR*, com ênfase em conteúdo gênico, *KIR3DL2* e *KIR3DL1* na presença e ausência dos ligantes *HLA-A*03/A*11* e *HLA-Bw4*

CURITIBA

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

REGINALDO VIEIRA DE SENE

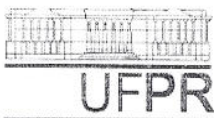
Análise fenotípica e funcional comparativa de diferentes genótipos de *KIR*, com ênfase em conteúdo gênico, *KIR3DL2* e *KIR3DL1* na presença e ausência dos ligantes *HLA-A*03/A*11* e *HLA-Bw4*

Tese entregue à banca avaliadora para obtenção do título de doutor, pelo Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Petzl-Erler

CURITIBA

2013



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **REGINALDO VIEIRA DE SENE**, para obtenção do título de Doutor em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "B".

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

Curitiba, 28 de junho de 2013

Doutora Karin Braun-Prado
Dep. Patologia Básica/UFPR – Membro Titular

Doutora Olga Meire Chaim
Dep. Biologia Celular e Molecular/UFPR – Membro Titular

Doutora Daniela Parada Pavoni
Instituto de Biologia Molecular do Paraná – Membro Titular

Doutora Angelica Beate Winter Boldt
Dep. Genética/UFPR – Membro Titular

Doutor Pablo Sandro Carvalho Santos
Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade – Membro Titular

Doutora Maria Luiza Petzl-Erler
Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto

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

Sene, Reginaldo Vieira

Análise fenotípica e funcional comparativa de diferentes genótipos de *KIR*, com ênfase em conteúdo gênico, *KIR3DL2* e *KIR3DL1* na presença e ausência dos ligantes *HLA-A*03/A*11* e *HLA-Bw4*.

Curitiba, 2013. 103p.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, UFPR.

1. *KIR*. 2. *HLA*. 3. *3DL2*. 4. Células NK. 5. Pênfigo vulgar.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minha irmã. Separados pela distância, mas sempre unidos pelo coração. Obrigado por todas as oportunidades, apoio e carinho ao longo de todos estes anos.

À Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Petzl-Erlar. Obrigado por fomentar a base, estrutura e sustento deste estudo, pelo apoio quando este foi necessário, pela amizade, por tudo que foi ensinado, pela responsabilidade, afincos e zelo oferecidos a mim. Guardarei tudo isto em meio às batidas do meu coração.

A Prof^a. Dr^a. Karin Braun Prado, pela grande colaboração, amizade e conselhos voltados para a melhoria deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Suely Giolo, do departamento de estatística, pela ajuda relacionada aos testes estatísticos.

Aos pacientes e controles que doaram sangue para este estudo.

Aos amigos do laboratório de Genética Molecular Humana: Gabriel, Márcia, Liana, Sara, Sheyla, Eduardo, Simone, Ticiano, Carol, Pedro, Andressa, Áurea, Tânia e Eleonora. A amizade e o convívio com todos vocês foi imprescindível!

Aos amigos e amigas curitibanos que tanto estimo, aos amigos do fórum (13 anos movidos por amizade, união e aquele maravilhoso anime!), Matheus, Danillo e Érica: foram anos de convívio que para sempre serão lembrados. Estarei sempre fortalecendo os elos que unem as nossas correntes da amizade.

Ao Rodrigo, por todos os momentos, paciência, amizade... pelas broncas também. Um brinde ao futuro.

Aos meus fiéis escudeiros caninos.

A CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Acima de tudo, este aglomerado de átomos chamado Reginaldo, será eternamente grato por poder partilhar esta época e viver estes momentos únicos com todas estas incríveis pessoas.

RESUMO

Receptores de células *natural killer* semelhantes à imunoglobulina (KIR) são expressos por células *natural killer* (NK) e subtipos de células T. Os genes *KIR* são altamente polimórficos e este complexo poligênico exhibe variação em número de genes ativadores e inibidores, o que regula a atividade de células NK. Moléculas *HLA* de classe I servem como ligantes para *KIR*. As interações dos *loci* de *KIR* e *HLA* são importantes para o reconhecimento de alvos pelas células NK. Vários estudos de associação indicam que estes *loci* estão envolvidos em doenças infecciosas, desordens autoimunes/inflamatórias, câncer e reprodução. Dados funcionais suportam o mecanismo baseado na ação de receptores inibidores e ativadores através de diferentes combinações de genótipos *KIR-HLA* em doenças. A doença autoimune pênfigo vulgar (PV) é uma desordem bolhosa que afeta a pele em múltiplas camadas, causada por autoanticorpos contra desmogleína 1 e 3, já foi previamente associada com *KIR*. Neste estudo nós sugerimos que indivíduos *KIR3DL2*001+* *KIR3DL1+* e baixa frequência de genes ativadores em seu genótipo, exibem uma maior inibição de citotoxicidade quando na presença dos ligantes *HLA-A*03/A*11* e *HLA-Bw4*. Resultados *in vitro* demonstraram que o cultivo de células NK de diferentes indivíduos com células T CD3 expressando *HLA-A*03/A*11* e *HLA-Bw4*, levou a uma diminuição de citotoxicidade. Isto foi observado em indivíduos saudáveis e pacientes de pênfigo. O bloqueio com anticorpo anti-KIR3DL2 mostrou um aumento da citotoxicidade, corroborando para o potencial efeito inibidor deste gene nesta situação. Além disso, nós verificamos uma maior frequência de células NK (subtipo CD56^{bright}) no sangue periférico de pacientes de PV quando comparado com indivíduos saudáveis. Estes dados em conjunto com a detecção de níveis aumentados de IL-6 e IFN- γ nos ensaios de cultivo, contribuem para o entendimento e o papel de células NK na patogênese de pênfigo.

Palavras chave: KIR, HLA, 3DL2, células NK, citotoxicidade, pênfigo vulgar

ABSTRACT

Killer cell Immunoglobulin-like receptors (KIR) are receptors expressed by *natural killer* (NK) and subsets of T cells. *KIR* genes are highly polymorphic and the *KIR* gene complex is polygenic with varying numbers of inhibitory and activating receptors, which regulates the activity of NK cells. HLA class I molecules serve as ligands for the KIR. Interactions between the independently segregating *KIR* and *HLA* loci are important for recognition of targets by NK cells. Several disease association studies indicate a role for interactions between these loci in infectious diseases, autoimmune/inflammatory disorders, cancer and reproduction. Emerging functional data supports a mechanism based on a continuum of inhibition to activation through various compound *KIR–HLA* genotypes in diseases. The autoimmune disease pemphigus vulgaris (PV) is a blistering disorder that affects the skin and multiple membranes, caused by antibodies to desmoglein 1 and 3 and had been associated with *KIR*. In this study, we suggest the role of the inhibitory effect of the combination of *KIR3DL2*001*, *KIR3DL1* and the low frequency of activating genes, when in the presence of the ligands *HLA-A*03/A*11* and *HLA-Bw4*. *In vitro* results have demonstrated that culture of NK cells from different individuals with CD3T cells expressing *HLA-A*03/A*11* and *HLA-Bw4* led to decreased cytotoxicity. This was observed in healthy donors and PV patients. Blocking with specific anti-*KIR3DL2* antibodies showed increase of cytotoxicity, confirming the inhibitory potential of *KIR3DL2*. Additionally, we verified an increased number of NK cells in PV patients' peripheral blood, specifically CD56^{bright} NK cell subtype, when compared to healthy donors. This put together with the detection of higher high levels of IL-6 and IFN- γ in the culture media from the assays, might contribute to the understanding of the role of NK cells in the pathology of pemphigus.

Keywords: KIR, HLA, 3DL2, NK cells, cytotoxicity, pemphigus vulgaris

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. SUBTIPOS DE CÉLULAS NK E SEUS RECEPTORES	06
FIGURA 2. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DOS GENES DE RECEPTORES DAS CÉLULAS NK PERTENCENTES AOS COMPLEXOS LRC E NKC	09
FIGURA 3. RECEPTORES DE NK	10
FIGURA 4. LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA E REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORGANIZAÇÃO DAS FAMÍLIAS GÊNICAS DO LRC	12
FIGURA 5. ESTRUTURA DAS MOLÉCULAS KIR	13
FIGURA 6. LISTA DE HAPLÓTIPOS KIR	15
FIGURA 7. MECANISMO DE AÇÃO DAS CÉLULAS NK	18

LISTA DE ABREVIATURAS

CBA - *cytometric bead array*
CTL - linfócitos T citotóxicos
DMSO - dimetilsulfóxido
EDTA - ácido etilenodiamino tetracético
GM-CSF - *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
GvHD - doença do enxerto contra hospedeiro
HLA - *human leukocyte antigen*
IFN- γ - interferon gama
IKDC - *IFN-producing killer dendritic cell*
ITAM - motivo ativador baseado em tirosina
ITIM - motivo inibidor baseado em tirosina
KIR - *killer cell immunoglobulin-like receptors*
LDH - lactato desidrogenase
LPS – lipopolisacarídeo
LRC - *leukocyte receptors complex*
Met - metionina
MIP - *macrophage Inflammatory proteins*
NK - *natural killer*
NKC - natural killer complex
NO - óxido nítrico
PBS – solução salina fosfatada
PV - pênis vulgar
RANTES - *regulated on activation normal T cell expressed and secreted*
RPM – rotações por minuto
SNP - single nucleotide polymorphism
TCR - receptores de células T
TGF- β - transforming growth factor beta
Thr - treonina
TLR - *toll-like receptors*
TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. AS CÉLULAS NATURAL KILLER.....	4
2.2. DIFERENTES SUBTIPOS DE CÉLULAS NK.....	4
2.3. PROPRIEDADES FENOTÍPICAS DOS SUBTIPOS DE CÉLULAS NK.....	5
2.4. OS RECEPTORES DAS CÉLULAS NK	8
2.5. RECEPTORES SEMELHANTES ÀS IMUNOGLOBULINAS	10
2.6. DIVERSIDADE GENÉTICA, HAPLOTÍPICA E ALÉLICA DE <i>KIR</i>	14
2.7. <i>KIR3DL2</i>	16
2.8. AÇÃO CITOTÓXICA DAS CÉLULAS NK	17
2.9. FUNÇÕES DAS CÉLULAS NK NA RESPOSTA INATA.....	19
2.10. OUTRAS FUNÇÕES DAS CÉLULAS NK.....	21
3. AS CÉLULAS NK E AUTOIMUNIDADE	22
4. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	24
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSSÃO GERAL.....	59
7. CONCLUSÕES.....	66
8. REFERÊNCIAS	67
9. APÊNDICE	75
9.1 DETALHAMENTO DE MATERIAS E MÉTODOS.....	75
9.2 AMOSTRAS POPULACIONAIS E OBTENÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO	75
9.3 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES	75
9.4 ISOLAMENTO DE CÉLULAS NATURAL KILLER E LINFÓCITOS CD3 ⁺ COM ESFERAS MAGNÉTICAS	76
9.5 VERIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	77

9.6 CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES	77
9.7 CULTIVO DAS CÉLULAS.....	78
9.8 COCULTURA DE CÉLULAS NK E LINFÓCITOS PERIFÉRICOS	78
9.9 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE DE DIFERENTES GENÓTIPOS KIR ANTE DIFERENTES GENÓTIPOS HLA.....	79
9.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS NOS SOBRENADANTES DE CULTURA.....	79
9.11 GENÓTIPOS DOS INDIVÍDUOS INCLUÍDOS NA AMOSTRA.....	81
9.12 GENÓTIPOS DOS INDIVÍDUOS INCLUÍDOS NO POOL DE HLA	82
9.13 VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	83
9.14 EXEMPLO DE VERIFICAÇÃO DA PUREZA DE CÉLULAS NK E T	84
9.15 PADRONIZAÇÃO E CINÉTICA DO CULTIVO CELULAR.....	85
9.16 CORREÇÃO DO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	86
ANEXO I	87
ANEXO II	89

1. INTRODUÇÃO

As células NK (*natural killer*) são uma importante subpopulação de linfócitos que atuam na resposta imunológica que mediam vários processos inflamatórios e celulares. A ação das células NK se dá através de receptores de membrana, dentre os quais se destacam os receptores KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) (JANEWAY *et al.*, 2002). Estes receptores são codificados por genes localizados na região cromossômica 19q13.4 em humanos (DUPONT, SELVAKUMAR e STEFFENS, 1997; SELVAKUMAR *et al.*, 1997).

Os receptores KIR são codificados por uma família de genes polimórficos, apresentando receptores tanto ativadores quanto inibidores. Os ligantes dos receptores ativadores não estão bem conhecidos. Para alguns deles, supõe-se que sejam os mesmos dos inibidores, devido à semelhança da porção extracelular. Alguns dos receptores inibidores reconhecem moléculas HLA de classe I, porém nem todos possuem seus ligantes conhecidos. (YOKOYAMA *et al.*, 1998; COLUCCI *et al.*, 2002). Dois grupos de haplótipos foram descritos, A e B. O haplogrupo A normalmente apresenta sete genes *KIR* inibidores (*KIR3DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4* e *KIR3DL2*) sendo *KIR2DS4* o único gene de calda curta que codifica um produto ativador. O haplogrupo B compreende haplótipos onde há presença de um ou mais produtos gênicos ativadores de cauda curta (*2DS1*, *2DS2*, *2DS3* e *2DS5*), além do gene inibidor *2DL2*, porém, em diferentes combinações (UHRBERG *et al.*, 1997; UHRBERG *et al.*, 2002).

Tanto a presença quanto a ausência de certos genes *KIR*, assim como diferentes combinações de genes *KIR* e *HLA*, já foram associadas a várias doenças (KHAKOO e CARRINGTON, 2006; JIAO *et al.*, 2008; LEVINSON *et al.*, 2008, AUGUSTO *et al.*, 2012). Além disso, existem evidências de coevolução de genes *KIR* e ligantes HLA (SINGLE *et al.*, 2007). Devido ao elevado grau de polimorfismo tanto dos genes *KIR* quanto dos ligantes HLA e a segregação independente destes genes, permite considerar que certas combinações *KIR* e *HLA* representam um fator de risco relevante para a patogênese de algumas doenças. Vários estudos correlacionaram a incidência e progressão de diversas

doenças com a presença e expressão de alguns genes *KIR* em particular, entre os quais doenças infecciosas, autoimunes e doenças relacionadas à reprodução, ao câncer além disso, desempenham um papel importante em pacientes transplantados com medula óssea (PARHAM, 2005; KELLEY e TROWSDALE, 2005).

Neste trabalho será descrita a possível alteração da resposta citotóxica de células NK que expressam diferentes formas alélicas do gene *KIR3DL2*, quando expostas a diferentes combinações de ligantes *HLA*, tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes de pênfigo vulgar (PV). O pênfigo vulgar é uma doença autoimune de pele, que é caracterizada pela produção de autoanticorpos contra desmogleína-3 (DSG3). Esta enfermidade é caracterizada pela formação de bolhas na pele, resultado da reação imune contra a desmogleína, que promove adesão celular entre queratinócitos. Por se tratar de uma doença autoimune com complexo quadro inflamatório, também será mensurada a liberação de mediadores inflamatórios no meio de cultivo desta resposta citotóxica de células NK de indivíduos saudáveis e pacientes de PV. Além disso, serão verificadas diferenças celulares e fenotípicas de marcadores da superfície das células NK destes indivíduos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. AS CÉLULAS NATURAL KILLER

A primeira linha de defesa contra infecções se dá pela resposta inata. A reação inflamatória resultante da invasão do organismo por algum patógeno recruta moléculas e células efetoras do sistema imune que combatem a propagação do patógeno. Dentre as células participantes da resposta inata estão as células *natural killer* (NK). Este tipo celular constitui uma subpopulação de linfócitos que atua no combate contra células infectadas ou transformadas malignamente (BAXTER e SMYTH, 2002). As células NK representam de 10% a 15% dos linfócitos circulantes e também são vistos em certos tecidos, como placenta, fígado e cavidade peritoneal (BIRON *et al.*, 1999; BIRON e BROSSAY, 2001).

Historicamente, a primeira descrição de diferentes subtipos de células NK foi dado por Nagler *et al.* em 1989, e seus dados foram amplamente confirmados por outros grupos (POLI *et al.*, 2008). Fenotipicamente, as células NK são CD3⁻, CD2⁺, CD16⁺, CD56⁺, CD14⁻ e CD19⁻. Elas podem ser divididas entre dois subtipos baseado na expressão de CD56 (também conhecido por NCAM1) e presença ou ausência de CD16. Estes dois marcadores são geralmente expressos reciprocamente nestas células. Os dois subtipos, CD56^{bright}/CD16⁻ e CD56^{dim}/CD16⁺ representam cerca de 10% e 90% das células NK presentes em sangue periférico, respectivamente (COOPER *et al.*, 2011). Usualmente as células CD56^{bright} foram comparadas com células CD56^{dim}/CD16^{bright} em termos de fenótipo e funções, e mais tarde também foram levadas em conta suas diferentes propriedades de ação. As células dos dois subtipos diferem em seu potencial proliferativo, características funcionais e respostas a diferentes citocinas (POLI *et al.*, 2008).

2.2. DIFERENTES SUBTIPOS DE CÉLULAS NK

As células CD56^{bright} são especializadas em produzir citocinas quando ativadas, e possuem pouco poder citotóxico. Elas expressam poucos receptores KIR e preferencialmente migram para os órgãos linfóides secundários. Células NK do subtipo

CD56^{dim} expressam receptores KIR e são altamente citotóxicas (FARAG, et al., 2002). Estas células NK migram para tecidos inflamados em resposta a estímulos quimiotáticos (HANNA *et al.*, 2005).

A ação citotóxica das células CD56^{dim} é significativamente maior que a resposta de células CD56^{bright}, e elas contêm uma maior quantidade de grânulos de perforina e granzimas. O alto nível de expressão de CD16 faz com que estas células sejam eficientes mediadoras de citotoxicidade celular dependente de anticorpos, ao passo que CD56^{bright}/CD16^{dim} possuem uma fraca resposta de citotoxicidade dependente de anticorpos (FIGURA 1). Na presença de IL-2 ou IL-12 a atividade citotóxica dos subtipos de células NK aumenta consideravelmente (COOPER *et al.*, 2011).

Em relação à produção de citocinas, a situação se inverte. As células CD56^{bright} são as mais eficientes. Os tipos de citocinas mais comumente produzidos por estas células NK são IFN- γ TNF- α , GM-CSF, IL-10 e IL-13, dependendo de condições específicas para que ocorra secreção de determinada citocina (FEHNIGHER *et al.*, 1999).

2.3. PROPRIEDADES FENOTÍPICAS DOS SUBTIPOS DE CÉLULAS NK

O receptor CD56, um dos principais marcadores de NK, é uma isoforma da molécula adesão neural humana, que possui função desconhecida nas células NK, porém estudos anteriores sugerem que esta molécula pode mediar interações entre células NK e células alvo (SUZUKI *et al.* 1991). Sendo assim, não existe relação funcional direta entre alta ou baixa expressão de CD56. No entanto, outros marcadores de superfície celular conferem características fenotípicas e funcionais para os subtipos de NK CD56^{bright} e CD56^{dim}, como pode ser observado na figura 1. As propriedades dos dois subtipos celulares estão intimamente relacionadas com a configuração de receptores que estas apresentam em sua superfície (COOPER *et al.*, 2011).

Os receptores das células NK de humanos podem existir em suas formas ativadoras e inibidoras, e estão classificados dentro de três grandes famílias, que serão descritas mais abaixo. Sabe-se que células CD56^{bright} possuem baixa ou nenhuma expressão de KIR e ILT-

2 (um receptor inibidor), mas alta expressão de CD94-NKG2A (receptores inibidores), enquanto as células CD56^{dim} apresentam a configuração oposta. Consequentemente, a expressão diferencial destes receptores inibidores provavelmente regula as propriedades citotóxicas destas células. Ambos os subtipos expressam o receptor NKG2D, que reconhece moléculas MICA, MICB e UL-16 (ANDRE *et al.* 2000).

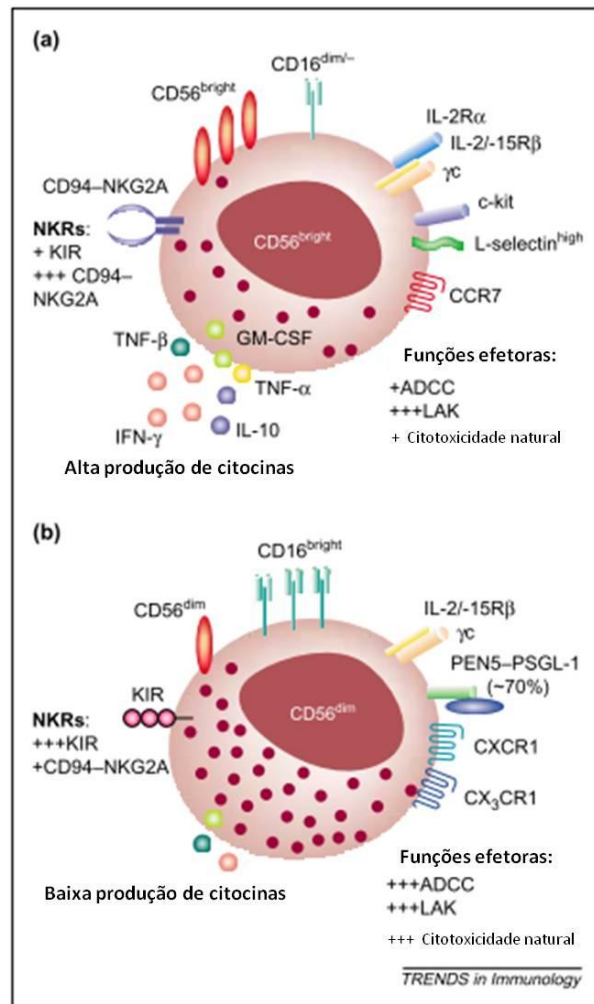


FIGURA 1. Subtipos de células NK e seus receptores. Células NK CD56^{bright} produz altos níveis de citocinas e possuem baixa expressão de CD16, exibindo baixa citotoxicidade natural. Exibe alto nível de expressão de receptores inibidores semelhantes à lectina C, CD94 e NKG2A, mas possui pouca expressão de receptores da superfamília das imunoglobulinas, KIR; além de secretar um grande número de citocinas (a). Já as células CD56^{dim} produzem baixo nível de citocinas, porém são potentes em sua atividade citotóxica, exibindo uma morfologia mais granular. Elas possuem alto nível de expressão de receptores KIR. Fonte: Cooper *et al.*, 2001.

	CD56 ^{bright}	CD56 ^{dim}
CD56	++ ^b	(+) ^c
CD16	-/+ ^d	++
Receptores de NK		
KIR	-/+	++
CD94	++	-/+
NKG2A	+ ^e	-/+
ILT-2	- ^f	+
Receptores de citocinas e quimiocinas		
IL-2R $\alpha\beta\gamma$	+	-
IL-2R $\beta\gamma$	+	+
c-kit	+	-
IL-1RAcP	+	+
IL-1RI	+	-/+
IL-18R	+ ^g	-/+
CCR7	++	-
CXCR3	+	-/+
CXCR1	-	++
CX ₃ CR1	-	++
Moléculas de adesão		
CD2	++	+
L-selectin (CD62L)	++	-/+
PEN5-PSGL-1	-	+
LFA-1	(+)	++
CD44	++	+
CD49e	++	+

TABELA 1. Receptores diferencialmente expressos em subtipos de células NK. ++ indica alta densidade de expressão, (+) baixa expressão, -/+ indica expressão variável, + indica que a maioria das células expressa esta molécula e por fim, (-) indica ausência de expressão. Fonte: Cooper et al., 2001.

Apesar de pouco se saber sobre a expressão de outros receptores ativadores (diferentes de KIR), foi sugerido que não existe diferença de expressão entre os dois subtipos com relação a estes receptores, pois não foi verificada correlação entre os níveis de CD16 e receptores ativadores (COOPER *et al.* 2011).

O CD16 é um receptor que possui funções tais como ligar alvos opsonizados com anticorpos e transmitir sinais através de subunidades que contém motivos de tirosina para citotoxicidade celular dependente de anticorpo. CD16, também chamado de FCGR3A, é um

receptor de baixa afinidade para o fragmento Fc de IgG presente não apenas em células NK mas também em monócitos, macrófagos ativados e um subconjunto de linfócitos T. A maioria das células CD56^{bright} (50~70%) não possui esse receptor e as demais possuem baixa densidade do mesmo. Já entre as células CD56^{dim}, mais de 95% são CD16^{bright}. Diferenças no nível de expressão de CD16 tem consequências funcionais para a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (LANIER *et al.* 1986).

Todas as células NK apresentam um receptor funcional de interleucina 2 (IL-2R $\beta\gamma$), com afinidade intermediária por IL-2. Nagler *et al.* 1990, demonstraram que as células NK CD56^{bright} são as únicas dentre os linfócitos, com expressão constitutiva do receptor de alta afinidade por IL-2. Este subtipo possui uma alta atividade proliferativa quando na presença de pequenas doses de IL-2 e pode ser expandida *in vivo* e *in vitro* na resposta de concentrações picomolares de IL-2 (FARAG, *et al.*, 2002).

A relação entre os dois subtipos de células NK ainda está mal definida. Foi proposto que a diferenciação fenotípica e das propriedades funcionais dos dois tipos define as células CD56^{bright} como precursores imaturos e CD56^{dim} como o subtipo final diferenciado. A maturação seria definida pela perda de receptores CD56, e aquisição de CD16 e *KIR*, desse modo, as células CD56^{bright}/CD16^{dim} seriam um estágio intermediário entre o subtipo mais imaturo (CD56^{bright}/CD16) e o subtipo mais maduro (CD56^{dim}/CD16⁺) (NAGLER, *et al.*, 1989).

2.4. OS RECEPTORES DAS CÉLULAS NK

Os receptores das células NK existem em suas formas inibidoras e ativadoras, sendo classificados dentro de duas superfamílias de moléculas em humanos. Os receptores semelhantes a imunoglobulina (*killer-cell Ig-like receptors* – KIR), pertencem, como a denominação indica, à superfamília das imunoglobulinas. Reconhecem primariamente HLA-A, -B e -C; os receptores de semelhantes a lectina (*lectin-like receptors*) pertencem à superfamília de lecitinas do tipo C e inclui os receptores CD94 e NKG2, que reconhecem HLA-E. Esses dois conjuntos estão localizados, respectivamente, no LRC (*leukocyte*

receptors complex) e no NKC (*natural killer complex*) (Trowsdale et al. 2001), em dois cromossomos distintos (FIGURA 2). No cromossomo 12 na região 12p13.1 está localizado o Complexo *Natural Killer* (NKC) de aproximadamente 2Mb, localizado por BROWN, et al., 2001, que inclui os genes CD94 e NKG2 que codificam os genes semelhantes às lectinas.

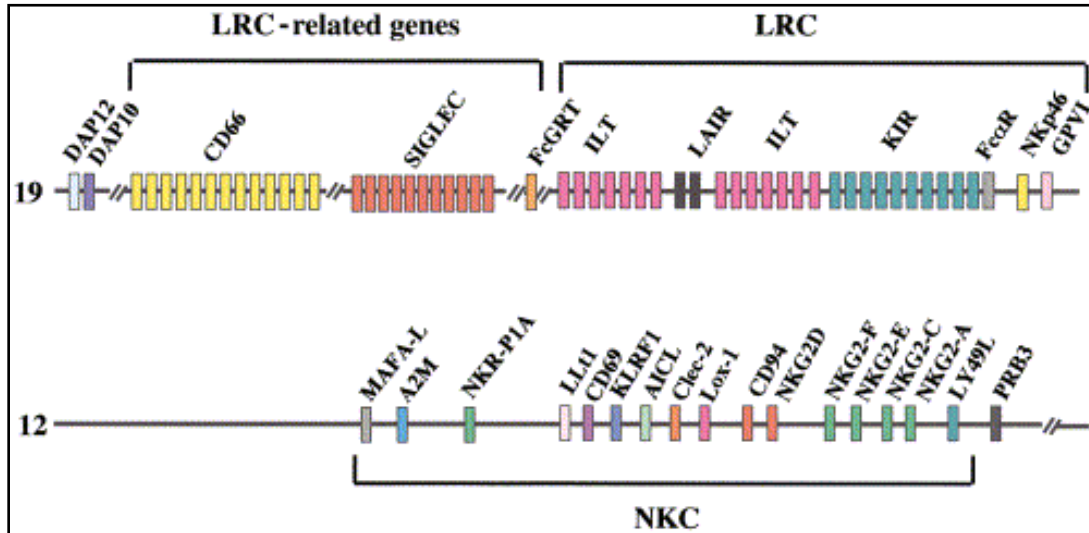


FIGURA 2. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DOS GENES DE RECEPTORES DAS CÉLULAS NK PERTENCENTES AOS COMPLEXOS LRC E NKC. No cromossomo 19 estão localizados os LRC (*leucocyte receptor complex*) e *LRC-related genes* (genes relacionados ao LRC). No cromossomo 12 se localiza o NKC (*natural killer complex*). Fonte: TROWNSDALE, 2001.

No cromossomo 19, na região 19q13.4, está o complexo de receptores leucocitários (LRC) que compreende mais de 25 genes oriundos de seguidas duplicações (WILSON et al., 2000), pertencentes à superfamília das imunoglobulinas – nesta região está localizado o complexo KIR.

A detecção dos alvos celulares pelas células NK é mediada pelos receptores que podem contribuir com sinais inibidores e/ou ativadores. A função efetora é controlada por sequências em caudas citoplasmáticas e na porção transmembrânica (VELY e VIVIER, 1997). Durante o processo de ativação ou inibição das células NK, ambos os tipos de receptores entram em ação. As células NK também possuem receptores que reconhecem citocinas, receptores quimiotáticos e de adesão (FIGURA 3). Na situação em que existe um

predomínio dos sinais ativadores, a células NK promove sua ação citotóxica, porém, quando ocorre o contrário, e o balanço de sinais indica um predomínio dos sinais inibidores, a células NK não realiza sua atividade (VIVIER et al., 2011).

Os receptores inibidores se ligam às moléculas HLA de classe I, enquanto os receptores ativadores se ligam às moléculas alteradas e produtos microbianos expressos por diferentes células, principalmente pelas células hematopoiéticas. Porém, alguns receptores ativadores também reconhecem moléculas HLA de classe I ou moléculas homólogas a essas. Cada célula NK expressa, aleatoriamente, um conjunto diferente de receptores ativadores e inibidores – em se tratando de KIR. Dessa forma, nem todas as células NK do organismo apresentam os mesmos receptores em sua membrana, podendo cada clone ser mais ou menos reativo a determinados patógenos ou células neoplásicas. (PARHAM, 2005).

2.5. RECEPTORES SEMELHANTES ÀS IMUNOGLOBULINAS

Atualmente foram descritos 14 genes *KIR* e dois pseudogenes (FIGURA 4), tendo sido descritos pela primeira vez por MORETTA, *et al.* (1993). A região onde está localizado o agrupamento de genes *KIR*, possui aproximadamente 1Mb. Outros genes tais como *CD66*, *FCGRT*, *DAPK*, *SIGLEC12*, *LAIR1*, *FCGR2A* e *NCR1* (FIGURA 2) também estão localizados nesta região, que apresenta alta densidade gênica e alta velocidade de evolução (KHAKOO *et al.*, 2000).

Existem três tipos de genes *KIR*, que variam de acordo com suas estruturas. Alguns genes do tipo *KIR2D* apresentam dois domínios extracelulares do tipo D1 e D2; outros genes do tipo *KIR2D* também apresentam dois domínios extracelulares, porém tais domínios são D0 e D2; por fim, existem os genes do tipo *KIR3D*, os quais apresentam três domínios extracelulares, D0, D1 e D2. Além disso, como regra geral, os genes *KIR* variam em número de éxons e em tamanho, podendo apresentar de 4 a 9 éxons e ter uma extensão de 4 a 16Kb (PARHAM, 2002). Sendo assim, a nomenclatura de *KIR* se dá pelo número de domínios extracelulares semelhantes à imunoglobulina (podendo ser em número de dois ou três) e no tamanho da cauda citoplasmática, sendo L para caudas longas (*long*) e S para

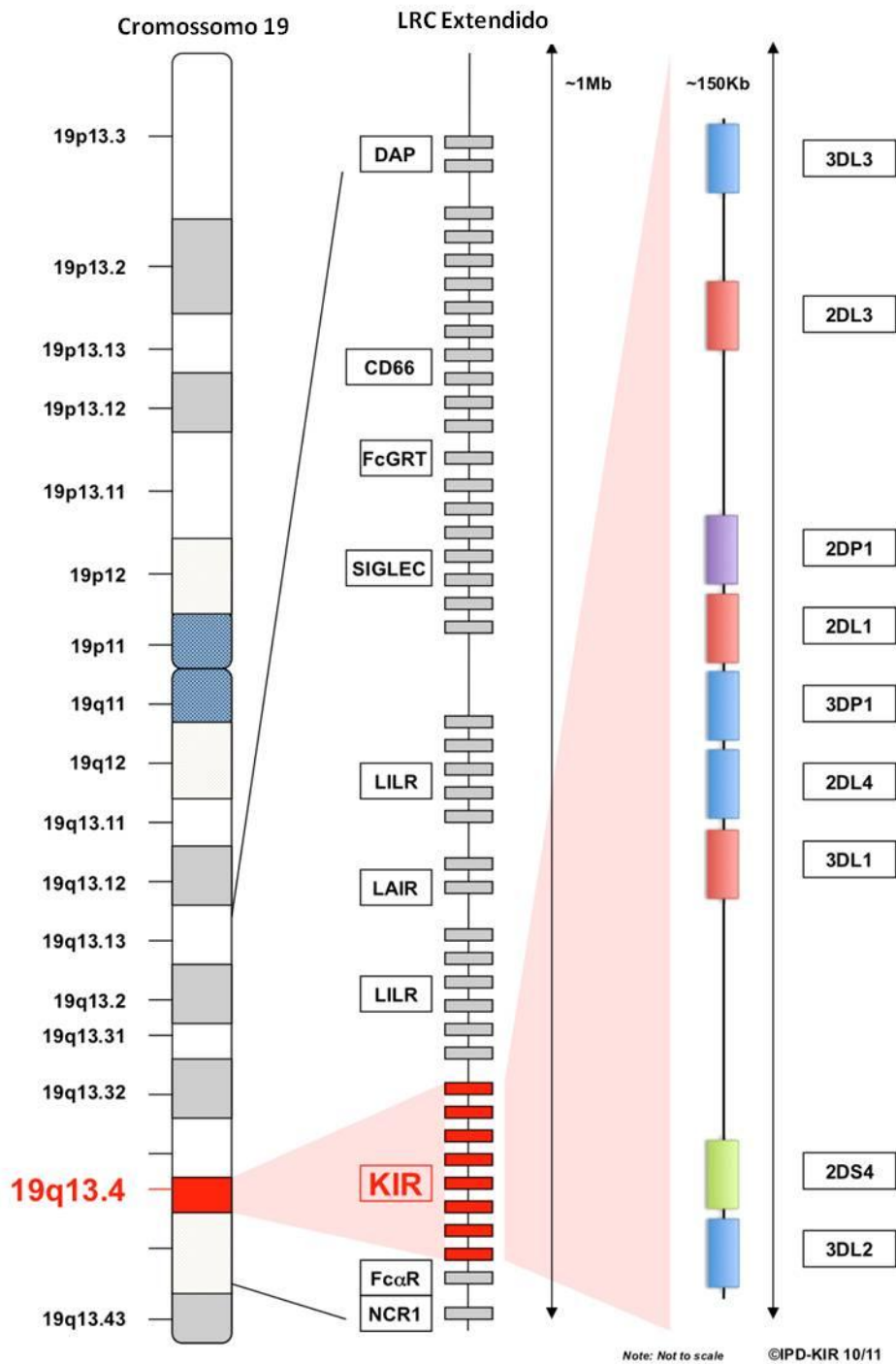


Figura 4. Localização cromossômica e representação esquemática da organização das famílias gênicas do LRC. Fonte: IPD (ROBINSON *et al.*2010).

Importante ressaltar que a expressão de KIR se dá de forma desigual nas células NK. Em estudos anteriores foi verificado que o repertório de receptores KIR é gerado por aquisições randômicas e sequenciais de genes, de maneira independente da presença ou ausência de seu ligante, e possivelmente determinada por probabilidades determinadas geneticamente (ANDERSON *et al.*, 2009). Este fato contribui ainda mais para a diversidade de receptores presentes na superfície de células NK do mesmo indivíduo. Inclusive, de acordo com a variação de moléculas em sua superfície as células NK podem estar presentes em diferentes tecidos ou apresentarem uma maior ou menor atividade contra patógenos.

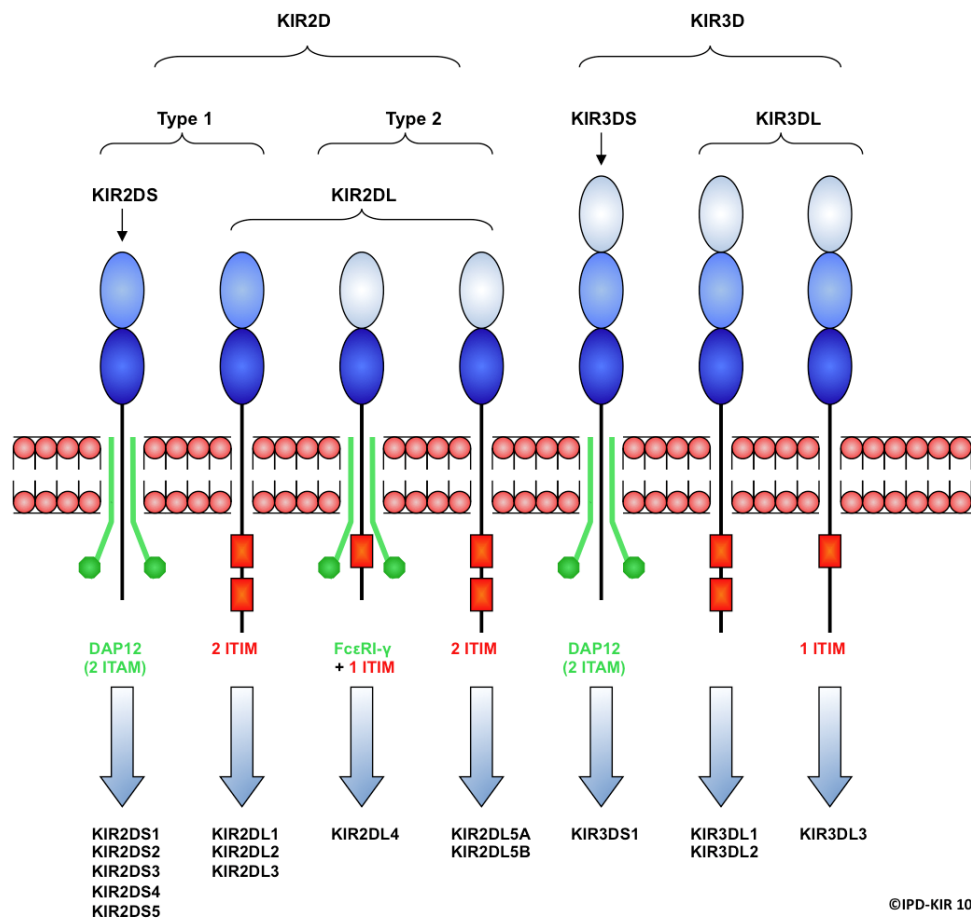


Figura 5. Estrutura das moléculas KIR. Fonte: IPD (ROBINSON *et al.* 2010)

2.6. DIVERSIDADE GENÉTICA, HAPLOTÍPICA E ALÉLICA DE *KIR*

Os genes *KIR* são extremamente polimórficos. Existem diferentes níveis de diversidade: diversidade haplotípica, polimorfismo de presença e ausência de genes e polimorfismo alélico.

Os haplótipos *KIR* são flanqueados pelo gene *KIR3DL3* na sua porção terminal centromérica e por *KIR3DL2* na região telomérica; ao centro, encontram-se *KIR3DP1* e *KIR2DL4*. Esses quatro são chamados de genes moldura e estão presentes em virtualmente todos os haplótipos (VILCHES e PARHAM, 2002; WILSON *et al.*, 2000). Os haplótipos dos genes *KIR* foram separados em dois haplogrupos, A e B. O haplogrupo A é formado majoritariamente por um único tipo de haplótipo que normalmente não varia em relação ao conteúdo gênico, sendo constituído por sete genes, dos quais apenas um é ativador de cauda curta (*KIR2DS4*) e também apresenta o gene *KIR2DL4* que é um gene moldura que, como dito anteriormente, fornece sinais ativadores e inibidores. O haplogrupo B compreende vários haplótipos que diferem quanto ao conteúdo gênico, podendo variar de sete a onze genes, entre os quais *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3* e *KIR2DS4*. Apesar da maior quantidade de haplótipos do tipo B, o haplogrupo A é o mais comum na maioria das populações humanas (UHRBERG *et al.*, 1997; UHRBERG *et al.*, 2002).

O fator mais relevante na caracterização das diferenças dos dois haplogrupos é o número de genes que codificam moléculas ativadoras, que é maior em haplótipos do grupo B, pois isto leva a consequências funcionais no reconhecimento por células NK. Alguns dos haplotipos mais frequentes estão indicados na FIGURA 6. Já foram descritos mais de 430 perfis distintos relacionados a presença e ausência dos genes *KIR* (GONZALEZ-GALARZA *et al.*, 2001), resultantes das combinações genotípicas dos dois haplótipos nos indivíduos.

Existem haplótipos que possuem duas ou mais cópias do mesmo gene, assim como rearranjo na sequência dos locos. Isto se deve, provavelmente, a processos de expansão de contração desta região, com ocorrência de permuta desigual (GÓMEZ-LOZANO *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2003).

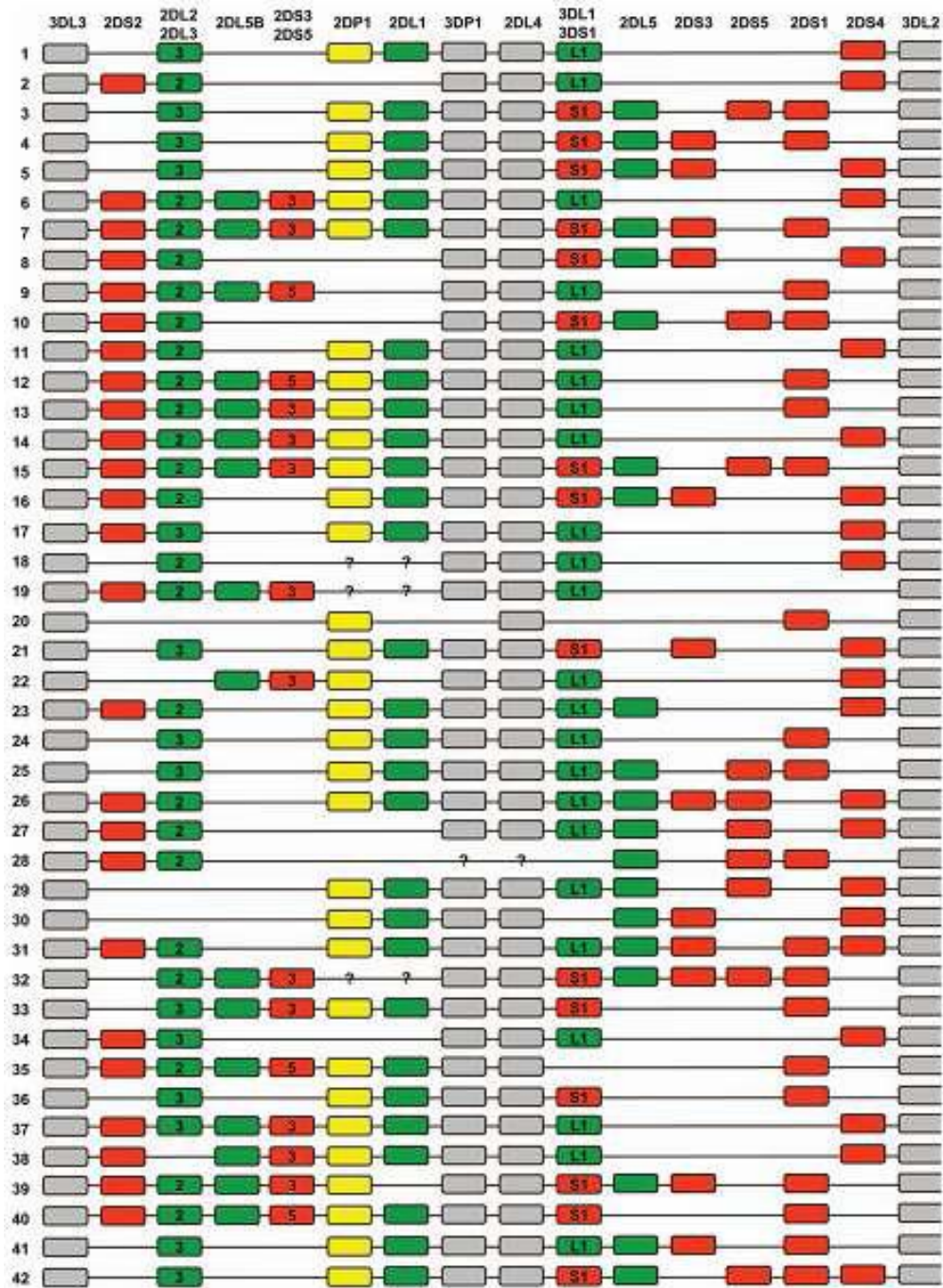


Figura 6. Lista de haplótipos KIR. O primeiro haplótipo representa o haplogrupo A, que apresenta pouca variação em relação ao conteúdo gênico, enquanto os demais pertencem ao haplogrupo B. Fonte: KHAKOO e CARRINGTON, 2006.

Outro fator que contribui para a diversidade dos genes *KIR* é o alto polimorfismo alélico. Já foram descritos mais de 600 alelos, sendo que os genes *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR2DL1* e *KIR2DL4* são os mais polimórficos (ROBINSON, J. *et al.* 2010).

2.7. KIR3DL2

O gene que codifica o receptor 3DL2 está presente em todos os haplótipos de *KIR*, sendo referido como um dos genes de moldura. A molécula possui 70kDa, com três domínios extracelulares, cauda citoplasmática longa e dois motivos inibidores baseados em tirosina. Este é o gene *KIR* mais longo, com 15Kb, incluindo nove exons (VILCHES e PARHAM, 2002), se configurando como o segundo gene mais polimórfico do complexo (ROBINSON *et al.*, 2010).

Estudos apontam que os ligantes de 3DL2 são as moléculas HLA-A*03 e HLA-A*11 (HANSASUTA *et al.*, 2004). O ligante HLA-A*11 também é reconhecido por outro receptor, o KIR2DS4, que também liga *HLA-C*. Existe um compartilhamento de um motivo de prolina-valina na posição 71-72 dos produtos dos genes *KIR3DL2* e *KIR2DS4*, que possivelmente foi introduzido neste último por conversão gênica antes da separação entre linhagens de humanos e chimpanzés. Foi proposto que este evento tenha levado a capacidade de reconhecimento de HLA-A*11 por 2DS4 (GRAEF *et al.*, 2009).

Mais recentemente, na investigação da doença espongiloartrite, foi demonstrado que HLA-B*27 também é um ligante de KIR3DL2, sendo esta molécula MHC de classe I fortemente associada com a doença. Inicialmente, HLA-B*27 era considerado ligante apenas de KIR3DL1, porém após estudos com o líquido sinovial de pacientes acometidos de espongiloartrite, observou-se que existe uma maior concentração de células NK e CD4 expressando KIR3DL2, o que remete a uma maior liberação de IL-17 por células CD4 em pacientes que em controles. Logo, pelo fato da ligação de KIR3DL2 e seus ligantes contribuírem para a inibição de citotoxicidade, foi sugerido que estas interações promovem a sobrevivência de leucócitos próinflamatórios em pacientes de espongiloartrite (WONG-BAEZA *et al.*, 2013).

A diversidade alélica do gene *KIR3DL2* já foi associada à susceptibilidade a pré-eclampsia (WANG *et al.*, 2011). A expressão de *3DL2* é utilizada no diagnóstico diferencial entre a síndrome de Sézary e outras doenças eritrodérmicas benignas, doenças que dificilmente são diferenciadas devido a pouca especificidade de resultados histológicos. Os transcritos de *CD158/3DL2* em biópsias de pele são marcadores únicos para diagnóstico da síndrome de Sézary (ORTONNE *et al.*, 2008). O domínio D0 deste receptor reconhece oligodeoxinucleotídeos CpG de origem microbiana, enviando-os através de endossomos até os receptores TLR (*toll-like receptors*) (SIVORI *et al.*, 2010). A diversidade alélica de *3DL2* foi associada com pêfigo foliáceo, e é sugerido que *3DL2*001* seja um alelo mais inibidor neste contexto (AUGUSTO *et al.*, 2013 – artigo em preparação)

Apesar da importância funcional e do polimorfismo alélico desse receptor, nenhum trabalho foi publicado até o momento sobre as implicações funcionais do polimorfismo alélico de *3DL2* isoladamente e em diferentes combinações com os seus ligantes HLA-A*03, HLA-A*11 ou mesmo HLA-B*27 através de análises *in vitro*, sendo este o foco deste trabalho.

2.8. AÇÃO CITOTÓXICA DAS CÉLULAS NK

As moléculas HLA de classe I clássicas (HLA-A, -B e -C) são expressas na superfície da maioria das células e são reconhecidas por pelo menos dois tipos celulares distintos: linfócitos T citotóxicos (CTL) e as células NK. Durante uma infecção viral, as moléculas de HLA classe I apresentam peptídeos virais aos CTL CD8+, os quais interagem com os peptídeos ligados às moléculas de classe I através de seus receptores específicos conhecidos por TCR (*T cell receptors*). Na presença de sinais coestimuladores, é desencadeada uma série de sinais que resultam na ativação dos CTLs, que exterminarão as células infectadas (ZINKERNAGEL e DOHERTY, 1974). Já as células NK possuem os já mencionados receptores ativadores e inibidores que, em conjunto, modulam sua ação exterminadora.

Quando moléculas HLA de classe I se ligam aos seus receptores inibidores específicos nas células NK, são gerados sinais inibidores que neutralizam os sinais

ativadores das células NK, garantindo dessa forma, a sobrevivência das células normais do organismo. Portanto, a expressão de moléculas HLA garante a identificação das células saudáveis e a inibição do ataque por NK. Porém, muitas infecções virais e tumores regulam negativamente a expressão de moléculas HLA. A diminuição ou ausência de expressão das moléculas HLA impedem a geração de sinais inibidores para as células NK, que então destruirão as células infectadas ou neoplásicas quando ocorrerem interações receptor-ligante ativadoras. Mas também, na ausência de sinal ativador não ocorre lise, mesmo que não haja sinal inibidor (BIRON et al., 1999). Dessa forma, os linfócitos T citotóxicos e as células NK são dois importantíssimos efetores das respostas a infecções e anormalidades.

Esse modelo de ação das células NK é denominado de “*missing-self*” (falta do próprio, em inglês FIGURA 7), pois tais células agem quando não reconhecem as moléculas que conferem a identidade da célula alvo. Diferentemente, os linfócitos T geralmente agem pelo reconhecimento de moléculas alteradas (*altered-self*). Conseqüentemente, todas as células NK possuem pelo menos um receptor inibidor para o reconhecimento das células do próprio organismo (LJUNGGREN et al., 1991; VALIANTE e PARHAM, 1997).

Função efetora das células NK

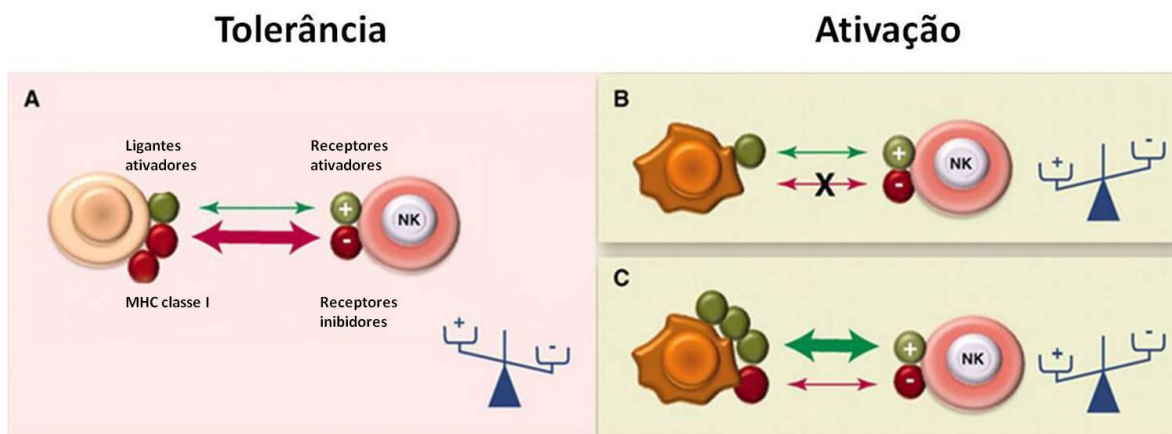


Figura 7. Mecanismo de ação das células NK. (A) Quando sinais inibidores são preponderantes sobre os sinais ativadores, a célula não é ativada, levando a tolerância. (B) Na ausência de sinais inibidores, ocorre a ativação pelos sinais ativadores que levam ao ataque pela célula NK. (C) Da mesma forma, se o conjunto de sinais ativadores for preponderante aos sinais inibidores, a célula NK será ativada. Fonte: Vivier et al., 2011.

2.9. FUNÇÕES DAS CÉLULAS NK NA RESPOSTA INATA

Apesar das células NK terem sido tradicionalmente conhecidas por sua habilidade de eliminar certos tumores e células infectadas por vírus, elas também participam de outros importantes eventos. Assim como neutrófilos, as células NK podem eliminar bactérias secretando α -defensinas: peptídeos antimicrobianos que podem desestabilizar a parede celular bacteriana (IANNELLO, et al., 2008).

Elas também podem agir como células imunoreguladoras, secretando citocinas e quimiocinas. É notável também, o fato de que células NK e NKT sejam as únicas fontes conhecida de IFN- γ durante respostas imunes inatas. Células T CD4+ e CD8+ produzem IFN- γ apenas após ativação. Esta citocina é conhecida por ativar macrófagos e levar a diferenciação de células T para o tipo auxiliar (*helper*) 1 (Th1). Em adição ao IFN- γ , também já foi documentado que células NK secretam TNF- α , GM-CSF, IL-5, IL-13, IL-10, TGF- β , MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, NO e outras moléculas reguladoras. Em adição às suas propriedades imunoreguladoras, IFN- γ e TNF- α podem induzir um estado antiviral na célula hospedeira e inibir a replicação dos vírus por mecanismos não citopáticos (AHMAD & AHMAD, 2003).

Células NK podem regular as respostas imunes por interação física com outras células. Suas interações com monócitos – macrófagos, células dendríticas, T, B, NKT e células do endotélio vascular estão começando a serem compreendidas. Estas interações possuem importantes implicações relacionadas com as respostas a infecções virais, tumores e autoimunidade. Sob condições adequadas, células NK podem proporcionar a diferenciação de monócitos em macrófagos. Elas também podem interagir com macrófagos ativados. Estas interações resultam na ativação das células NK pela interação via o receptor 2B4 (CD244) e CD38 (uma molécula multifuncional que também atua como receptor de células NK e T). As células NK podem também se tornar hiperestimuladas (com altas doses de LPS) e expressar novos ligantes para certos NKRs ativadores. Elas também eliminam macrófagos, que produzem TGF- β , IL-10 e citocinas imunossupressoras (ZANG *et al.*, 2007).

Conseqüentemente, as células NK promovem a resposta Th1 necessária para a indução de uma resposta imune efetiva contra patógenos intracelulares. Sendo assim, as células NK atuam não apenas em respostas imunes inatas, mas também contribuem para respostas adaptativas antígeno específica. Foi descrito em camundongos, um tipo celular que apresentava características de células dendríticas e NK. Este tipo celular foi nomeado como “*IFN-producing killer DC*” (IKDC – célula dendrítica assassina produtora de interferon), que elimina células infectadas por vírus, assim como tumores, produz IFNs e apresenta antígenos para células T. As células IKDC, de fato, representam um estágio de maturação das células NK (VOOSHENRICH et al., 2007). Estas células não foram encontradas em humanos. No entanto, é discutido se o sistema imune humano possui células NK que potencialmente podem agir como apresentadoras de antígeno sob condições apropriadas. Células NK humanas ativadas expressam várias moléculas, que podem interagir com células T, como por exemplo, CD11c, HLA de classe II, CD80, CD86, CCR7 e CD70. Interações com outras células do sistema imune são importantes para a indução efetiva das respostas imunes. Foi mostrado que células NK podem regular a memória de células T CD3. E a incubação de células NK com IL-18 proporcionou o aumento de algumas de suas funções (MAILLIARD et al., 2005).

Tais células são plásticas e podem se diferenciar entre tipos celulares que produzem predominantemente IFN- γ ou IL-5. Não é conhecido o mecanismo que possa explicar esta polarização nas células NK. Também já foi sugerido que estas diferenças na produção de citocinas podem ser resultantes de diferentes estados de diferenciação. Sendo assim, esta produção polarizada de citocinas pelas células NK pode estar correlacionada com as condições de certas doenças. Por exemplo, células NK produtoras de IFN- γ e IL-5 estão relacionadas com remissões e relapsos em esclerose múltipla em humanos, respectivamente. As células NK produtoras de IL-5 também podem ter um papel importante em casos de asma humana (WEI et al., 2005).

2.10. OUTRAS FUNÇÕES DAS CÉLULAS NK

Além de sua função essencial na resposta imune inata, as células NK também são relacionadas à doença do enxerto contra hospedeiro (GvHD) nos transplantes de medula óssea e regulação da hematopoiese. Estudos recentes sugerem que as NK podem conduzir e/ou direcionar respostas imunes adaptativas (FLODSTROM *et al.*, 2002), como mencionado no tópico anterior.

As células NK estão relacionadas com o papel da implantação do embrião, angiogênese e manutenção da gravidez. O endométrio contém um alto número de células NK. Quando comparadas as células NK do endométrio com células NK do sangue periférico, evidenciou-se que os subtipos de células NK do endométrio eram bastante diferentes. Diferença essa, que era maior que a encontrada entre os dois subtipos de NK que estão no sangue circulante. As células endometriais super expressam tetrasporinas e integrinas, ativando os receptores NKG2DE, NKG2C, KIR, galectina-1 e granzima-A (POLI, *et al.*, 2008). Elas são ativadas por citocinas pró-inflamatórias como INFs tipo I e interleucina-12 (IL-12) (WARREN, 1996), ou ainda por dinucleotídeos citosina-guanina não metilados de origem bacteriana (BALLAS *et al.*, 1996). Essa ativação acentua a citotoxicidade das NK e a produção de citocinas. As células NK utilizam vários mecanismos indutores de apoptose, como perforinas, granzimas e fatores de necrose tumoral (TNF), para lisar as células alvo de maneira rápida e precisa (FLODSTROM *et al.*, 2002).

A regulação da atividade das células NK é essencial para a manutenção da tolerância aos antígenos próprios. Inúmeros estudos têm relacionado a atividade alterada das células NK com o desenvolvimento de doenças autoimunes. Desde a década de 80 várias evidências sugerem a associação entre a diminuição do número e na atividade de células NK e doenças tais como esclerose múltipla, diabetes tipo I e lupus eritematoso sistêmico, além do envolvimento das células NK na etiologia de outras doenças autoimunes, particularmente da tireóide (BAXTER e SMYTH, 2002).

3. AS CÉLULAS NK E AUTOIMUNIDADE

Já foi visto que as NK interagem com células alvo através de citocinas e citotoxicidade direta. As quimiocinas e citocinas liberadas por essas células influenciam o início da resposta imune adaptativa. Dessa forma, as funções das NK são reguladas cuidadosamente para que não haja danos em tecidos saudáveis ou liberação alterada dessas substâncias que poderiam desregular a atividade do sistema imune adaptativo.

Linfócitos T autorreativos podem ser ativados quando autoantígenos ou moléculas semelhantes a eles (miméticas) são transportados para os órgãos linfóides e apresentados pelas células apresentadoras de antígenos. Portanto, uma etapa crítica de regulação acontece nesse local. Foi proposto que as células NK migram para a região rica em células apresentadoras de antígenos e podem regular as respostas imunes em infecções virais (SALAZAR-MATHER *et al.*, 1996; BIRON *et al.*, 1999). Outros estudos corroboraram essa hipótese, mostrando que as células NK são recrutadas ao local de apresentação de antígenos influenciando de maneira crítica e/ou regulando o início da resposta imune adaptativa.

A comunicação entre células NK e as células dendríticas não é unidirecional. A maturação das células dendríticas mediada por NK é o elo entre a resposta por NK e a resposta por células T. O contato com o receptor Nkp30 das células NK influencia a maturação das células dendríticas, que também podem acentuar as atividades citolíticas e a produção de interferon gama pelas células NK.

As células dendríticas apresentando antígenos para os linfócitos T. Além da ativação de células T, as células dendríticas regulam a proliferação e diferenciação de linfócitos B e a secreção de imunoglobulinas, a aquisição de suas funções efetoras e recrutamento para os tecidos, o que pode trazer consequências para o desenvolvimento de resposta contra antígenos próprios. Esse conjunto de interações torna as células NK importantes na atividade dos linfócitos B e, indiretamente, dos linfócitos T.

Estudos demonstraram que a interação entre células NK e linfócitos T resulta na produção de uma gama de citocinas e quimiocinas que podem explicar parcialmente a inflamação observada em tecidos acometidos por pênfigo vulgar e a produção de

autoanticorpos específicos. Linfócitos T extraídos de biópsias de lesões de pele de pacientes acometidos por pênfigo foram cocultivados com células NK expressando moléculas HLA de classe II. Quando estas células foram estimuladas pela presença de desmogleína recombinante, houve um aumento significativo na secreção de interleucina 6 e 8. Níveis de IFN- δ também foram elevados, apesar de não ter sido detectada secreção de TNF- α . O mesmo ocorre com linfócitos T extraídos de sangue periférico de pacientes de pênfigo, que exibiram uma proliferação específica quando cultivados com células NK (STERN *et al.*, 2008).

Sabe-se que em sítios de inflamação ocorre alta concentração de células NK que, juntamente com monócitos, atuam na manutenção dos processos inflamatórios (DALBETH, *et al.*, 2004). Porém, poucos estudos verificaram o papel da expressão de moléculas HLA de classe II na superfície destas células. Já foi observado que células NK expressando HLA de classe II, após serem ativadas por citocinas, possuem características semelhantes a células apresentadoras de antígeno e regulam a ativação de células T, utilizando peptídeos de vírus da gripe (HANA *et al.*, 2004). Entretanto, em outros estudos foi demonstrado que já existem altos níveis de expressão de HLA de classe II *in vivo* nas células NK, sem a adição de citocinas exógenas (STERN *et al.*, 2008).

No microambiente dos tecidos lesionados de pênfigo, células do próprio tecido funcionam como apresentadores de antígenos e apresentam peptídeos da desmogleína 3 para células T residentes e circulantes. Estas células proliferam e produzem várias citocinas que exercem seu efeito local e também são repassadas à circulação. As células NK ativadas podem migrar pelos linfonodos, baço e medula óssea, onde uma grande proporção de linfócitos B, produtores de anticorpos, está presente. Esses linfócitos B respondem a estimulação pelas células NK, o que resulta na secreção de altos níveis de autoanticorpos patogênicos. Sendo assim, é possível que a combinação das células NK expressando moléculas HLA de classe II e linfócitos T, no microambiente específico da lesão, facilita e amplifica a produção local e sistêmica de processos inflamatórios e eventualmente a produção de altas concentrações de autoanticorpos (STERN *et al.*, 2008).

Foi descrita a participação das células NK no desenvolvimento da doença autoimune miastenia grave em ratos (SHI *et al.*, 2000), a qual é mediada por células B e anticorpos.

4. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Estudos epidemiológicos têm relacionado o desenvolvimento e progressão de certas doenças humanas com genótipos específicos de *KIR*. A presença ou ausência de certos genes *KIR*, bem como diferentes combinações de genes *KIR* e HLA, já foram associadas a várias doenças (vide revisão bibliográfica).

Sendo assim, na busca de uma melhor compreensão das implicações funcionais da variação genética de *KIR* e *HLA* utilizamos ensaios de cultura mista de células NK e T provenientes de indivíduos saudáveis e de pacientes de pênfigo vulgar, selecionados com base em seus genótipos, para análise fenotípica e funcional comparativa dos produtos de diferentes genótipos KIR e a interação com seus ligantes.

Objetivos específicos:

Investigar a frequência de células NK nas amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes de pênfigo vulgar com diferentes genótipos *KIR*.

Avaliar a presença, ausência e proporção dos diferentes subtipos de células NK no sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes de pênfigo vulgar.

Verificar a citotoxicidade (lise celular) mediada por células NK provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes de pênfigo vulgar com diferentes genótipos formados pelos haplogrupos A e B, diferentes genótipos formados por alelos de *KIR3DL2* e polimorfismo de presença/ausência de cada gene KIR, frente a células alvo de indivíduos com diferentes genótipos *HLA*;

Analisar e quantificar a produção de mediadores inflamatórios por células NK estimuladas no ensaio de citotoxicidade considerando esses mesmos genótipos de *KIR* e *HLA*.

5. RESULTADOS

Os resultados desta tese estão descritos na forma de artigo, na língua inglesa, apresentados a seguir, de acordo com o artigo 62 da resolução nº 65/09 do CEPE e o artigo 60 das normas internas do Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná.

TITLE:

Cumulative effect of KIR3DL2 and KIR3DL1 genotypes and their cognate HLA ligands on cytotoxicity by NK cells *in vitro* and the effect of the ratio between activating and inhibitory KIR genes

Authors and Affiliations

Reginaldo Vieira de Sene¹, Danillo Gardenal Augusto¹, Maria Luiza Petzl-Erler¹

¹Human Molecular Genetics Laboratory, Department of Genetics, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil.

Corresponding author

Prof. Dr. Maria Luiza Petzl-Erler
Departamento de Genética
Universidade Federal do Paraná
Caixa Postal 19071
81531-990 Curitiba, Brazil
Tel: (+5541) 33611746; 3611724
Fax: (+5541) 33611793
e-mail: rvsene@gmail.com; perler@ufpr.br

Abstract

The killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) recognize HLA class I molecules and are important for balancing of inhibitory and activating signals that regulate the natural killer (NK) cell activity. The extensive genetic polymorphism of *KIR* comprehends various levels of diversity: presence/absence of individual genes, overall KIR gene content and allelic polymorphism. Susceptibility to some diseases has been associated with particular *KIR* and *HLA* genotypes. Pemphigus vulgaris (PV) is a blistering autoimmune disease that affects the skin and mucous membranes, with the production of antibodies against desmogleins 3 and 1. Here we evaluated the influence of the KIR and HLA genotype on the level of cytotoxicity by NK cells from healthy individuals and PV patients *in vitro*. PV patients presented an increase of 41% on NK cells frequency from peripheral blood. In addition, an average of 15.9% and 8.3% were NK CD56^{bright} cells in PV patients and healthy individuals, respectively. We observed that NK cells from *KIR3DL2*001⁺ KIR3DL1⁺* individuals were more efficiently inhibited than cells presenting other KIR phenotypes when co-cultured with T cells from *HLA-A*03/A*11 HLA-Bw4/Bw4* individuals. Furthermore, the inhibitory effect of *KIR3DL2*001* and *KIR3DL1* was more evident when NK cells from these individuals also presented a low ratio of activating KIR genes, suggesting an additive affect related to linkage disequilibrium of both genes. This effect was evidenced in both healthy donors and PV patients. These observations together with the detection of increased levels of IL-6 and IFN- γ in the culture media from cytotoxicity assays lead to the conclusion that the KIR gene content and allele-level genotypes have a significant effect on cytotoxicity by NK cells and may explain some aspects of the role of NK cells in the pathology of pemphigus.

Keywords: KIR, HLA, 3DL2, NK cells, cytotoxicity, pemphigus vulgaris

Introduction

Natural killer (NK) cells are key components of the innate immune response. They have the ability to both lyse target cells and provide an early source of immunoregulatory

cytokines (PIERRE *et al.*, 2010). Human NK cells comprise approximately 15% of all lymphocytes and are defined phenotypically by their expression of CD56 and lack of expression of CD3 (NAGLER *et al.*, 1990). There are two subtypes of NK cells, identified upon their cell-surface density of CD56. The majority (90%) of human NK cells has low-density expression of CD56 (CD56^{dim}) and express high levels of CD16, whereas 10% of NK cells are CD56^{bright}CD16^{dim} or CD56^{bright}CD16⁻ (COOPER *et al.*, 2001). According to the missing-self model, NK cells integrate activating and inhibitory signals and modulate the targeting of HLA class I-deficient cells, in particular virus-infected and transformed malignant cells (BASHIROVA *et al.* 2006). NK cells maintain wide-ranging interactions with other immune cells, such as macrophages and dendritic cells, resulting in numerous effects on the immune response as a whole through the stimulation of cytokine production and induction of cytotoxicity (CARRINGTON and MARTIN 2006).

The *killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR)* genes are clustered in a 160 kb region in the leukocyte receptor complex (LRC) at the long arm of human chromosome 19 (WILSON *et al.*, 2000, MARTIN *et al.*, 2000, MARTIN *et al.*, 2004). Killer-cell immunoglobulin-like receptors are expressed on the surface of NK cells and subpopulations of activated or memory T cells (PARHAM *et al.*, 1997). KIR gene-content haplotypes have been divided into two groups. Group A is defined by the presence of *KIR2DS4* as the only classical short-tailed stimulatory gene in combination with *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR2DP1* and *KIR3DP1* (SCHILLING, *et al.*, 2002). Group B presents an extensive combination of other *KIR* genes (inhibitory: *KIR2DL2*, *KIR2DL5*; stimulatory: *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*), including also some of the *KIR* found in haplogroup A haplotype. Diversity within the group A and group B haplotypes has been noted with respect to gene content (HSU *et al.*, 2002, UHRBERG *et al.*, 2002) as well as allelic variation (PYO *et al.*, 2010, MIDDLETON *et al.*, 2007, HOU *et al.*, 2011). Since strong linkage disequilibrium is observed within the centromeric and telomeric regions, but not between the two (GOURRAUD *et al.*, 2012) it has been suggested that the KIR haplotypes resulted from various permutations of centromeric and telomeric haplotype fragments (HSU *et al.*, 2002).

KIR has specificity for class I molecules and can either activate or inhibit cellular functions after ligand binding. KIR with specificity for HLA-A, -B and -C have been identified;

for other KIR, the specificity remains unknown (LANIER *et al.*, 1998). *KIR3DL2* is the gene at the most telomeric region of the *KIR* gene cluster and is present in virtually all haplotypes, therefore being considered a framework gene (MARTIN *et al.*, 2000, HSU *et al.*, 2002). This molecule has 70kDa, with three extracellular domains, long cytoplasmatic tail and two tyrosine inhibitory motifs. This is the longest *KIR*, with 15Kb, comprising nine exons and it is the second most polymorphic gene of the complex, with more than 80 alleles described, some of which remain still unconfirmed (VILCHES e PARHAM 2002, ROBINSON *et al.*, 2010). The recognition of HLA-A*03/A*11 ligands by KIR3DL2 was tested, and results suggested that KIR3DL1*001 recognizes HLA-A*03 and HLA-A*11 in a peptide-dependent manner (HANSASUTA, *et al.*, 2004)

In this study we aimed to analyze the potential differences of inhibition caused by *KIR3DL2* polymorphism, in the presence and absence of its HLA-A ligands taking into account the linkage disequilibrium between genes in the KIR cluster. We also sought information on phenotype and cytotoxicity differences of NK cells between healthy donors and pemphigus vulgaris (PV) patients.

Material and Methods

Samples

Cells from 30 healthy donors and 5 patients with pemphigus vulgaris (PV patients) were isolated from peripheral blood. These individuals were chosen based on their *KIR3DL2* genotype from our database. All patients were accessed at the Hospital Adventista do Penfigo, in Campo Grande, Brazil; they were properly diagnosed by clinical and laboratory tests, among which histopathological and/or immunohistochemistry. All individuals voluntarily agreed to participate and provided written informed consent. This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Parana, in accordance with the Brazilian Federal laws.

Cell Isolation

NK and T cells were magnetically isolated from 50ml of peripheral blood of each subject. Samples were processed for isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by density gradient centrifugation using Hystopaque 1077 (Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, MO, USA) according to manufacturer's manual. Cells were labeled with anti-CD3 microbeads from the CD3 Microbeads, human Kit (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) and washed through a LS column (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). CD3⁺ T cells were retained in the LS column, being further recovered and reserved. The negative fraction of the cells was collected and put through a LD column (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). This step was done to ensure purity of NK cells and retain the NKT cells (CD56⁺ CD3⁺) in the LD column. The negative fraction was then labeled with anti-CD56 microbeads from CD56 Microbeads, human Kit (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) and washed through a LS column. CD56⁺ NK cells were retained in the column and recovered and reserved.

Flow Cytometry

Aliquots of NK and T cells from each subject were manually counted and analyzed through flow cytometry (FACSVerse, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) to evaluate the purity of the sorted subpopulations. NK cells were labeled with anti-CD56 and anti-CD16 antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and T cells were labeled with anti-CD3 antibody (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). NK CD56^{bright} and CD56^{dim} subpopulations were also verified for each individual.

Cell Culture

Cells were co-cultured on 96 well plate at a concentration of 2.5×10^4 NK cells/well and 5×10^4 T cells/well through 4 days in RPMI media (Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, MO, USA) and

100U/ml of penicillin and 100U/ml of streptomycin (Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, MO, USA) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% of CO₂.

Cytotoxicity assay

NK cells from different healthy individuals and patients, with different *KIR* genotypes, were co-cultured with T cells having different *HLA-A* genotypes, with special attention to the presence or absence of *HLA-A*03*, *A*011* and *Bw4*, which are known ligands of KIR3DL2 and KIR3DL1 respectively. Several controls were used to ensure the responses in this assay. A pool of T cells isolated from different individuals containing wide variation of *HLA* genotypes ligands was used as positive control to achieve maximum biological cytotoxicity. Autologous tests were used as negative controls. Anti-KIR3DL2 antibody (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) was used to block this specific receptor in some tests.

After 4 days of incubation, cell cytotoxicity was accessed through activity of lactate dehydrogenase (LDH) using Cell Cytotoxicity Kit (Roche LTDA., Basel, Switzerland) according to manufacturer. Every sample generated an absorbance value that was the direct measure of cytotoxicity. Each test was performed in triplicate, and results are the mean of three different assays. The cytotoxicity was measured by absorbance, and cytotoxicity index was calculated by the formula: $[(\text{pool lysis}) - (\text{test lysis}) / (\text{pool lysis}) - (\text{autologous test lysis})]$. After statistical analysis, results were shown in average percentage of cytotoxicity, where T cell pool control was considered as 100% of cytotoxicity.

Cytokine assay

Supernatants were obtained after 4 days of incubation from cytotoxicity assays of 5 PV patients and 5 healthy donors with the same *KIR3DL2* genotype. These supernatants were analyzed through Cytometric Bead Array (CBA) Human TH1/TH2/TH17 Cytokine Kit (BD Biosciences). This assay measures the concentration of IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4, IL-2, and IL-17 released in the culture medium. The assay was performed according to the manufacturer's manual, and results were analyzed through flow cytometry (FACSVerse, BD

Bioscience, San Jose, CA, USA) using the FACSArray software (BD Bioscience, San Jose, CA, USA).

Statistical analysis

ANOVA was used to determine the statistical significance for all comparisons. The post test of Tukey was used to compare means samples of every triplicate from each three different assay. Additionally, a non-parametric analysis (Mann-Whitney) was performed to analyze statistical significance of the differences between healthy donors and PV patients. Analyses were done using GraphPad Prism software version 5.04. Probability (P) values lower than 0.05 were adopted as the significance limit. All prerequisites related to the use of these statistical tests (such as normality distribution and low variance) were previously verified and taken into account.

Results

To compare cytotoxicity by NK cell from individuals with different *KIR* genotypes when co-cultured with T cells from individuals with different *HLA-A* genotypes, we isolated NK cells and T cells from previously genotyped donors. These individuals were selected according to their *KIR* overall gene content and allelic genotyping of *KIR3DL2* and *HLA-A*. Using this information, we conducted various cytotoxicity assays based on the presence or absence of different *KIR3DL2* and *HLA-A* alleles. Besides, we quantified NK cells and their subtypes in peripheral blood and the levels of cytokines secreted during *in vitro* cell cultures.

PV patients showed increased number of NK cells in peripheral blood

It is known that autoimmune diseases cause a wide impact upon the different cells from the immune system. To verify if there is any kind of disturbance in the NK cell population from PV patients, we conducted an analysis of overall NK cell and NK cell subtypes quantification. After magnetic cell sorting, the whole NK cell population was manually

counted and values were compared by the Mann-Whitney test (Table 1). Patients with PV showed a higher frequency of NK cells, compared to healthy donors. A significant difference was observed between the number of NK cells in PV patients compared to healthy controls. All PV patients had a higher proportion of NK cells in comparison to every healthy individual in the sample.

Table 1 – Relative and absolute frequencies of NK cells in the peripheral blood of healthy donors and PV patients:

	Healthy donors (n = 30)	PV patients (n = 5)
NK Cells		
Frequency (%) of PBMC	10.3 ± 0.72	14.5 ± 1.6*
Absolute number/10 ⁶ cells	1.2x10 ⁵ ± 2,966	1.4x10 ⁵ ± 1,228*

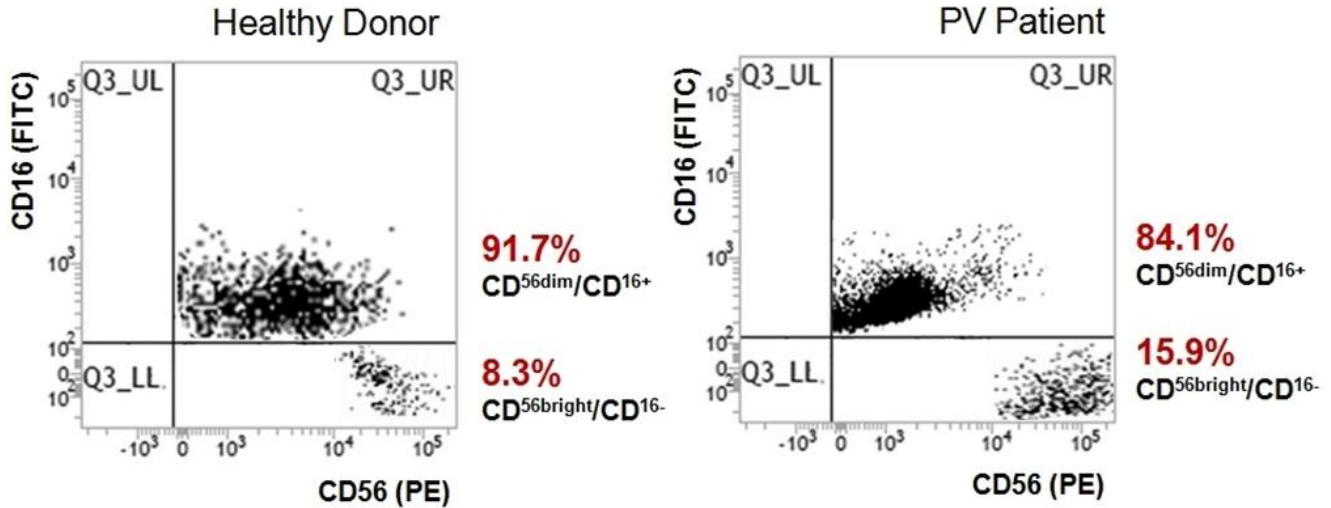
Values are the mean ± sd.

* $P < 0.05$ healthy donors versus PV patients by the Mann-Whitney test.

CD56^{bright}/CD16⁻ NK cell population is increased in peripheral blood of PV patients

After each magnetic cell isolation, we tested the purity by flow cytometry, to verify the proportion of NK and T cells. For all cell populations, the purity was above 90%.

We verified that NK cell number was increased in PV patients. Further, CD56^{bright}/CD16⁻ cells were more frequent and consequently CD56^{dim}/CD16⁺ cells were less frequent in PV patients (FIGURE 1) in comparison to healthy donors ($P < 0.05$).



NK Cell Subtype	CD56 ^{dim} /CD16 ⁺	CD56 ^{bright} /CD16 ⁻
Healthy donors (n=30)	9,036±372*	853±52 [#]
PV patients (n=5)	8,482±226*	1,475±127 [#]

Values are the mean ± sd.

* and [#] P<0.05 by Mann-Whitney test.

Figure 1. Increased frequency of the NK CD56^{bright} cell subset in peripheral blood of PV patients. Healthy donors had 91.7% of CD56^{dim} and 8.3% of CD56^{bright} NK cells in the peripheral blood. PV patients had 15.9% of CD56^{bright} and 84.1% of CD56^{dim} NK cells, which is a significant difference relative to the same subtypes in healthy donors.

Decreased cytotoxicity was observed in individuals bearing KIR haplogroup AA genotype

Our main goal in this study was to observe the possible effect of KIR gene content and *KIR3DL2* allelic genotype on *in vitro* cytotoxicity mediated by NK cells, co-culturing NK cells and T cells from different donors as described before. First, we grouped the individuals according to the two major KIR haplogroups, A and B, on basis of their KIR profiles. Hence, we identified homozygous AA homozygous BB and heterozygous AB individuals (the last two groups together are referred here as B+). Isolated NK cells from each individual were co-cultured in an allogeneic setting with T cells from other individuals. As negative and positive

controls we used the autologous co-culture and a pool of T cells, respectively. After data analysis, we could verify significant differences in cytotoxicity levels when NK cells were co-cultured with allogeneic T cells bearing or lacking the *KIR3DL2* possible ligands: *HLA-A*03* and/or *HLA-A*11*. Recently it has been shown that *HLA-B*27* is an additional ligand for this specific KIR gene (WONG-BAEZA *et al.*, 2013). We had two individuals in our sample bearing this specific *HLA-B*, but results showed that there were no differences regarding the cytotoxicity effect when NK cells were in the presence or absence of *B*27* (Figure 2), so in this work, we will focus our results on the classic ligands for the gene.

After individuals were grouped into AA and B+, we analyzed the average cytotoxicity by NK cells of the two groups when cultured with T cells bearing different combinations of *KIR3DL2* ligands. We observed a significant decrease of cytotoxicity by NK cells from AA individuals in comparison to B+ individuals when cultured in the presence of T cells bearing both (*HLA-A*03/A*11*) only one (*HLA-A*03/X* or *HLA-A*11/X*), or none of the ligands (*HLA-A*X/A*Y*) (FIGURE 2).

When taking into account the allelic variation of the *KIR3DL2* gene, we observed a higher frequency of individuals bearing the allele *KIR3DL2*001* in haplogroup A (TABLE 2). This was expected since *KIR3DL2*001* and *KIR3DL2*002* are in linkage disequilibrium with *KIR3DL1*001*, which is found in haplogroup A (SHILLING, *et al.*, 2002). Regarding the strong linkage disequilibrium we also analyzed the cytotoxicity when the individuals of the two haplogroups were grouped by the presence or absence of *KIR3DL1* and *HLA-Bw4*, its known ligand (FIGURE 3).

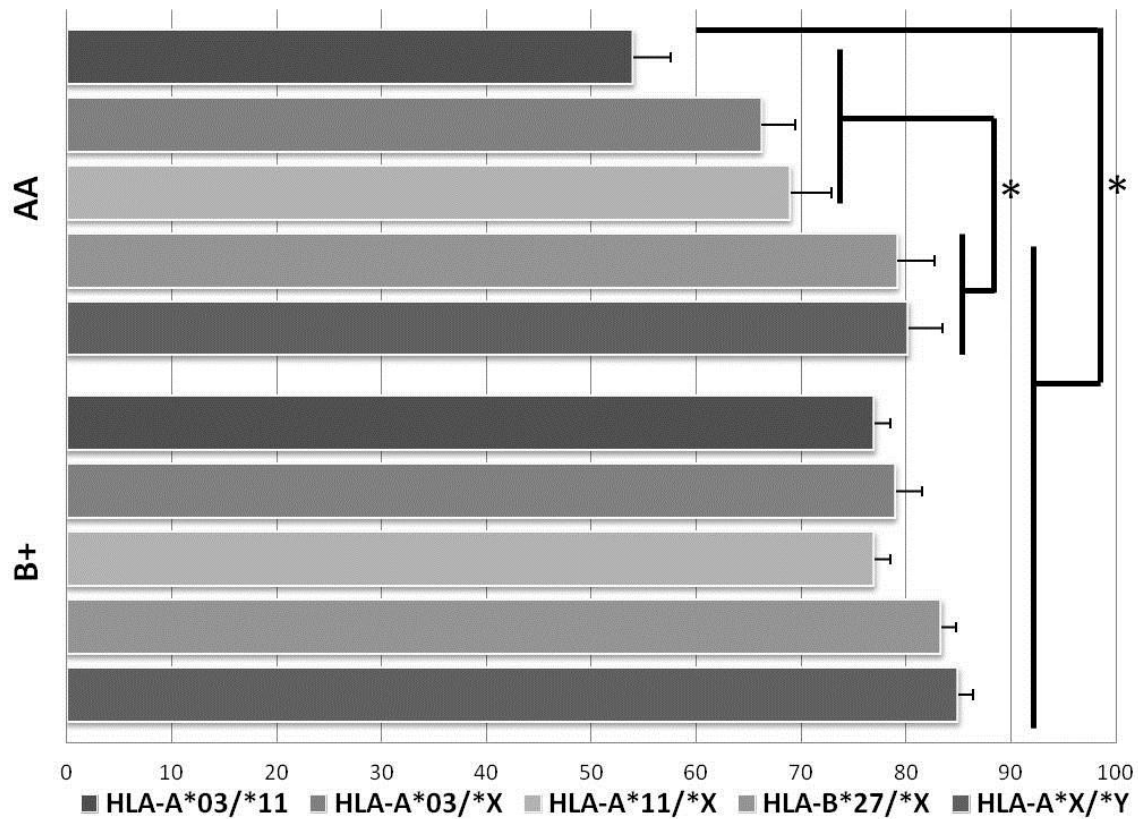


Figure 2. Decreased cytotoxicity by NK cells from individuals homozygous for KIR haplogroup A (AA, n=06) in comparison to NK cells from individuals homozygous and heterozygous for haplogroup B (B+, grouping genotypes BB and BA, n=24). Cells from 30 donors were extracted from peripheral blood and NK and T cells were isolated. NK cells from each individual were co-cultured with T cells bearing two (*A*03/A*11*, n=01), one (*A*03/X*, n=06 or *A*11/X*, n=04 or *HLA-B*27*, n=02) or none (*A*X/A*Y*, n=17) ligands. Cytotoxicity by AA NK cells in the presence of two or one *HLA-A* ligand was significantly ($P<0.05$) decreased in comparison to cytotoxicity by B+ NK cells. Results are shown as average percentage of lysis inhibition. The T cell pool was used as control of 100% lysis.

Haplogroup	KIR3DL1	KIR2DL1	KIR2DL3	KIR2DS4	KIR2DL2	KIR2DL5	KIR3DS1	KIR2DS1	KIR2DS2	KIR2DS3	KIR2DS5	KIR2DL4	KIR3DL2	KIR3DL3	KIR2DP1
AA													002/007		
													001/001		
													001/002		
													001/003		
													001/001		
													001/001		
Haplogroup	KIR3DL1	KIR2DL1	KIR2DL3	KIR2DS4	KIR2DL2	KIR2DL5	KIR3DS1	KIR2DS1	KIR2DS2	KIR2DS3	KIR2DS5	KIR2DL4	KIR3DL2	KIR3DL3	KIR2DP1
B+													003/005		
													009/009		
													002/002		
													001/005		
													007/009		
													003/009		
													003/008		
													001/002		
													001/002		
													002/011		
													003/007		
													007/010		
													009/009		
													002/002		
													005/005		
													007/007		
													005/005		
													005/005		
													007/007		
													007/007		
												007/007			
												003/003			
												002/002			
												002/008			

Table 2 – KIR gene content profiles and KIR3DL2 genotypes of healthy donors. KIR content for all 30 healthy donors used in this study, as well as *KIR3DL2* genotypes. Dark squares denote presence of the gene and white squares represent absence of the gene. Individuals homozygous for haplogroup A (AA) exhibited a higher frequency of *KIR3DL2*001* in comparison to B+ individuals.

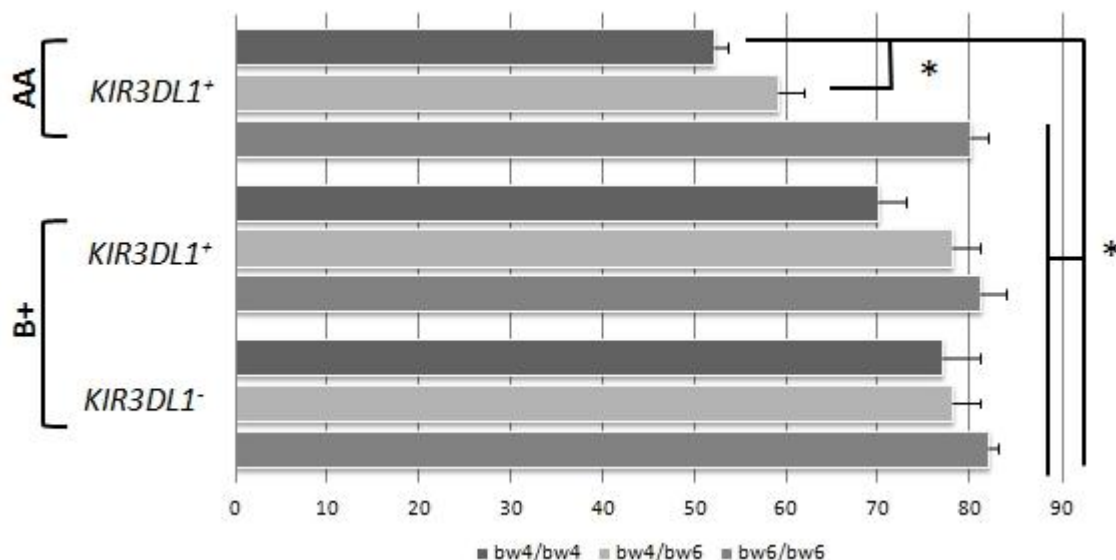


Figure 3. Decreased cytotoxicity by NK cells from individuals homozygous for KIR haplogroup A *KIR3DL1*⁺ (n = 06) in comparison to NK cells from individuals with haplogroup B+ *KIR3DL1*⁺ (n = 22) and *KIR3DL1*⁻ (n = 02). Cells from 30 donors were extracted from peripheral blood and NK and T cells were isolated. NK cells from each individual were co-cultured with T cells bearing two (Bw4/Bw4, n = 05), one (Bw4/Bw6, n = 15) or none (Bw6/Bw6, n = 10) ligands. Cytotoxicity by AA NK cells in the presence of two or one *HLA-B* ligand was significantly ($P < 0.05$) decreased in comparison to cytotoxicity by B+ NK cells. Results are shown as average percentage of lysis inhibition. The T cell pool was used as control of 100% lysis.

*KIR3DL2**001⁺ *KIR3DL1*⁺ NK cells exhibited decreased cytotoxicity upon interaction with *HLA-A**03/*A**11 and *HLA-Bw4/Bw4* compared to *KIR3DL2**001⁻ *KIR3DL1*⁺ and *KIR3DL2**001⁺ *KIR3DL1*⁻ NK cells.

After performing cytotoxicity assays using NK cells with different *KIR3DL2* genotypes in the presence and absence of their ligands, we observed that cytotoxicity by NK cells from AA individuals bearing allele *KIR3DL2**001 (*KIR3DL2**001⁺) was significantly lower than that by NK cells from B+ individuals. This effect was clearly stronger when cells with this allotype were incubated with T cells exhibiting *HLA-A**03 and/or *A**11, compared to other *KIR3DL2* allotypes (FIGURE 4).

To evaluate if this decreased cytotoxicity was an effect of the haplogroup genotype or *KIR3DL2**001, we analyzed the responses of B+ individuals bearing the specific allele, compared to individuals not bearing *KIR3DL2**001 (*KIR3DL2**001⁻) in the presence of *HLA-A**03 and *A**11 (FIGURE 5), but no significant difference was observed. To verify if this effect

was mostly due to the *KIR3DL2* genotype regardless of the haplogroup, we blocked NK cells receptors with specific anti-*KIR3DL2* antibodies. After blocking, the overall cytotoxicity was increased (FIGURE 6). This was observed for every individual and every allotype analyzed, but as we described before, there is strong linkage disequilibrium between *KIR3DL2* and *KIR3DL1*. So, we considered that the *KIR3DL1* gene might be for the decreased cytotoxicity effect observed so far. We have already shown that *KIR3DL1*⁺ individuals from haplogroup A exhibit decreased cytotoxicity compared to individuals *KIR3DL1*⁺ or *3DL1*⁻ from haplogroup B+ (FIGURE 3). When we analyzed these two genes together (*KIR3DL1* and *KIR3DL2*) in the presence or absence of their ligands, we found a slightly different profile of cytotoxicity (FIGURE 7).

Also, the gene content for the KIR haplogroups must be taken into account. After all these analysis, we also evaluated the overall cytotoxicity from the cells of the individuals grouped by number of activating and inhibitory genes (FIGURE 8).

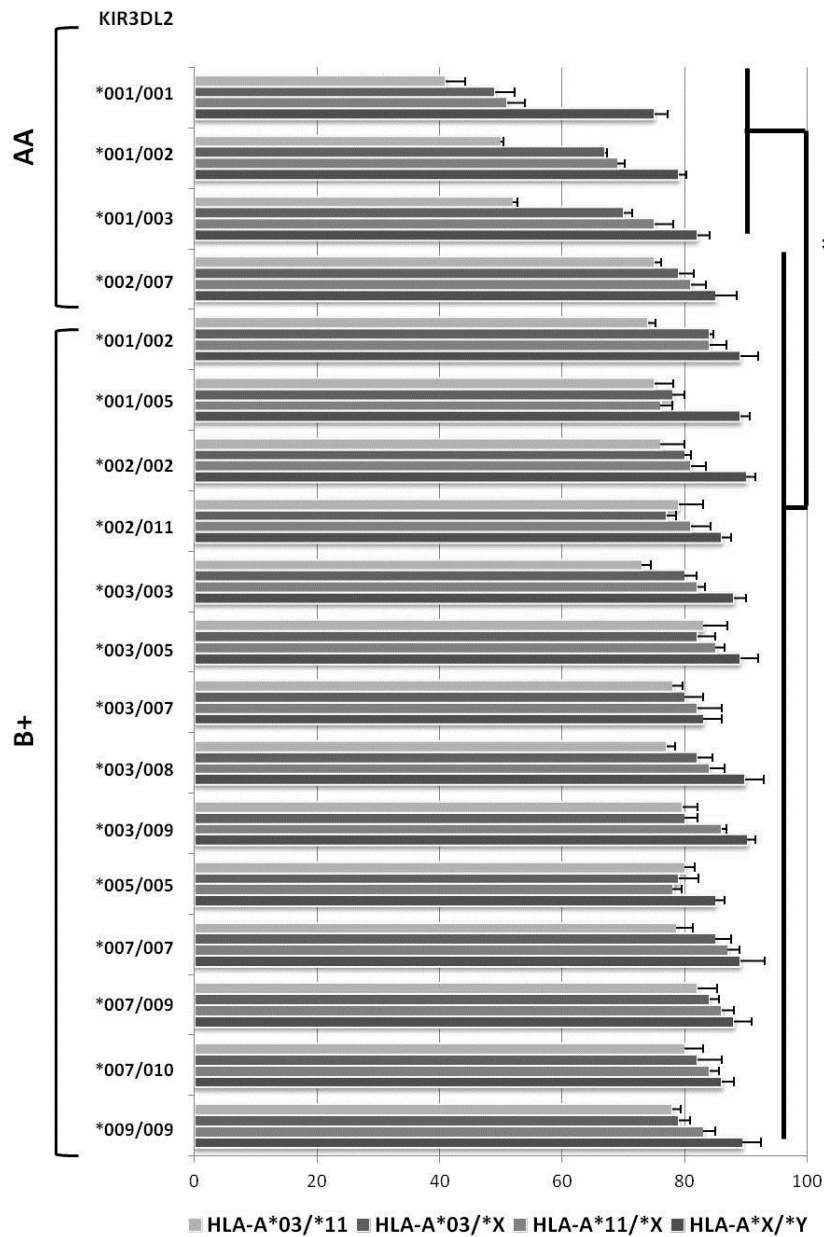


Figure 4. NK cell cytotoxicity from individuals grouped by the KIR haplogroup genotype and the *KIR3DL2* allotype. NK cells from 30 individuals grouped in different *KIR3DL2* genotypes were co-cultured with T cells of individuals presenting two (*A*03/A*11*, n = 01), one (*A*03/X*, n = 07 or *A*11/X*, n = 04) or none (*A*X/A*Y*, n = 18) HLA ligands. Cytotoxicity was significantly lower ($P < 0.05$) when NK cells from AA individuals homozygous or heterozygous for *KIR3DL2*001* were compared to NK cells from the AA individual not bearing the **001* allele and to B+ individuals, regardless of the presence of allele *KIR3DL2*001*. Results are shown in average percentage of lysis inhibition. The T cell pool was used as control of 100% of lysis.

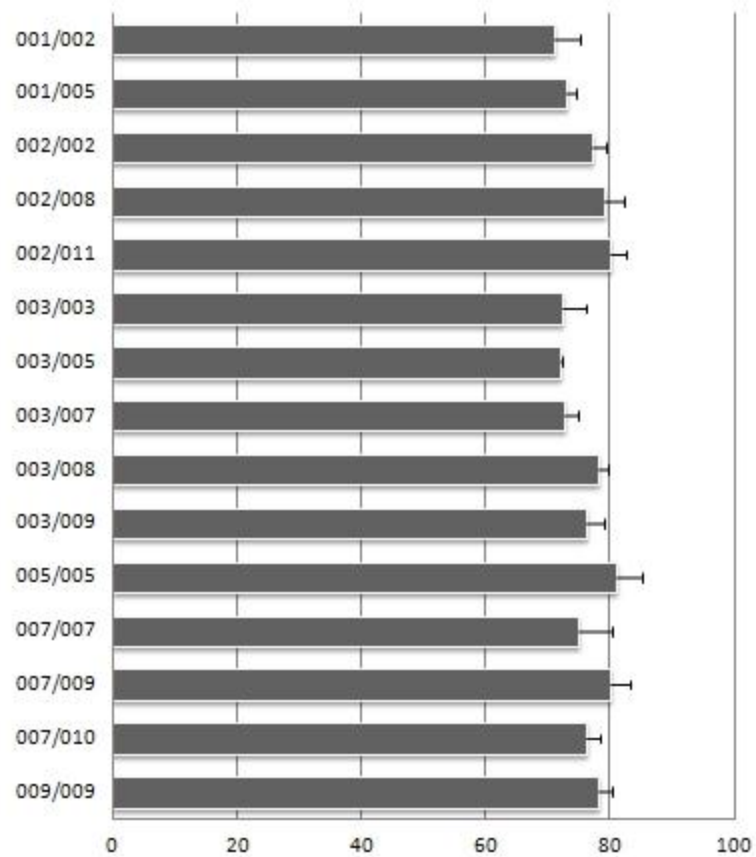


Figure 5. Comparison of NK cell cytotoxicity between B+ individuals with and without the *KIR3DL2*001* allotype. The NK cells from individuals with at least one B group haplotype were co-cultured with T cells of individuals presenting HLA-A*03/A*11, to verify if the *KIR3DL2* genotypes have an effect on the cytotoxicity level. Overall cytotoxicity was not significantly increased or decreased when comparing individuals *KIR3DL2*001*⁺ and individuals not bearing the allotype *001. The results are shown in average percentage of lysis inhibition. The T cell pool was used as control of 100% of lysis.

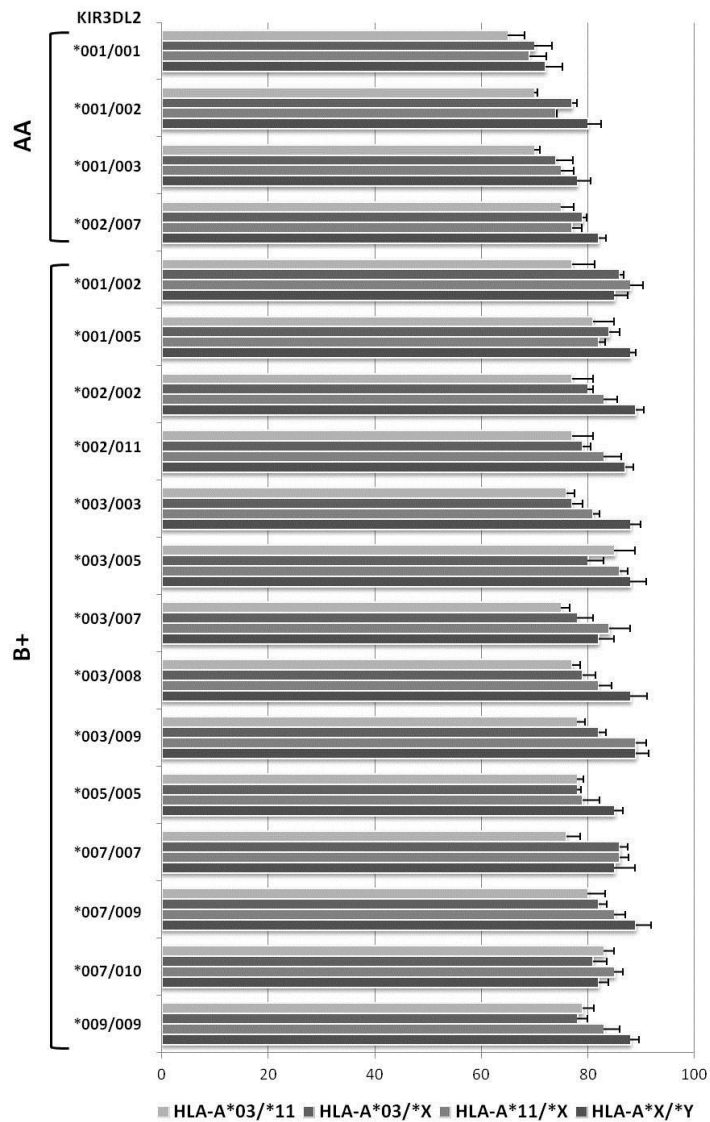


Figure 6. Cytotoxicity assay with blocking antibody. NK cells from 30 individuals with different *KIR3DL2* genotypes were grouped and co-cultured with T cells of individuals presenting two (*A*03/A*11*, $n = 01$), one (*A*03/X*, $n = 07$ or *A*11/X*, $n = 04$) or none (*A*X/A*Y*, $n = 18$) HLA ligands, in the presence of specific anti-*KIR3DL2* antibody. Overall cytotoxicity was significantly increased ($P < 0.05$) compared to the previous assay, performed in the absence of the blocking antibody. There was no significant statistical difference between the individuals within the assay. Results are shown in average percentage of lysis inhibition. The T cell pool was used as control of 100% of lysis.

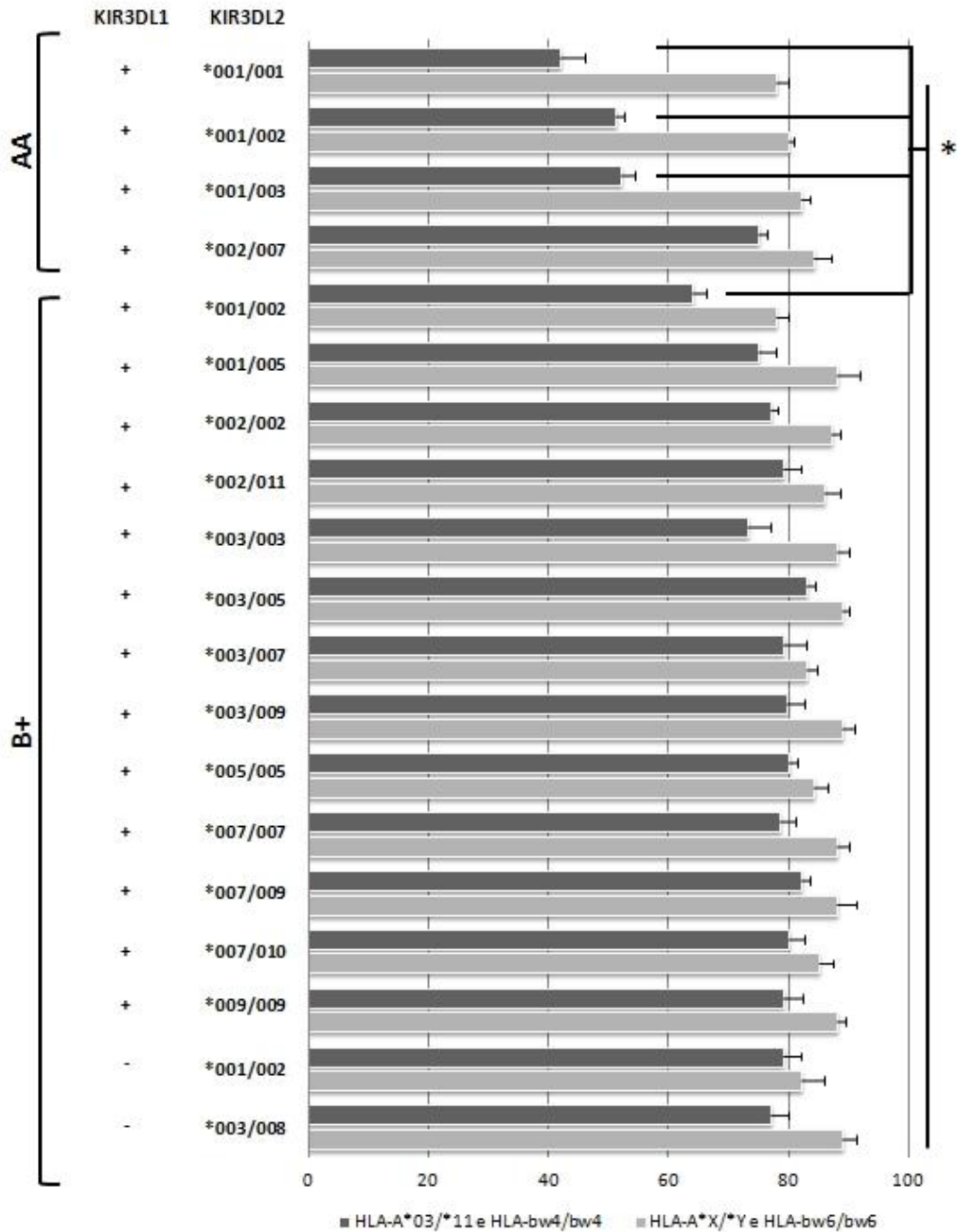


Figure 7. NK cell cytotoxicity from individuals grouped by *KIR3DL1* presence and *KIR3DL2* allotype. NK cells from 30 individuals grouped in haplotypes AA and B+, showing different *KIR3DL2* and *KIR3DL1* genotypes were co-cultured with T cells of individual presenting A*03/A*11 and HLA-Bw4/Bw4 or A*X/A*Y and HLA-Bw6/Bw6 HLA ligands. Cytotoxicity was significantly lower ($P < 0.05$) when NK cells from *KIR3DL2**001⁺ *KIR3DL1*⁺ individuals were compared to NK cells from individuals *KIR3DL2**001⁻ *KIR3DL1*⁺, *KIR3DL2**001⁺ *KIR3DL1*⁻ and *KIR3DL2*⁻ *KIR3DL1*⁻. Results are shown in average percentage of lysis inhibition. The T cell pool was used as control of 100% of lysis.

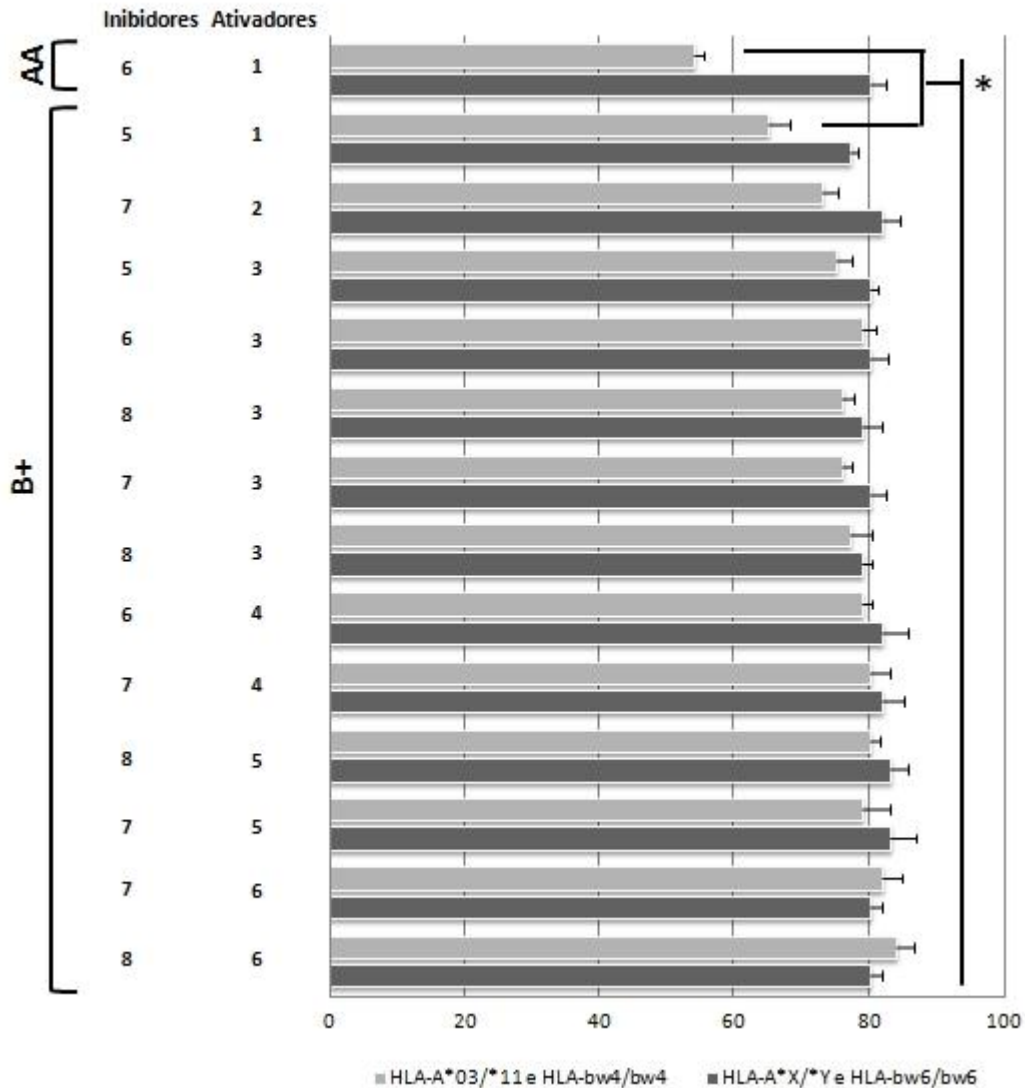


Figure 8. NK cell cytotoxicity from individuals grouped by numbers of activating and inhibiting genes. NK cells from 30 individuals grouped in haplotypes AA and B+, showing different *KIR* gene content, and were co-cultured with T cells of individual presenting A*03/A*11 and HLA-Bw4/Bw4 or A*X/A*Y and HLA-Bw6/Bw6 HLA ligands. Cytotoxicity was significantly lower ($P < 0.05$) when cytotoxicity from NK cells with only one activating gene were compared to other groups with more than one activating gene. Also, cells from individuals *KIR3DL2*001⁺ KIR3DL1⁺* were the ones exhibiting less cytotoxicity. Results are shown in average percentage of lysis inhibition. The T cell pool was used as control of 100% of lysis.

*KIR3DL2*001⁺ KIR3DL1⁺* PV patients with high activating/inhibiting gene content, showed increased cytotoxicity when compared to healthy donors

After the observation that NK cells from *KIR3DL2*001⁺ KIR3DL1⁺* healthy donors with only one activating gene showed a decreased cytotoxicity, we analyzed the cytotoxicity of NK cells from PV patients. We tested the cells of 5 PV patients in order to compare: *KIR3DL2* genotypes in the presence or absence of the *HLA-A*; *presence or absence of KIR3DL1* and *HLA-B* ligands; and the number of activating and inhibiting genes expressed by these individuals (FIGURE 9).

Comparing the cytotoxicity among PV patients, we observed that patients *KIR3DL2*001⁺ KIR3DL2⁺* with only one activating gene, showed significantly reduced ($P < 0.05$) cytotoxicity, when compared to other patients (FIGURE 9). This effect was still visible when comparing cytotoxicity by NK cells from healthy donors and PV patients (FIGURE 9). Every sample showed decreased cytotoxicity in *KIR3DL2*001⁺* healthy donor cells, compared to the same genotype in PV patients.

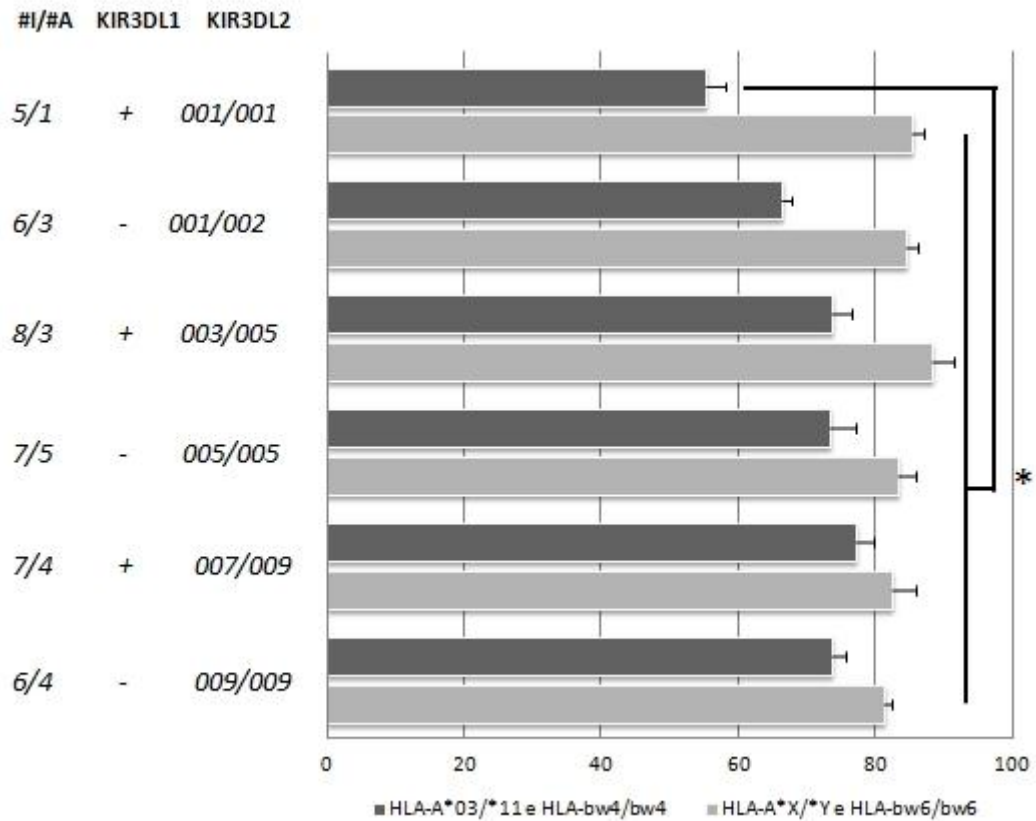


Figure 9. PV patients cytotoxicity assay. NK cells of five PV patients with different *KIR3DL2* genotypes, presence or absence of *KIR3DL1*, and different ratios of inhibiting (#I) and activating (#A) genes were co-cultured with T cells of individuals presenting A*03/A*11 and HLA-Bw4/Bw4 or A*X/A*Y and HLA-Bw6/Bw6 HLA ligands. Cytotoxicity was significantly decreased ($P < 0.05$) when NK cells from *KIR3DL2**001/*001 *KIR3DL2*⁺ patient with only one activating gene were exposed to T cells bearing both *HLA-A* and B ligands. Results are shown as average percentage of lysis inhibition. The T cell pool was used as control of 100% of lysis.

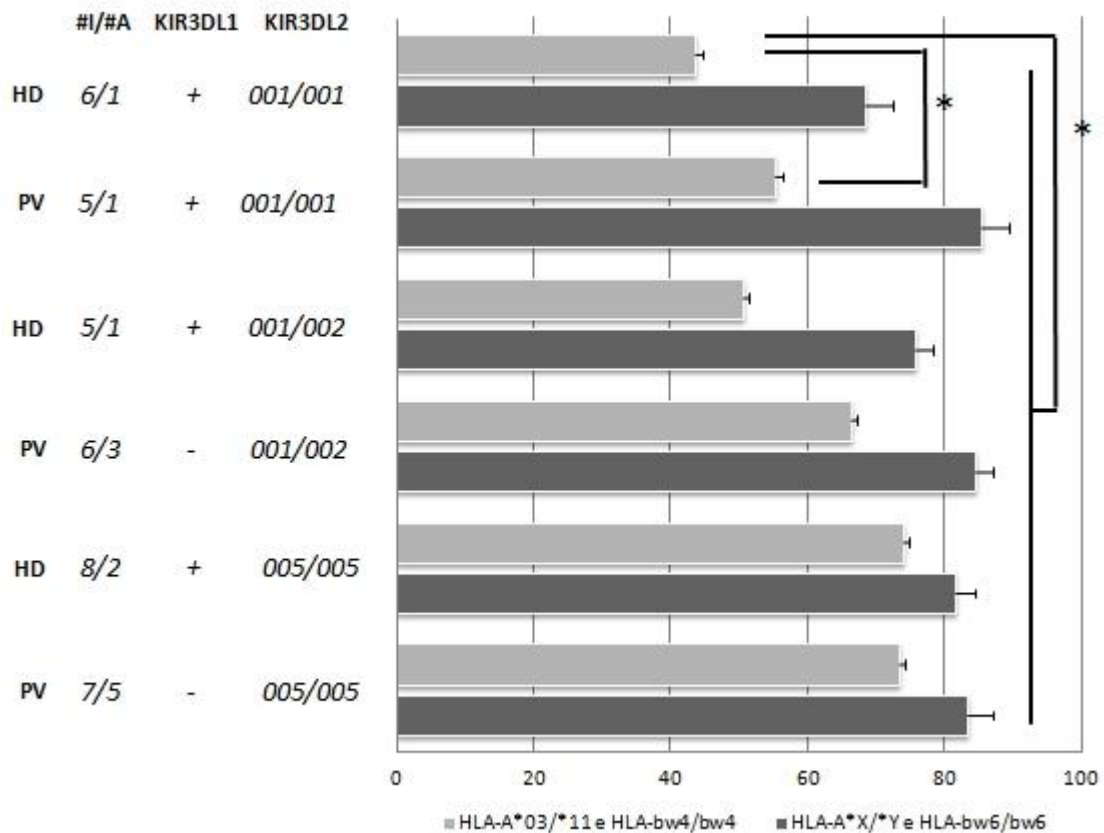


Figure 10. Comparison of cytotoxicity between healthy donors and PV patients. NK cells of three healthy donors (HD) and three patients (PV) were co-cultured with T cells of individuals presenting A*03/A*11 and HLA-Bw4/Bw4 or A*X/A*Y and HLA-Bw6/Bw6 HLA ligands. We observed decreased cytotoxicity for both *KIR3DL2*001*⁺ *KIR3DL1*⁺ healthy donors and PV patients with one activating gene. Also, we observed significant results ($P<0.05$) when compared the decreased cytotoxicity from healthy donors and PV patients with same *KIR3DL2* allotypes. The results are shown in average percentage of lysis inhibition. The T cell pool control was used as 100% of lysis.

Increased levels of IL-6 and IFN- γ on cultured cells from PV patients.

To determine the cytokine profile in the culture medium after 4 days of co-culture, we withdrew a sample of the supernatant from selected representative combinations of NK and T cells, for the two groups in this study: PV patients and healthy individuals. This sample was used in an analysis of the cytokine profile released during the cytotoxicity assay. We selected healthy donors and PV patients that had their NK cells incubated with T cells from other individuals in the presence of HLA-A*03/A*11 ligands. The cytokine profile revealed a significant increase ($P<0.05$) in the levels of IL-6 and IFN- γ from the PV patients in

comparison to healthy donors (FIGURE 10). Healthy donors exhibited no statistical differences regarding cytokine secretion during cytotoxicity assays.

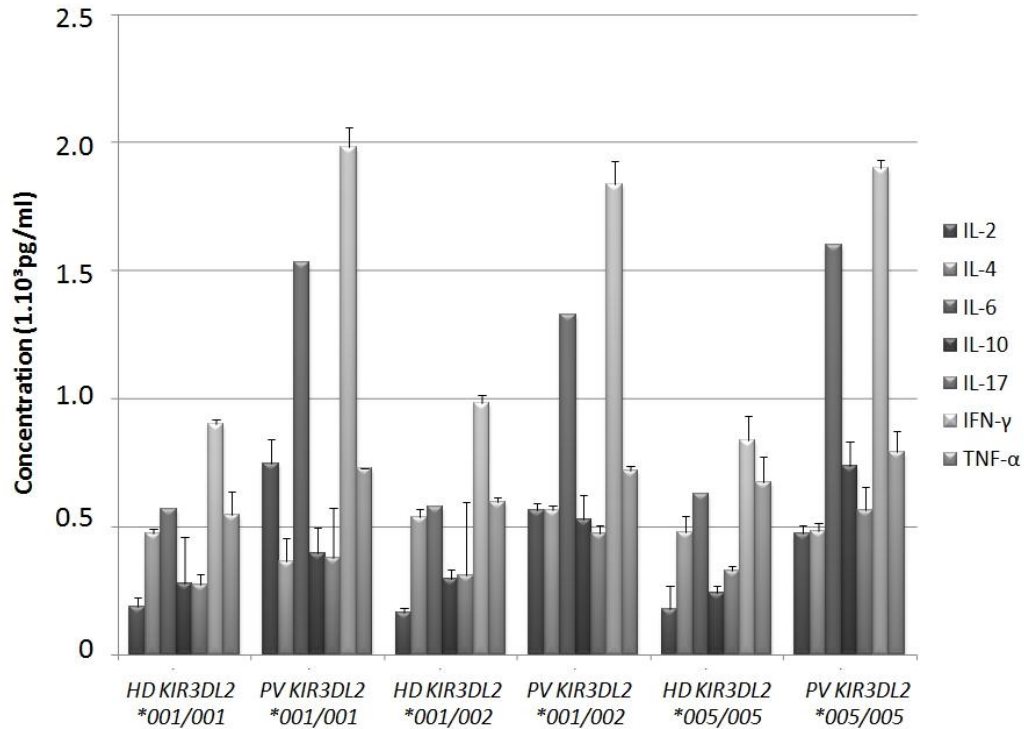


Figure 10. Cytokine release profile - comparison between healthy donors and PV patients. NK cells with different *KIR3DL2* genotypes from healthy donors (HD) and PV patients were co-cultured with T cells presenting *HLA-A*03/A*11*. After four days of incubation, cytokine release in the medium was measured by cytometric bead array. A significant increase ($P < 0.05$) of IL-6 and IFN- γ was seen for NK cells from PV patients. This increase was not related to the *KIR3DL2* genotype, since healthy donors with the same genotype as PV patients did not show significant increase or decrease in cytokine production.

Discussion

It is known that *HLA* polymorphisms can determine differences in adaptive and also innate immune responses between individuals (KIM *et al.*, 2008). In the context of autoimmune disease it is also important to verify the potential effects of *KIR* polymorphism. We suggest that *KIR* allotypes and overall gene content may differ in inhibition and as well as in activating signaling. In this study we evaluated the potential difference between genotypes of an inhibitory polymorphic *KIR* gene, and the presence, absence and quantity of other genes from this cluster.

We verified a statistical difference between the frequency of NK cells in the peripheral blood of healthy individuals and PV patients. This result corroborates previous studies where it was demonstrated that CD56⁺CD3⁻ NK cells, extracted from perilesional skin of active PV patients, showed increased frequency (TAKAHASHI, *et al.*, 2007). Other researchers also conducted experiments with NK cells extracted from perilesional skin of diseased patients, and their findings also indicate an increased number of NK cells in patient's tissue. Since in our work we only verified cells from peripheral blood, we can strongly suggest that NK cell frequency is increased either in patient's peripheral blood and skin tissue. We can hypothesize that this increase of NK cell in peripheral blood might be prior to the increase in skin tissue. This may be due to the fact that inflammatory processes of PV lead to complex cells interactions and stimulatory events, which help cells proliferate (STERN *et al.*, 2008).

After analyzing NK cells subtypes, we observed an increased ratio of CD56^{bright} NK cell subtype in peripheral blood of PV patients group. The ratio for healthy individuals is an average of 10% and 90% of NK cells, respectively of CD56^{bright} and CD56^{dim} subtypes (COOPER *et al.*, 2001). We verified similar frequencies (8.3% and 91.7% from CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cell subtypes) between healthy donors. It is known that normal ratios of NK cell subtypes are altered during the process of aging. Numbers of CD56^{dim} are expanded in elderly populations, whereas there is no significant change in CD56^{bright} NK cells (KYOIZUMI *et al.*, 2013). Although our PV patients population is older (39.8 years \pm 4.8) compared to our healthy donors sample (25.4 years \pm 5.2) we did not observe an increased number of CD56^{dim} in our older population. We could verify the opposite, a decrease in this particular subtype. This difference is probably related to the disease, where high levels of cytokines are present, thus interacting, activating and inhibiting different aspects of cell homeostasis, such as proliferation, cytotoxicity activity and cytokine production (HAZELDINE, *et al.*, 2013).

The increased number of CD56^{bright} cell subtype in the PV patients group may be due to increased inflammatory processes, since this NK subtype is mostly involved in cytokine production and do not engage in direct cytotoxicity activities. This NK CD56^{bright} subtype is enriched at sites of inflammation and together with monocytes is involved in maintaining the inflammation (DALBERTH *et al.*, 2004). This set of data is strongly correlated with the cytokine profiles observed from the supernatants of the cytotoxicity assays. We verified that

PV patients presented high levels of IL-6 and IFN- γ after 4 days in culture. This increase of cytokine release was not related with the *KIR3DL2* genotype expressed by the NK cells or the presence of specific HLA-A ligands. The high level of IL-6 and IFN- γ was restricted to PV patients group. Since PV patients showed an increased ratio of cytokine production NK CD56^{bright} subtype cells, we can suggest that the augmented cytokine levels may be partially correlated with the increased cell subtype frequency.

IL-6 is a cytokine with a wide range of biological activities in immune regulation and evidences indicate pathological roles for IL-6 in various conditions, such as inflammatory, autoimmune and malignant diseases (KISHIMOTO *et al.*, 1971), In vivo, the liberation of IL-6 is known to stimulate B cells to produce immunoglobulin (DALBERTH *et al.*, 2004), and IFN- γ is known to promote leukocyte attraction, directs growth, maturation, and differentiation of many cell types (BOEHM *et al.*, 1997), in addition to enhancing natural killer cell activity and regulating B cell functions such as immunoglobulin production and class switching (CARNAUD, *et al.*, 1999), which in the case of pemphigus, may configure in auto-antibodies.

Stern *et al.*, 2008, conducted several experiments, where they observed that CD4T cell lines from perilesional skin of PV patients co-cultured with CD56⁺ CD3⁻ NK cells expressing MHC class II molecules, in the presence of desmoglein 3 (Dsg3), secreted significantly higher levels of IL-6 and IL-8. Levels of IFN- γ were elevated but the difference was not statistically significant. They achieved similar results when co-culturing peripheral blood CD4T cells from patients with active disease and CD56⁺ CD3⁻ NK cells expressing MHC class II molecules, in the presence of Dsg3, without the addition of exogenous cytokines. Our findings generated similar results regarding the secretion of IL-6 and IFN- γ in PV patients, but not in healthy donors. NK cells may express MHC class II molecules and the co-stimulatory molecule B7-H3. Professional APCs express B7-H3 and have been shown to enhance the induction of cytotoxic T cells and stimulate IFN- γ (CHAPOVAL *et al.*, 2001). It has also been reported that NK cells expressing MHC class II molecules, following activation with cytokines, have APC-like properties and regulate T cell activation, using a peptide of the influenza virus (HANNA *et al.*, 2004).

We also verified that individuals presenting the KIR haplogroup AA genotype exhibited decreased cytotoxicity when compared to donors with KIR haplogroup B in cytotoxicity

assays. NK cells from individuals with various genotypes from haplogroup A and B were co-cultured with different combinations of T cells. We observed a decreased cytotoxicity level (or an increased inhibition of cytotoxicity) when donors from haplogroup A were co-cultured with T cells bearing *HLA-A*03/A*11*. After further analysis, we also verified that individuals *KIR3DL1*⁺ from haplogroup A presented a decreased cytotoxicity in the assays. When verified our sample in haplogroup A, we observed a high frequency of *KIR3DL2*001*, an inhibitor receptor which was previously shown to bind *HLA-A*03*, *HLA-A*11* and more recently, it was demonstrated it can also bind *HLA-B*27* (WONG-BAEZA *et al.*, 2013). In our study, after analysis of cytotoxicity in the presence of *HLA-B*27*, we did not observe significant results regarding the increased or decreased activities.

The inhibition of cytotoxicity was significant between individuals from haplogroup A and B. Diversity between the haplogroups A and B has been noted with respect to gene content as well as allelic variation. This variation is found within both centromeric and telomeric regions, and strong linkage disequilibrium is observed within these portions, but not between the two. It has been suggested that a *KIR* haplotype consists of various permutations of centromeric and telomeric region variants (VIERRA-GREEN *et al.*, 2012). These authors also verified the distribution of *KIR* allele frequency, and they showed a frequency around 20% for *KIR3DL2*001* in haplotype A, which is the same in our sample. A common telomeric haplotype region was depicted in a previous study (*KIR2DL4*008* - *KIR3DL1S1*3DL1*001* - *KIR2DS4*003* - *KIR3DL2*001*), showing high frequency of the allele *KIR3DL2*001*. It is known that in general, inhibitory loci, particularly framework genes, exhibit more allelic variability than the stimulatory loci. Since we are working with a framework gene, we observed a broad allelic variation, mostly regarding haplogroup B – in fact, *KIR3DL2* is the second most polymorphic gene in the locus (ROBINSON *et al.*, 2010).

After comparisons of cytotoxicity level reached by NK cells from individuals based on different allotypes, we verified that the allele *KIR3DL2*001* showed a decreased cytotoxicity (higher inhibition of cytotoxicity) when co-cultured with T cells presenting the ligands *HLA-A*03/A*011*, and the cytotoxicity was increased when *KIR3DL2*001* was co-culture in the absence of its ligands, thus being no longer significant statistically. We performed the assays in the presence and absence of *HLA -A*03* and *-A*11*, because previous studies showed

evidences that these alleles can bind to KIR3DL2 (POKRATH *et al.*, 2004). Also, regarding the strong linkage disequilibrium, we also analyzed the presence and absence of *KIR3DL1* and the cytotoxicity from assays in the presence and absence of its ligand, *HLA-Bw4*. We could conclude that *KIR3DL2*001⁺ KIR3DL1⁺* exhibited higher levels of cytotoxicity when co-cultures in the presence of its ligands.

To verify if this difference in cytotoxicity was haplotype dependent, we analyzed the individuals from haplogroup B, bearing the *KIR3DL2*001* and *KIR3DL1* in comparison with individuals within the same group, bearing different allotypes and in the absence of *KIR3DL1*. We reached a result where there was no significant difference in cytotoxicity between these individuals. In a first glance, we can suggest that the decreased cytotoxicity is not driven by the haplogroup configuration. In order to verify if the inhibiting effect was mostly caused by *KIR3DL2*, we used an anti-*KIR3DL2* antibody to block the receptor. We observed loss of the inhibition, and the overall cytotoxicity was increased for every individual test. This indicates the potential inhibitory power of *KIR3DL2*. But when we analyzed the individuals grouping the *KIR3DL2*001⁺ KIR3DL1⁺*, there were some interesting effects. We showed that even if a *KIR3DL2*001⁺* individual if co-cultured with T cells expressing its ligands, if there is an absence of *KIR3DL1*, the cytotoxicity won't be significative lower. This was observed in an individual from haplotype B (FIGURE 6). Also, we could verify that the number of activating and inhibiting genes may also have an impact in the cytotoxicity levels. After grouping the individuals by number of activating and inhibiting genes, we saw that those bearing only one activating gene presented a lower cytotoxicity compared to individuals with more activating genes.

This effect was also true when the assay was performed with the NK cells from PV patients. Patients bearing *KIR3DL2*001 KIR3DL1* genotype with only one activating gene in the cluster, was shown to be more effective in inhibition of cytotoxicity. When we merged the two groups (healthy donors and PV patients) to be analyzed together the same tendency was repeated.

Here we say that this potential inhibitory effect may be due at least in part to the presence of the genotype *KIR3DL2*001⁺ KIR3DL1⁺* in individuals with one activating genes from the haplogroup A or B. Although our results point to this direction, it is needed more data

to completely understand this effect. For example, there are several receptors, including other *KIR* being expressed on the surface of NK cells. If we analyze the data taking into account all the information we have about the overall *KIR* gene content, we can find some common points regarding the haplogroup A and the genotype *KIR3DL2*001/001*. By table 2, we can evidence the higher frequency of *001 allotype, and the absence of some genes: *KIR2DL2*, *KIR2DL5*, *KIR3DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3* and *KIR2DS5* in individuals from haplogroup A. If we compare the cytotoxicity level of an individual from haplogroup A (regardless of *KIR3DL2* alleles) with another individual from haplogroup B that share the same *KIR* gene content, we verify that the cytotoxicity level from the two individuals are different. They share the same *KIR* gene content, so the increased or decreased cytotoxicity may be caused by different *KIR* allotypes. In this case, we are specifically co-culturing the NK cells in the presence or absence of *KIR3DL2* ligands, so it makes sense that the different levels of cytotoxicity are somewhat caused by the presence of different *KIR3DL2* allotypes in combination with other *KIR*. Previous studies have shown that when two allotypes of *KIR3DL1* are challenged with the same HLA-Bw4 ligand, *KIR3DL1*002* was a stronger inhibitor than *KIR3DL1*007*. Surprisingly, this cytotoxicity effect is robust, despite the diversity of individuals *KIRs* expressed by each NK cell and overlapping subsets of NK cells based of *KIR* expression. Similarly, it is possible that other inhibitory receptors may contribute to this effect, such as CD94/NKG2A, or even receptors without *HLA* specificity such as NKRP1A. (CARR *et al.*, 2005)

When looking a little deeper at the *KIR3DL2*001* receptor, we may depict some important polymorphisms. The SNP 1190T causes an amino acid change (Thr375Met) in the cytoplasmic tail. No damage in the structure of the protein is noticed, but the physicochemical properties of these amino acids are different, as methionine is hydrophobic and threonine is neutral (AUGUSTO *et al.*, 2013 – manuscript in preparation). This may cause differences of affinity in protein interactions. But there is one important difference, that fact that only threonine may be phosphorylated by protein kinases in eukaryotic cells (BISHOP *et al.*, 2001). Although tyrosine phosphorylation has been known to be important for controlling both ITIM and ITAM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory and activating motifs, respectively) by recruiting the protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 (LANIER *et al.*, 2003 and

VIVIER *et al.*, 2004), the threonine phosphorylation is also reported as important for signal transduction in other molecules (MCCUBREY *et al.*, 2000 and LIU *et al.*, 2004). This amino acid replacement is adjacent to the tyrosine site located at the ITIM motif. Considering the importance of the phosphorylation regulating the KIR signaling and the proximity to the tyrosine site, this amino acid replacement may interfere in the receptor function. Taking into account these findings and the fact that a possible functional impact may be caused by the differences between threonine and methionine, we can suggest that this polymorphism may reduce the inhibitory function of the KIR3DL2 receptor (AUGUSTO *et al.*, 2013 – manuscript in preparation). Thus, individuals *KIR3DL2*001* lacking this SNP would present a higher inhibitory power.

It has already been described that KIR activating function, rather than the isolated receptors, could be the cause of the differential susceptibility for the disease pemphigus foliaceus (PF). AUGUSTO *et al.*, 2012 described that the activating *KIR* genes may have an overlapping effect in PF susceptibility and the presence of more than three activating genes was protective. These authors also recently found association of *KIR3DL2*001* with this disease (AUGUSTO *et al.*, 2013 – manuscript in preparation), and the hypothesis that *KIR3DL2*001* is a stronger inhibitor was suggested. Taken all these data, we can suggest that individuals bearing *KIR3DL2*001*, *KIR3DL1* and only one activating gene present a lower cytotoxicity response in the absence of the ligands for these genes. Here we have conducted several functional assays in order to verify and corroborate with this hypothesis.

Conclusion

We showed that NK cells bearing the receptor *KIR3DL2*001*, *KIR3DL1* and only one activating gene in the presence of its ligands HLA-A*03/A*011 and HLA-Bw4, exhibit a greater power of inhibition of cytotoxicity, when compared to other KIR allotypes and gene content. This inhibition is decreased in PV patients, but these individuals present an overall higher frequency of NK cells and a higher number of NK CD56^{bright} cell subtype, which may correlate with the increased levels of IL-6 and IFN- γ detected *in vitro*.

References

- AUGUSTO DG, LOBO-ALVES SC, MELO MF, PEREIRA NF, PETZL-ERLER ML. Activating KIR and HLA Bw4 Ligands Are Associated to Decreased Susceptibility to Pemphigus Foliaceus, an Autoimmune Blistering Skin Disease. **PLoS ONE**, 7. 2012
- BASHIROVA AA, MARTIN MP, MCVICAR DW, CARRINGTON M. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. **Annu Rev Genomics Hum Genetics** 7:277–300, 2006
- BISHOP AC, BUZKO O, SHOKAT KM. Magic bullets for protein kinases. **Trends in cell biology** 11, 167-72, 2001.
- BOEHM U, KLAMP T, GROOT M, HOWARD JC. Cellular responses to interferon-gamma. **Annu. Rev. Immunol.** 15, 749–795, 1997.
- BOWNESS P, KOLLNBERGER S, BRACKENBRIDGE S, FERNANDES R, CHAN A, HATANO, RYSNIK O, MCHUGH K, PIPER K, WONG-BAEZA I, RIDLEY A, SHAW J. KIR3DL2 Binds to HLA-B27 Dimers and Free H Chains More Strongly than Other HLA Class I and Promotes the Expansion of T Cells in Ankylosing Spondylitis. **J Immunol** 190:3216-3224, 2013.
- CHAPOVAL AI, NI J, LAU JS. B7–H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. **Nat Immunol**; 2:269–74, 2001.
- COOPER MA, FEHNIGER TA, CALIGIURI MA. The biology of human natural killer-cell subsets. **Trends in Immunology**. Vol 22, n 11, 2000.
- CARRINGTON M, MARTIN MP. The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease. **Curr Top Microbiol Immunol** 298:225–257, 2006.
- CARNAUD C, LEE D, DONNARS O, PARK SH, BEAVIS A, KOEZUKA Y, BENDELAC A. Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. **J. Immunol.** 163, 4647–4650. 1999.
- DALBETH N, GUNDLE R, DAVIES RJ, LEE YC, MCMICHAEL AJ, CALLAN MF. CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. **J Immunol**; 173:6418–26, 2004.
- GOURRAUD PA, MEENAGH A, CAMBON-THOMSEN A, MIDDLETON D. Linkage disequilibrium organization of the human KIR superlocus: implications for KIR data analyses. **Immunogenetics** 62: 729–740. 2010.

- HANNA J, GONEN-GROSS T, FITCHETT J. Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. **J Clin Invest**, 114:1612–23., 2004.
- HANSASUTA P, DONG T, THANANCHAI H, WEEKES M, WILLBERG C, ALDEMIR H. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. **European journal of immunology** 34, 1673-9, 2004.
- Hazeldine J, Lord JM. THE IMPACT OF AGEING ON NATURAL KILLER CELL FUNCTION AND POTENTIAL CONSEQUENCES FOR HEALTH IN OLDER ADULTS. **AGEING RES REV.** 2013.
- HSU KC, LIU XR, SELVAKUMAR A, MICKELSON E, O'REILLY RJ. 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: 5118–5129. 2002.
- HSU KC, CHIDA S, GERAGHTY DE, DUPONT B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. **Immunol Rev** 190: 40–52. 2002.
- KIM S, SUNWOO JB, YANG L, CHOI T, SONG Y, FRENCH AR, ANNA VLAHIOTIS A, JAY F, PICCIRILLO JF., MARINA CELLA M, MARCO COLONNA M, MOHANAKUMAR T, HSU KC, DUPONT B, YOKOYAMA M. HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency. **PNAS**, vol 105, no 8, 3053-3058.
- KISHIMOTO T, ISHIZAKA K. Regulation of antibody response in vitro. Suppression of secondary response by antiimmunoglobulin heavy chains. **J. Immunol.** 107:1567. 1971
- Kyoizumi S, Kubo Y, Kajimura J, Yoshida K, Imai K, Hayashi T, Nakachi K, Young LF, Moore MA, van den Brink MR, Kusunoki Y. AGE-ASSOCIATED CHANGES IN THE DIFFERENTIATION POTENTIALS OF HUMAN CIRCULATING HEMATOPOIETIC PROGENITORS TO T- OR NK-LINEAGE CELLS. **J IMMUNOL.** 2013.
- LANIER LL. NK cell receptors. **Annu. Rev. Immunol.** 16:359, 1998
- LIU J, PUSCHECK EE, WANG F, TROSTINSKAIA A, BARISIC D, MANIERE G. Serinethreonine kinases and transcription factors active in signal transduction are detected at high levels of phosphorylation during mitosis in preimplantation embryos and trophoblast stem cells. **Reproduction (Cambridge, England)** 128, 643 -54, 2004.
- MARTIN AM, FREITAS EM, WITT CS, CHRISTIANSEN FT. The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. **Immunogenetics** 51: 268–280, 2000.

- MARTIN AM, KULSKI JK, GAUDIERI S, WITT CS, FREITAS EM. Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. **Gene** 335: 121–131. 2004.
- MCCUBREY JA, MAY WS, DURONIO V, MUFSON A. Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K** 14, 9-21 2000.
- MIDDLETON D, MEENAGH A, GOURRAUD PA () KIR haplotype content at the allele level in 77 Northern Irish families. **Immunogenetics** 59: 145–158, 2007.
- HOU L, CHEN M, NG J, HURLEY CK. Conserved KIR allele-level haplotypes are altered by microvariation in individuals with European ancestry. **Genes Immun.** 2011.
- NAGLER, A. Constitutive expression of high affinity interleukin-2 receptors on human CD16⁺ natural killer cells *in vitro*. **J. Exp. Med.**, 171, 1527-1533.
- PARHAM P. NK cells, MHC class I antigens and missing self. **Immunol. Rev.** 155:221. 1997.
- PYO CW, GUETHLEIN LA, VU Q, WANG R, ABI-RACHED L. Different patterns of evolution in the centromeric and telomeric regions of group A and B haplotypes of the human killer cell Ig-like receptor locus. **PLoS One** 5: e15115, 2010.
- ROBINSON J, MISTRY K, MCWILLIAM H, LOPEZ R, MARSH SG. IPD – the Immuno Polymorphism Database. **Nucleic Acids Res.** Jan;38, D863-9. 2010.
- SHILLING HG, GUETHLEIN LA, CHENG NW, GARDINER CM, RODRIGUEZ R. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. **J Immunol** 168: 2307–2315, 2002
- TAKAHASHI H, AMAGAI M, TANIKAWA A. T helper type 2-biased natural killer cell phenotype in patients with pemphigus vulgaris. **J Invest Dermatol**; 127:324–30, 2007
- UHRBERG M, PARHAM P, WERNET P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. **Immunogenetics** 54: 221–229, 2002.
- VILCHES C, PARHAM P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. **Annu Rev Immunol.** ;20:217-51, 2002.
- VIVIER E, NUNES JA, VELY F. Natural killer cell signaling pathways. **Science** 306, 1517-9, 2004.

WILSON MJM, TORKAR A, HAUDE S, MILNE T, JONES D, SHEER S, BECK J, TROWSDALE. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 97:4778, 2000

6. DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho foi verificada a influência funcional de diferentes alelos de um mesmo gene KIR, na presença e ausência de seus ligantes *in vitro*. Para que este objetivo fosse alcançado, foi necessário um meticuloso planejamento no que se refere à viabilização do projeto. Sendo assim, antes de entrarmos na discussão dos resultados em si, seguem algumas considerações que foram levadas em conta para a condução do projeto.

O gene *KIR3DL2* foi escolhido como foco do trabalho devido a dois motivos principais: o fato de ser um gene de moldura, o que significa que está presente em todos os indivíduos; o fato de que em estudo anterior em nosso laboratório foi verificado que *KIR3DL2**001 pode apresentar características mais inibidoras quando comparado com outros alótipos (AUGUSTO *et al.*, 2013 – artigo em preparação). Atualmente estão surgindo evidências de que existem populações onde alguns indivíduos podem não apresentar este gene, porém isto é raríssimo. Devido ao fato de estar presente em praticamente todos os indivíduos, podemos mantê-lo como uma variável fixa em nossa amostra. Além disso, em estudos prévios em nosso laboratório, foi obtido um banco de dados com genotipagens de ausência e presença de todos os genes KIR de vários indivíduos, genotipagem alélica de *KIR3DL2* e *HLA* de classe I. Sendo assim, dispomos dos dados de conteúdo gênico de *KIR*, dados alélicos de *KIR3DL2* e dados alélicos de seu ligante, *HLA-A* e também de *HLA-B*.

Tendo em mãos estas informações, iniciou-se a procura de indivíduos que tivessem genótipos específicos e informativos para o trabalho, sendo assim, foi reunida uma amostra de 30 indivíduos saudáveis da população de Curitiba e 5 indivíduos pacientes de pênfigo vulgar. O tamanho amostral justifica-se pela dificuldade em alcançar os indivíduos e pelo fato de terem sido selecionados de acordo com seu perfil genotípico, serem relevantes e informativos.

Após a seleção dos indivíduos, foi iniciado o processo de obtenção do material biológico. Células NK e T foram isoladas de sangue periférico. Para cada indivíduo foram realizados testes de pureza em relação à quantidade de células obtidas e qualidade do isolamento. Para isso foi feita análise por citometria de fluxo de alíquotas de cada tipo celular isolado de todos os indivíduos. Após este processo, as células estariam prontas para cultivo,

porém, seria inviável realizar os ensaios de citotoxicidade neste momento, pois a coleta de material biológico dos 35 indivíduos foi realizada em diferentes momentos (devido a localização e disponibilidade dos doadores). Sendo assim, o material foi congelado e estocado devidamente para que fosse possível realizar todos os ensaios concomitantemente.

Após a coleta de células de todos os indivíduos a serem utilizados no projeto, descongelamos as células sua viabilidade foi analisada, sendo considerada viável, uma amostra que obtinha uma porcentagem de células vivas acima de 90%. O cultivo celular passou por vários testes de adaptação em relação ao número de células NK e T que desenvolvessem níveis de resposta detectáveis e satisfatórios para o ensaio de citotoxicidade e tempo de cultivo ótimo para a análise. Estes ensaios preliminares podem ser visualizados em respectivos gráficos nos materiais anexos. Após todo este processo de padronização, para que os testes de citotoxicidade fossem realizados com segurança em meio a tantas variáveis, lançamos mão de alguns controles. Além dos controles experimentais comuns sugeridos pelo fabricante do kit de citotoxicidade ROCHE (branco, controle positivo, controle negativo), utilizamos um controle criado especificamente para obter uma variável biológica máxima de citotoxicidade. Com posse dos dados de genotipagem alélica de *HLA* de classe I, selecionamos outros indivíduos que apresentassem genótipos diversos para *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*. As células T destes indivíduos foram isoladas e várias alíquotas contendo a mistura proporcional de células de cada indivíduo foram congeladas. Com isto, foi criado um *pool* de células T com uma amostra significativa de vários genótipos *HLA* de classe I da população de Curitiba. Chamamos este controle de *pool HLA*. Com ele, esperamos obter uma resposta biológica máxima nos ensaios de citotoxicidade, dessa forma sendo possível comparar o nível de citotoxicidade biológico máximo de determinado indivíduo com sua exclusiva combinação *KIR* na presença das células T do *pool HLA*.

Em nossas análises, observamos uma alteração significativa no número de células circulantes no sangue de indivíduos saudáveis e indivíduos com PV. Estes últimos exibem um maior número de células em relação aos indivíduos saudáveis. Isto foi observado em todos os 5 pacientes de PV. Estudos anteriores haviam demonstrado este aumento da frequência de células em infiltrados celulares nos locais de inflamação das lesões da pele de

pacientes (STERN *et al.*, 2008). Aqui verificamos o aumento de células como um todo em sangue periférico. Conjugando nossos dados com a literatura, podemos sugerir que o número aumentado de células em pacientes pode ser devido aos processos inflamatórios de PV, que leva a complexas interações células-células e eventos estimuladores que promovem a proliferação celular, seja no local da lesão como também, possivelmente, no sangue periférico. Após isolarmos os tipos celulares em questão, foi verificado que dentre a proporção dos subtipos de células NK obtivemos um aumento (15,9%) da população de células CD56^{bright} nos pacientes. Este subtipo celular é primariamente uma célula secretora de citocinas, o outro subtipo de NK, CD56^{dim}, envolvido em citotoxicidade celular em si, apresentou sua frequência reduzida em pacientes (84,1%). Indivíduos saudáveis, apresentaram uma proporção de CD56^{bright} / CD56^{dim} semelhante a literatura (10% e 90% do total de células NK circulantes, respectivamente). Devido ao fato de que pacientes de PV estão em constante estado inflamatório em suas lesões, sugere-se que o aumento de células CD56^{bright} seja devido em parte a interações com outras células, como monócitos, agindo de forma a manter os processos inflamatórios, já que este tipo celular é primariamente secretor de citocinas (DALBERTH *et al.*, 2004).

Nós selecionamos alguns ensaios de citotoxicidade que fossem relevantes, e reservamos parte do sobrenadante do meio após 4 dias de cultivo. Com este material foi realizada uma análise com o kit CBA (*Cytometric Bead Array*), onde foi possível visualizar o perfil de citocinas secretado pelas células em cultivo ao longo destes 4 dias. Uma análise prévia mostrou alterações entre o grupo dos pacientes e indivíduos saudáveis. Não foi observada diferença significativa de secreção diferencial de citocinas dentro do mesmo grupo, seja entre indivíduos saudáveis ou entre os pacientes com diferentes genótipos *KIR*. Ou seja, o genótipo e configuração *KIR* a princípio não está direcionando a resposta de secreção de citocinas. Entre dos dois grupos, porém, a diferença na secreção de IL-6 e IFN- γ é significativa. Indivíduos normais secretam algo em torno de $0,5 \times 10^3$ pg/ml de IL-6 e $0,8 \times 10^3$ pg/ml. Já os pacientes de pênfigo, apresentaram uma secreção média de $1,5 \times 10^3$ pg/ml de IL-6 e $1,8 \times 10^3$ pg/ml de IFN- γ . O aumento na produção destas citocinas pode ser relacionado com o número aumentado de células NK do subtipo que preferencialmente funciona como secretor de citocinas, CD56^{bright}. A IL-6 já foi associada com o

desenvolvimento de pênfigo vulgar e também está relacionada a estimulação de células B para produzir anticorpos. O IFN- γ também atua em diversos processos inflamatórios, sendo responsável por promover acúmulo de leucócitos, proliferação, maturação e diferenciação celular, além de potencializar a atividade de células NK e também promover produção de anticorpos e mudança de classe de imunoglobulinas (CARNAUD *et al.*, 1999). Por se tratar de uma doença autoimune com produção de anticorpos anti desmogleína, o aumento de IL-6 e IFN- γ podem estar contribuindo para a manutenção e desenvolvimento da patogênese de PV.

O conteúdo haplotípico de genes *KIR* foi historicamente dividido em dois grandes grupos. Os indivíduos classificados como dentro do haplogrupo A são definidos pela presença de *KIR2DS4* como único *KIR* ativador do grupo, em combinação com *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR2DP1* e *KIR3DP1* (SHILLING, *et al.*, 2002). O haplogrupo B encerra outros genes *KIR* inibidores, tais como *KIR2DL2* e *KIR2DL5*; e ativadores, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1* (UHRNBERG *et al.*, 2002). Nós verificamos que indivíduos pertencentes ao haplogrupo A apresentaram menor citotoxicidade quando comparado com indivíduos pertencentes ao haplogrupo B. Esta significativa diminuição de citotoxicidade foi observada quando comparada a lise celular geral entre os dois haplogrupos. Após uma melhor observação da amostra, foi verificado que dentro do haplogrupo A (que compõe cerca de 20% da amostra dos 30 indivíduos), verificamos grande concentração do alelo *KIR3DL2*001*, comparado com indivíduos do haplogrupo B. Ao analisarmos os resultados de citotoxicidade onde as células NK dos indivíduos eram expostas a células T que apresentavam ou não os ligantes para *KIR3DL2*, verificamos que existia significativa diminuição da citotoxicidade em comparação com os testes dos indivíduos do haplogrupo B na presença das mesmas células T. Ou seja, sugerimos que indivíduos do haplogrupo A, que certificadamente possuem maior concentração do alelo *KIR3DL2*001*, apresentam um maior efeito inibidor da citotoxicidade quando na presença do seu ligante, em relação a indivíduos do haplogrupo B. Este efeito protetor de citotoxicidade não deve ser somente devido ao alelo específico *KIR3DL2*001* mas também ao conjunto de interações dos outros genes *KIR* dentro do haplótipo. A diversidade entre os dois haplogrupos se dá tanto em conteúdo gênico quanto em variação

alélica, que é observada nas regiões telomérica e centromérica da região cromossômica, e um forte desequilíbrio de ligação é observado entre essas porções. Já foi sugerido que os haplótipos de *KIR* consistem de várias permutações das variantes centroméricas e teloméricas desta região gênica. Foi verificado por VIERRA-GREEN *et al.*, 2012, que o gene *KIR3DL2*, exibe cerca de 20% de frequência do alelo *001 dentro da população europeia, e um haplotipo telomérico foi designado como *KIR2DL4*008 - KIR3DL1S1*3DL1*001 - KIR2DS4*003 - KIR3DL2*001*. Isto indica a alta presença do alelo *KIR3DL2*001* em nossa amostra. Vale considerar que estudos prévios indicaram que a frequência dos genes *KIR* na população de Curitiba não diverge da frequência da população Européia (AUGUSTO *et al.*, 2012). Pelo fato de estarmos trabalhando com um gene inibidor, principalmente um gene de moldura, observamos uma ampla diversidade alélica. Isto pode ser constatado quando visualizamos o haplogrupo B, que exibe grande variação de alelos para o gene *KIR3DL2*, que é o segundo gene mais polimórfico do complexo. Genes *KIR* ativadores geralmente apresentam menor variação alélica.

Após compararmos os resultados de citotoxicidade promovido por células NK em combinação com diversos genótipos *HLA-A* de células T, verificamos que quando o ensaio era realizado na presença dos ligantes *HLA-A*03/A*011*, obtivemos uma menor citotoxicidade para indivíduos *KIR3DL2*001*. Esta alteração na citotoxicidade era dependente de alguns fatores tais como, presença ou ausência de um ou dois ligantes *HLA-A*03/A*11* e presença ou ausência do alelo *KIR3DL2*001*. Os estudos foram conduzidos na presença ou ausência destes ligantes, pois existem evidências que indicam que estes sejam os ligantes de *KIR3DL2* (POKRATH, *et al.*, 2004), sendo que nosso estudo corrobora com tais afirmações ao mostrar diferenças de citotoxicidade na presença ou ausência dos mesmos.

Sendo assim, também verificamos o efeito de citotoxicidade para o gene *KIR3DL1*, com os indivíduos novamente agrupados em haplogrupos, na presença e ausência de seu ligante. Observamos que assim como no teste para com os indivíduos *KIR3DL2*, obtivemos uma diminuição da citotoxicidade para os indivíduos do haplogrupo A.

A enorme variação e complexidade de *KIR* acaba por dificultar em muito o processo de análise dos resultados. Para focar no fato de que nossa resposta citotóxica diferenciada realmente se deve ao gene *KIR3DL2*, realizamos o mesmo ensaio utilizando anticorpos

bloqueando os receptores 3DL2. Nesta etapa foram utilizados controles específicos para possíveis variações causadas pela adição de anticorpo ao cultivo. Observamos que ao utilizarmos os anticorpos bloqueadores, na presença e ausência dos ligantes 2 HLA-A, acabamos por perder a significância dos dados e obtivemos uma citotoxicidade aumentada, ou seja, perdemos o efeito inibidor de KIR3DL2*001 que havíamos visualizado anteriormente. Isto indica que o receptor inibidor 3DL2 contribui para a proteção do efeito citotóxico.

Até este ponto, tudo indica que o poder inibidor do alótipo KIR3DL2*001 de indivíduos pertencentes ao haplotipo A é maior comparado a outros indivíduos. Porém podemos realmente afirmar isto? Existem muitas outras variáveis que não levamos em conta, como por exemplo, os outros receptores presentes nas células NK e os outros *KIR* que também desempenham seu papel frente a citotoxicidade. É possível que outros receptores inibidores de NK também contribuam para este efeito, tais como CD94/NKG2A, mas o efeito observado foi surpreendentemente forte apesar da diversidade de outros receptores expressos individualmente. Outros estudos também já demonstraram o efeito de um alelo específico, tal como o alótipo KIR3DL1*002 ser mais inibidor que KIR3DL1*007 na presença do ligante HLA-Bw4 (CARR *et al.*, 2005). O efeito de inibição da citotoxicidade fica bastante evidente quando conjugamos o maior número de variáveis, tais como indivíduos KIR3DL2*001, KIR3DL1 e número de genes ativadores e inibidores.

Outro fator importante que deve ser levado em conta nesta diferença da resposta citotóxica são possíveis SNPs. Ao trocar um aminoácido por outro, complicações podem surgir devido a alterações das propriedades físico químicas dos aminoácidos envolvidos. Isto pode trazer falhas na fosforilação e ativação ou inibição do receptor, levando a uma maior ou menor inibição. Sendo assim, SNPs podem contribuir para que um receptor se torne mais responsivo, em se tratando de um receptor inibidor, ele se tornaria mais inibidor quando apresentar tal polimorfismo.

Os mesmos testes de citotoxicidade também foram realizados para comparar os genótipos de indivíduos saudáveis e pacientes de PV. Encontramos evidências de que, apesar do padrão de citotoxicidade ser mantido para indivíduos saudáveis e pacientes com o mesmo genótipo de *KIR3DL2*, a resposta citotóxica é significativamente mais acentuada nos

pacientes que nos indivíduos saudáveis. O efeito protetor de KIR3DL2*001 na presença de KIR3DL1 e um gene aviador, também está presente nos pacientes de PV, porém, em escala menor. Isto indica mais uma vez processos alterados na patogênese de PV. As células NK estão diretamente envolvidas com processos citotóxicos, logo uma resposta diferenciada é aguardada em um ambiente tão complexo como o palco de ação de uma doença autoimune.

Após todos estes resultados ficam evidentes diferenças fenotípicas e funcionais das células NK tanto em indivíduos saudáveis quanto na patogênese de PV. Estudos posteriores ainda devem ser realizados, porém, fica claro que diferenças alélicas e o conteúdo gênico de *KIR* podem levar a efeitos acentuados em processos celulares, tais como a resposta citotóxica.

7. CONCLUSÕES

Pacientes de PV apresentam maior frequência de células em sangue periférico quando comparados com indivíduos saudáveis;

A proporção dos subtipos de células NK CD56^{bright} / CD56^{dim} está alterada em pacientes de PV, sendo aumentado o subtipo CD56^{bright} quando comparado com indivíduos saudáveis;

O perfil de secreção de citocinas em sobrenadante de meio de cultivo com células de pacientes de PV mostrou maior liberação de IL-6 e IFN- γ , independente de genótipo *KIR*;

A citotoxicidade de células NK de indivíduos do apresentam o alelo *KIR3DL2*001*, o gene *KIR3DL1* e apenas um gene ativador do complexo KIR é menor quando comparada com indivíduos que não possuem esta configuração, na presença dos ligantes HLA-A*03/A*11 e HLA-Bw4/Bw4;

Pacientes de pênfigo que possuem alelo *KIR3DL2*001* o gene *KIR3DL1* e apenas um gene ativador do complexo KIR apresentaram uma menor citotoxicidade quando comparado com outros pacientes que apresentavam outras configurações alélicas do mesmo gene.

Na comparação da citotoxicidade entre indivíduos saudáveis e pacientes de pênfigo com o mesmo genótipo *KIR3DL2* observa-se uma redução de citotoxicidade por células NK dos indivíduos saudáveis.

8. REFERÊNCIAS

- AHMAD R, TRAN P, XU J, AHMAD A, MENEZES J. Host's innate immune response to fungal and bacterial agents in vitro: up-regulation of interleukin-15 gene expression resulting in enhanced natural killer cell activity. **Immunology**. 109(2):263-70, 2003.
- ANDRE, P. et al. Modification of P-selectin glycoprotein ligand 1 with a natural-killer-cell-restricted sulfated lactosamine creates an alternate ligand for L-selectin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 97, 3400–3405, 2000.
- AUGUSTO DG, LOBO-ALVES SC, MELO MF, PEREIRA NF, PETZL-ERLER ML. Activating KIR and HLA Bw4 Ligands Are Associated to Decreased Susceptibility to Pemphigus Foliaceus, an Autoimmune Blistering Skin Disease. **PLoS ONE**, 7. 2012
- BALLAS, Z. K.; RASMUSSEN, W. L.; KRIEG, A. M. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. **Journal of immunology**, v. 157, n. 5, p. 1840- 5, 1 set 1996
- BAXTER, G. A.; MARTIN, M. P.; McVICAR, D.W.; CARRINGTON, M. The Killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: Tuning the genome defense. **Annual Reviews of Genomics and Human Genetics**, v. 7, p. 277-300, 2006.
- BAXTER, G. A.; SMYTH, M. J. The role of NK cell in autoimmune disease. **Autoimmunity**, v. 35, p. 1-14, 2002.
- BIRON, C. A.; NGUYEN, K. B.; PIEN, G. C.; COUSENS, L. P.; SALAZAR-MATHER, T. P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. **Annual review of immunology**, v.17, p. 189-220, jan 1999.

BIRON, C. A.; BROSSAY, L. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. **Current opinion in immunology**, v. 13, n. 4, p. 458-64, ago 2001.

CARNAUD C, LEE D, DONNARS O, PARK SH, BEAVIS A, KOEZUKA Y, BENDELAC A. Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. **J. Immunol.** 163, 4647–4650. 1999.

CARR, W. H.; PANDO, M. J.; PARHAM, P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. **Journal of immunology**, v. 175, n. 8, p. 5222-9, 15 out 2005.

COLUCCI, F.; DI SANTO, J. P. e LEIBSON, P. J. Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? **Nat Immunol**; 3:807-813; 2002.

COOPER MA, FEHNIGER TA, CALIGIURI MA. The biology of human natural killer-cell subsets. **Trends in Immunology**. Vol 22, n 11, 2000.

DALBETH N, GUNDLE R, DAVIES RJ, LEE YC, MCMICHAEL AJ, CALLAN MF. CD56^{bright} NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. **J Immunol**; 173:6418–26, 2004.

DUPONT, B.; SELVAKUMAR, A. e STEFFENS, U. The killer cell inhibitory receptor genomic region on human chromosome 19q13.4. **Tissue Antigens**; 49:557-563; 1997.

FARAG SS, FEHNIGER TA, RUGGERI L, VELARDI A, CALIGIURI MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. **Blood**. Sep 15;100(6):1935-47. Review. 2002.

FEHNIGHER, T. A.; SHAH, M. H.; TURNER, M. G. Differential cytokine and chemokine gene expansion by human NK cells following activations with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. **J Immunol**; 162:4511-20; 1999.

GRAEF, T.; MOESTA, A. K.; NORMAN, PAUL J; et al. KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A*11 while diminishing avidity for HLA-C. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 11, p. 2557-72, 26 out 2009.

GOMEZ-LOZANO, N.; GARDINER, CLAIR M.; PARHAM, P.; VILCHES, C. Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. **Immunogenetics**, v. 54, n. 5, p. 314-9, ago 2002.

HANNA J, GONEN-GROSS T, FITCHETT J. Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. **J Clin Invest**, 114:1612–23., 2004.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. *Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

JIAO, Y. L.; MA, C. Y.; WANG, L. C.; CUI, B.; ZHANG, J.; YOU, L.; CHEN, Z. J.; LI, J. F. e ZHAO, Y. R. Polymorphisms of KIRs gene and HLA-C alleles in patients with ankylosing spondylitis: possible association with susceptibility to the disease. **J Clin Immunol**; 28:343-349; 2008.

FLODSTROM, M.; SHI, F.-D.; SARVETNICK, N.; LJUNGGREN, H.-G. The natural killer cell -- friend or foe in autoimmune disease? **Scandinavian journal of immunology**, v. 55, n. 5, p. 432-41, maio 2002.

GONZALEZ-GALARZA, F. F.; CHRISTMAS, S.; MIDDLETON, DEREK; JONES, A. R. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic acids research*, v. 39, n. **Database issue**, p. D913-9, jan 2011.

- HANNA J, GONEN-GROSS T, FITCHETT J. Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. **J Clin Invest**, 114:1612–23., 2004.
- HANSASUTA P, DONG T, THANANCHAI H, WEEKES M, WILLBERG C, ALDEMIR H. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. **European journal of immunology** 34, 1673-9, 2004.
- ISAKOV, N. Role of immunoreceptor tyrosine-based activation motif in signal transduction from antigen and Fc receptors. **Advances in immunology**, v. 69, p. 183-247, jan 1998.
- KHAKOO, S I; RAJALINGAM, R; SHUM, B. P. et al. Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans. **Immunity**, v. 12, n. 6, p. 687-98, jun 2000.
- KHAKOO, S. I.; CARRINGTON, M. KIR and disease: a model system or system of models? **Immunological reviews**, v. 214, p. 186-201, dez 2006.
- KELLEY, J.; TROWSDALE, J. Features of MHC and NK gene clusters. **Transplant Immunology**, v. 14, p. 129-134, 2005.
- KIKUCHI-MAKI, A.; YUSA, S.-ICHI; CATINA, T. L.; CAMPBELL, K. S. KIR2DL4 is an IL-2 regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production. **Journal of immunology**, v. 171, n. 7, p. 3415-25, 1 out 2003.
- LANIER LL. NK cell receptors. **Annu. Rev. Immunol.** 16:359, 1998
- LEVINSON, R. D.; DU, Z.; LUO, L.; HOLLAND, G. N.; RAO, N. A.; REED, E. F. e RAJALINGAM, R. KIR and HLA gene combinations in Vogt-Koyanagi-Harada disease. **Hum Immunol**; 69:349-353; 2008.

LJUNGGREN, H. G.; OHLEN, C.; HOGLUND, P.; FRANKSSON, L.; KARRE, K. The RMA-S lymphoma mutant; consequences of a peptide loading defect on immunological recognition and graft rejection. **International journal of cancer**, v. 6, p. 38-44, jan 1991.

LONG, E O. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. **Annual review of immunology**, v. 17, p. 875-904, jan 1999.

KALINSKI P, GIEMASZ A, NAKAMURA Y, BASSE P, STORKUS WJ, KIRKWOOD JM, MAILLIARD RB. Helper role of NK cells during the induction of anticancer responses by dendritic cells. **Mol Immunol**;42(4):535-9. Review. 2005

Martin MP, Bashirova A, Traherne J, Trowsdale J, Carrington M. Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over. **J Immunol**, 1;171(5):2192-5, 2003.

MORETTA, A.; VITALE, M.; BOTTINO, C. et al. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. **The Journal of experimental medicine**, v. 178, n. 2, p. 597-604, 1 ago 1993.

NAGLER, A. Constitutive expression of high affinity interleukin-2 receptors on human CD16⁺ natural killer cells invitro. **J. Exp. Med**, 171, 1527-1533.

ORTONNE, N.; GOUVELLO, S. LE; MANSOUR, H. et al. CD158K/KIR3DL2 transcript detection in lesion skin of patients with erythroderma is a tool for the diagnosis of Sezary syndrome. **The Journal of investigative dermatology**, v. 128, n. 2, p. 465-72, fev 2008.

PARHAM, P.; MCQUEEN, K. L. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. Nature reviews. **Immunology**, v. 3, n. 2, p. 108-22, fev 2002

- PARHAM, P. Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. **Molecular immunology**, v. 42, n. 4, p. 459-62, fev 2005.
- POLI, A.; MICHEL, T.; THÈRESINE, M.; ANDRÈS, E.; HENTGES, F.; ZIMMER, J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. **British Society of Immunol.** 126:458-465, 2008.
- ROBINSON J, MISTRY K, MCWILLIAM H, LOPEZ R, MARSH SG. IPD – the Immuno Polymorphism Database. **Nucleic Acids Res.** Jan;38, D863-9. 2010.
- Sandra Andersson, Cyril Fauriat, Jenny-Ann Malmberg, Hans-Gustaf Ljunggren and Karl-Johan Malmberg KIR acquisition probabilities are independent of self-HLA class I ligands and increase with cellular KIR expression. **Blood**, 114: 95-104, 2009.
- SELVAKUMAR, A.; STEFFENS, U.; PALANISAMY, N.; CHAGANTI, R. S. e DUPONT, B. Genomic organization and allelic polymorphism of the human killer cell inhibitory receptor gene KIR103. **Tissue Antigens**; 49:564-573; 1997.
- SINGLE, R. M.; MARTIN, M. P.; GAO, X.; MEYER, D.; YEAGER, M.; KIDD, J. R.; KIDD, K. K. e CARRINGTON, M. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. **Nat Genet**; 39:1114-1119; 2007.
- SIVORI, S.; FALCO, M.; MORETTA, L.; MORETTA, A. Extending killer Ig-like receptor function: from HLA class I recognition to sensors of microbial products. **Trends in immunology**, v. 31, n. 8, p. 289-94, ago 2010.
- SUZUKI, N. et al. Evidence for the involvement of CD56 molecules in alloantigen-specific recognition by human natural killer cells. **J. Exp. Med.** 173, 1451–1461, 1991.

TROWSDALE, J; BARTEN, R.; HAUDE, A. et al. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. **Immunological reviews**, v. 181, p. 20-38, jun 2001.

UHRBERG, M; VALIANTE, N. M.; SHUM, B. P. et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. **Immunity**, v. 7, n. 6, p. 753-63, dez 1997.

UHRBERG M, PARHAM P, WERNET P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. **Immunogenetics** 54: 221–229, 2002.

VALIANTE, N. M.; PARHAM, P. Natural killer cells, HLA class I molecules, and marrow transplantation Biology of blood and marrow transplantation: **Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 3, n. 5, p. 229-35, nov 1997.

VIERRA-GREEN C, ROE D, HOU L, HURLEY CK, RAJALINGAM R, REED E, LEBEDEVA T, YU N, STEWART M, NOREEN H, HOLLENBACH JA, GUETHLEIN LA, WANG T, SPELLMAN S, MAIERS M. Allele-level haplotype frequencies and pairwise linkage disequilibrium for 14 KIR loci in 506 European-American individuals. **PLoS One**.;7(11):e47491. doi: 10.1371/journal.pone.0047491. Epub 2012 Nov 5. 2012

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

VIVIER E, NUNES JA, VELY F. Natural killer cell signaling pathways. **Science** 306, 1517-9, 2004.

VIVIER, E.; RAULET, D. H; MORETTA, A. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**, v. 331, n. 6013, p. 44-9, 7 jan 2011.

VOSSHENRICH CA, LESJEAN-POTTIER S, HASAN M, RICHARD-LE GOFF O, CORCUFF E, MANDELBOIM O, DI SANTO JP. CD11cIb220+ interferon-producing killer dendritic cells are activated natural killer cells. **J Exp Med**. 2007 Oct 29;204(11):2569-78. Epub 2007 Oct 8.

WARREN, H S. NK cell proliferation and inflammation. **Immunology and cell biology**, v. 74, n. 5, p. 473-80, out 1996.

WILSON MJM, TORKAR A, HAUDE S, MILNE T, JONES D, SHEER S, BECK J, TROWSDALE. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 97:4778, 2000

DONG Z, ZHANG C, WEI H, SUN R, TIAN Z. Impaired NK cell cytotoxicity by high level of interferon-gamma in concanavalin A-induced hepatitis. **Can J Physiol Pharmacol**. Nov;83(11):1045-53. 2005.

WONG-BAEZA I, RIDLEY A, SHAW J, HATANO H, RYSNIK O, MCHUGH K, PIPER C, BRACKENBRIDGE S, FERNANDES R, CHAN A, BOWNESS P, KOLLNBERGER S. KIR3DL2 binds to HLA-B27 dimers and free H chains more strongly than other HLA class I and promotes the expansion of T cells in ankylosing spondylitis. **J Immunol**. 1;190(7):3216-24, 2013.

YOKOYAMA, W. M. Natural killer cell receptors. **Curr Opin Immunol**; 10:298-305; 1998.

ZINKERNAGEL, R. M.; DOHERTY, P. C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. **Nature**, v. 248, n. 450, p. 701-2, 19 abr 1974.

9. APÊNDICE

9.1 DETALHAMENTO DE MATERIAS E MÉTODOS

9.2 AMOSTRAS POPULACIONAIS E OBTENÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras de sangue periférico de doadores foram obtidas através de seleção de indivíduos genotipados em trabalhos anteriores no laboratório, conhecendo-se os genótipos *KIR* e *HLA* de determinados indivíduos. Sendo assim, foi recoletado sangue de 30 indivíduos cujos genótipos eram de interesse para o estudo e 5 pacientes de pênfigo vulgar. Foram coletados 50 ml de sangue de cada doador. Este volume de sangue justifica-se pela pequena quantidade de células NK presentes no sangue periférico, cerca de 10% a 15% dos linfócitos totais (BIRON et al., 1999; BIRON e BROSSAY, 2001). Os pacientes de pênfigo vulgar foram coletados no Hospital Adventista do Pênfigo, em Campo Grande, MT. Todos os pacientes foram diagnosticados por testes clínicos e laboratoriais, entre os quais podem ser citados histopatologia e imunohistoquímica.

9.3 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

Amostras de sangue periférico de doadores foram coletadas em tubos contendo heparina. O sangue foi diluído na proporção de 1:1 com solução salina fosfatada (PBS) pH 7,4. Foram adicionados 10 ml desta mistura, de forma lenta e gradual em frascos contendo 3 ml da solução de Ficoll Hypaque com densidade de 1,077g/ml.

Os tubos foram submetidos a três centrifugações, a primeira foi realizada a 2000 rpm (400 G) por 30 minutos, sendo obtida uma camada rica de leucócitos. Esta foi retirada do frasco com auxílio de pipeta Pasteur estéril e transferida para outro tubo. As demais centrifugações foram feitas a 3500 rpm (500 G) por 5 minutos para lavagem das células mononucleares e eliminação das plaquetas. A solução usada nas lavagens era PBS. Após a

última lavagem foi realizada a contagem de células em câmara de Neubauer, verificando-se o número total de células. Além disso, também foi feita a verificação da viabilidade celular através do reagente Azul de Trypan (0,1%) que é um corante vital, excluindo as células com membrana comprometida (são consideradas ideais, para o uso quando a viabilidade é igual ou superior a 90%).

9.4 ISOLAMENTO DE CÉLULAS NATURAL KILLER E LINFÓCITOS CD3⁺ COM ESFERAS MAGNÉTICAS

As células mononucleares serão novamente centrifugadas a 3500 rpm durante 5 minutos e ao sedimento celular foi adicionado tampão (solução salina fosfatada livre de Ca⁺² e Mg⁺² contendo soro bovino fetal a 0,5%, EDTA 0,01%) e uma mistura de anticorpos complexados a esferas magnéticas, para seleção positiva das células de interesse. A suspensão foi homogeneizada e incubada a 4°C durante 15 minutos. Após o período de incubação, foi acrescentado o tampão e foi feita centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi vertido e o sedimento celular ressuspenso em tampão. Colunas LS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) para separação celular, foram equilibradas com 3 mL de tampão. A suspensão celular foi adicionada à coluna e ligada a um campo magnético. A coluna ainda acoplada ao campo magnético foi lavada com 3 mL de tampão, 3 vezes. As células que passaram livremente pela coluna foram armazenadas, pois a grande maioria destas células são células NK. Para a obtenção dos linfócitos CD3, a coluna foi desacoplada do campo magnético e transferida para um tubo estéril de 15 mL, onde foi lavada com 5 mL de tampão, com pressão de um embolo que para liberar as células antes ligadas à coluna. Após este passo, foi realizada uma nova passagem da fração negativa (que contem as células que não ficaram presas à coluna) em uma coluna do tipo LD. Este passo se justifica devido a existência de células NKT que configuram-se como CD56⁺CD3⁺. Com este passo a mais, asseguro uma maior pureza da fração final de células NK,

Após, a suspensão celular contendo a fração negativa foi também selecionada com o auxílio de esferas magnéticas trocando-se apenas os anticorpos acoplados às esferas

magnéticas por anticorpos contra CD56. Após a seleção positiva, as mesmas serão centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos. Frações de cada indivíduo foram separadas para determinação da viabilidade com corante azul de Trypan e quantificação celular em câmara de Neubauer.

9.5 VERIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após o isolamento das células era necessário verificar o grau de pureza das alíquotas celulares, ou seja, verificar se as células obtidas realmente eram as células desejadas. Para tanto, alíquotas das suspensões que foram isoladas foram analisadas por citometria de fluxo.

As células foram lavadas com PBS, centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. As células foram então ressuspensas e incubadas com anticorpo primário específico. Para as células NK foi feita incubação com anticorpos anti-CD56 e anti-CD16 para linfócitos T será realizada incubação com anticorpos anti-CD3. As células foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Caso fosse necessário, poderiam ser fixadas com solução de paraformaldeído 4% em solução salina por 30 minutos. Após, foi feita lavagem das células com PBS e centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em PBS estéril para leitura no citômetro de fluxo FACSVerse (BD Bioscience).

9.6 CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

A suspensão de células isoladas foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos, e o botão celular foi ressuspensado em 800 µl de solução de congelamento (40% meio RPMI 1640, 50% soro fetal bovino e 10% DMSO) para cada criotubo. Este passo foi realizado em banho de gelo e todas as soluções geladas.

Foram congeladas no mínimo 1×10^6 células em cada criotubo devido à perda de viabilidade que ocorre naturalmente pelo processo de congelamento e descongelamento.

O congelamento foi feito gradualmente, sendo que os tubos contendo as suspensões de células permaneceram por 2 horas em freezer a -20°C , após foram passadas para o freezer com temperatura de -70°C por um período de 24h e somente então foram acondicionadas em nitrogênio líquido.

Para o descongelamento, os tubos contendo as células foram retirados do nitrogênio e imediatamente colocados em banho maria a 37°C , de modo que somente reste uma pequena porção de gelo na suspensão celular. Em seguida, a suspensão foi ressuspensa em 10mL de meio de cultura RPMI 1640 e centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, as células foram novamente ressuspensas em meio RPMI com adição de 10% de soro fetal bovino.

Foi feita a contagem das células em câmara de Neubauer e teste de viabilidade celular com uso solução de Azul de Tripán.

9.7 CULTIVO DAS CÉLULAS

As células NK e linfócitos T foram mantidas em placas de 96 poços para realização dos ensaios, em incubadora umidificada a 37°C numa atmosfera de 5% de CO_2 . As células foram cultivadas em 300 μL meio RPMI 1640, por poço, com 10% de soro fetal bovino. Foram adicionados ao meio 100U/ml de penicilina e 100U/ml de estreptomicina.

9.8 COCULTURA DE CÉLULAS NK E LINFÓCITOS PERIFÉRICOS

Após a obtenção das populações de células purificadas e determinação da viabilidade celular, foi feito o ajuste da concentração da suspensão celular, aproximadamente $2,5 \times 10^4$ células NK e 5×10^5 células T foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços, em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, por 4 dias. As placas foram incubadas a 37°C , com atmosfera de 5% de CO_2 .

9.9 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE DE DIFERENTES GENÓTIPOS KIR ANTE DIFERENTES GENÓTIPOS HLA

Diferentes combinações de células NK e linfócitos T com diferentes genótipos foram cocultivados em placas. Células alvo estimularam as células NK para a lise celular ou não. A análise de citotoxicidade foi feita por quantificação colorimétrica da morte e lise celular, baseada na mensuração da atividade da lactato desidrogenase (LDH), que foi secretada do citosol de células danificadas para o sobrenadante do cultivo. Sendo assim, as células foram removidas do sobrenadante de cada variável, sendo este incubado com o kit de detecção de citotoxicidade (ROCHE). Sabe-se que o aumento da atividade da enzima LDH, em cultura, está correlacionado com o número de células lisadas. A atividade da LDH é determinada pela reação de redução do sal de tetrazólio em formazana, sendo mensurada a absorbância a 500nm. Sendo assim, quanto maior o número de células lisadas, maior a atividade da LDH o que acarretará em maior formação de cristais de formazana, resultando em uma leitura alta de abosorbância.

9.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS NOS SOBRENADANTES DE CULTURA

Este ensaio consiste em determinar a concentração de citocinas em amostras de pequeno volume com o auxílio de microesferas fluorescentes utilizando citometria de fluxo – CBA (*Cytometric Bead Array*). Foi utilizado o *Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (Becton, Dickinson and Company), que quantifica a concentração de IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4, IL-2, e IL-17. Os sobrenadantes obtidos nos experimentos de cocultivo foram centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos, a 4°C, para coleta de sobrenadantes livres de células. Quando necessário, os sobrenadantes foram diluídos com solução de diluição inclusa no *kit*, seguindo-se o armazenado em tubos utilizados para citometria de fluxo até a adição dos demais reagentes. Paralelamente, as citocinas recombinantes presentes na forma liofilizada no *kit* foram reconstituídas, 15 minutos antes da utilização, com 200 μ L da solução de

diluição, obtendo-se solução 10X concentrada. O tubo contendo citocinas reconstituídas permaneceu em repouso por pelo menos 15 minutos. Durante esse período, foi homogeneizado suavemente em intervalos de 3 minutos. Uma diluição seriada foi realizada na proporção 1:1 iniciando-se a diluição com 5.000 pg/mL e finalizando com 5 pg/mL. Em seguida, foi preparado um *pool* contendo as microesferas fluorescentes ligadas a anticorpos contra citocinas. Foram adicionados 21 μ L da suspensão de microesferas (3 μ L de cada microesfera) a cada 25 μ L de cada amostra avaliada e a 25 μ L de cada concentração da curva padrão. As amostras contendo os diferentes sobrenadantes e as microesferas foram incubadas durante 3 horas, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido o período de incubação, 500 μ L do tampão de lavagem foi adicionado a cada tubo, procedendo-se centrifugação a 3000 rpm, durante 5 minutos, a 18°C. Os sobrenadantes foram descartados, seguindo-se a adição de 100 μ L de tampão de lavagem para cada tubo. A leitura do ensaio foi realizada no citômetro de fluxo (FACSVerse) de acordo com as instruções do fabricante. Primeiramente, foram adquiridas as amostras referentes à curva da concentração de citocinas e, na sequência, as amostras experimentais. Foram adquiridos 2.100 eventos (300 microesferas de cada fluorescência). A análise dos dados foi realizada utilizando-se software FACSArray (BD Bioscience), por meio da obtenção de curvas de calibração obtidas com os padrões de citocinas do *kit*. Após a construção das curvas, a concentração das amostras foi determinada em pg/mL, a partir dos valores obtidos na leitura referentes à Intensidade Média de Fluorescência (MFI).

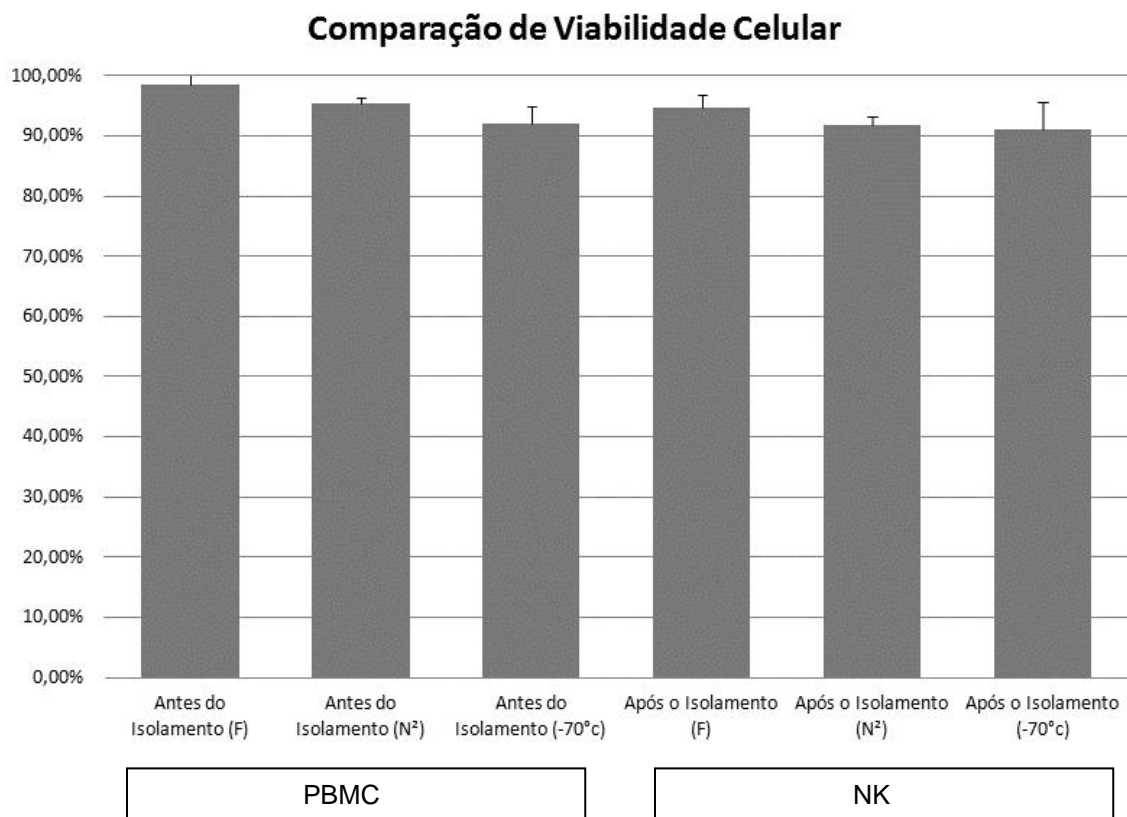
9.11 GENÓTIPOS DOS INDIVÍDUOS INCLUÍDOS NA AMOSTRA

Indivíduo	3DL2		HLA-A		HLA-B		HLA-C	
1	002	002	26	33	39:05	58:01	03:02	07:02
2	005	005	01:01	30:01	13:02	57:01	06	06
3	007	007	24	29	07:02	07:02	07:02	07:02
4	003	005	03:01	24:02	35:03	51:01	02:02	04:01
5	009	009	25	25	07:02	18:01	07:02	12:03
6	002	008	02	23	49:01	51:01	02:02	07:01
7	003	008	02	02	45:02	51:01	02:02	06:02
8	001	002	02:01	03:01	38:01	44:02	03	07:01
9	001	002	24	30	35:03	52:01	12:02	16:01
10	002	011	01	02	08:01	27:03	01:02	07:01
11	002	007	02:01	02:01	35:03	40	03:04	12:03
12	001	001	24	68	24:02	68:01	01	03
13	003	007	01:01	03:01	08:01	55:01	03	07:01
14	007	010	24:02	24:02	18:01	35:02	04:01	07:01
15	002	001	29	32	35:02	44:02	04:01	07:04
16	003	007	02	02	18:01	57:01	02:02	06:02
17	001	001	03:01	68:01	08:01	27:05	01:02	07:01
18	007	007	11:01	24:02	59:01	67:01	07:02	12:03
19	002	002	11:01	24:02	59:01	67:01	03:02	07:02
20	005	005	26	33	39:05	58:01	03:02	07:02
21	007	007	11:01	24:02	59:01	67:01	07:02	12:03
22	001	005	01:01	03:01	08:01	55:01	03	07:01
23	007	009	26	33	39:05	58:01	03:02	07:02
24	001	002	03:01	24:02	35:03	51:01	02:02	04:01
25	001	003	02	23	49:01	51:01	02:02	07:01
26	005	005	11:01	24:02	15:01	52:01	07:01	07:02
27	003	003	03	01:01	08:01	39:01	07:01	12:03
28	001	001	02:01	30:02	13:02	15:18	07:04	08:04
29	009	009	31:01	32:01	14:02	51:01	03	16:01
30	007	007	01	02	35:03	40	01:02	07:01

9.12 GENÓTIPOS DOS INDIVÍDUOS INCLUÍDOS NO POOL DE HLA

Indivíduo	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
1	29:02	31:01	15:01	39	02:02	03:03
2	02:05	30:01	42:01	49:01	07:01	17:01
3	01:01	02:05	08:01	49:01	07:01	07:01
4	01:01	02:01	08:01	18:01	05:01	07:01
5	02:01	03:01	35:01	40:01	03:04	04:01
6	02:01	68:01	07	48	04:01	07:02
7	03:01	24:02	35:03	51:01	02:02	04:01
8	24:02	68:01			01:02	03:04
9	01:01	03:01	08:01	55:01	03	07:01
10	02:11	23:01	44:03	48:02	04:01	04:01
11	31:01	32:01	14:02	51:01		
12	02:01	30:02	13:02	15:18	07:04	08:04
13	01:01	30:02	08:01	58:01	03	07:01
14	03:01	11:01	38:01	49:01	07:01	12:03
15	24:02	68:01			01:02	03:04
16	01:01	03:01	08:01	55:01	03	07:01
17	02:11	23:01	44:03	48:02	04:01	04:01
18	01:01	03:01	08:01	08:01	07:01	07:01
19	03:01	68:01	08:01	27:05	01:02	07:01
20	01:01	68:01	27:05	38:01	01:02	12:03

9.13 VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR



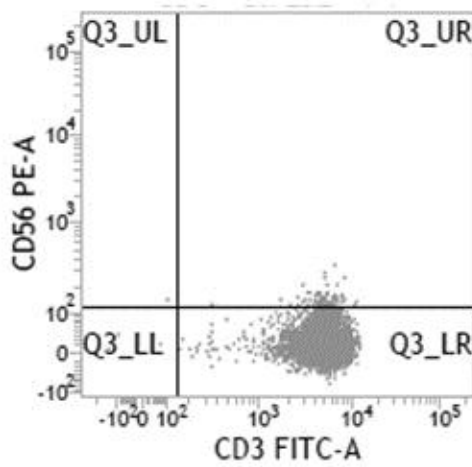
(F) – células frescas

(N₂) – células congeladas em nitrogênio líquido

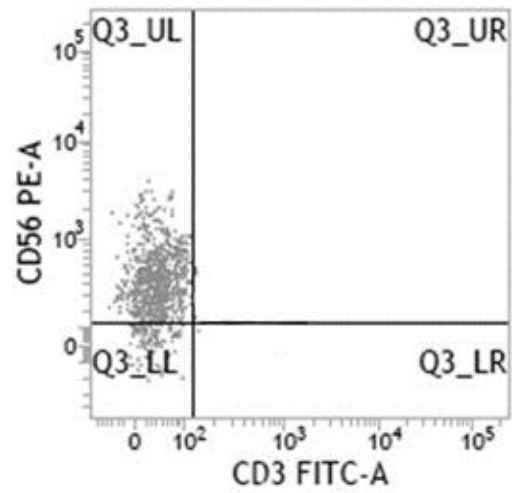
(-70°C) – células congeladas em freezer -70°C

9.14 EXEMPLO DE VERIFICAÇÃO DA PUREZA DE CÉLULAS NK E T

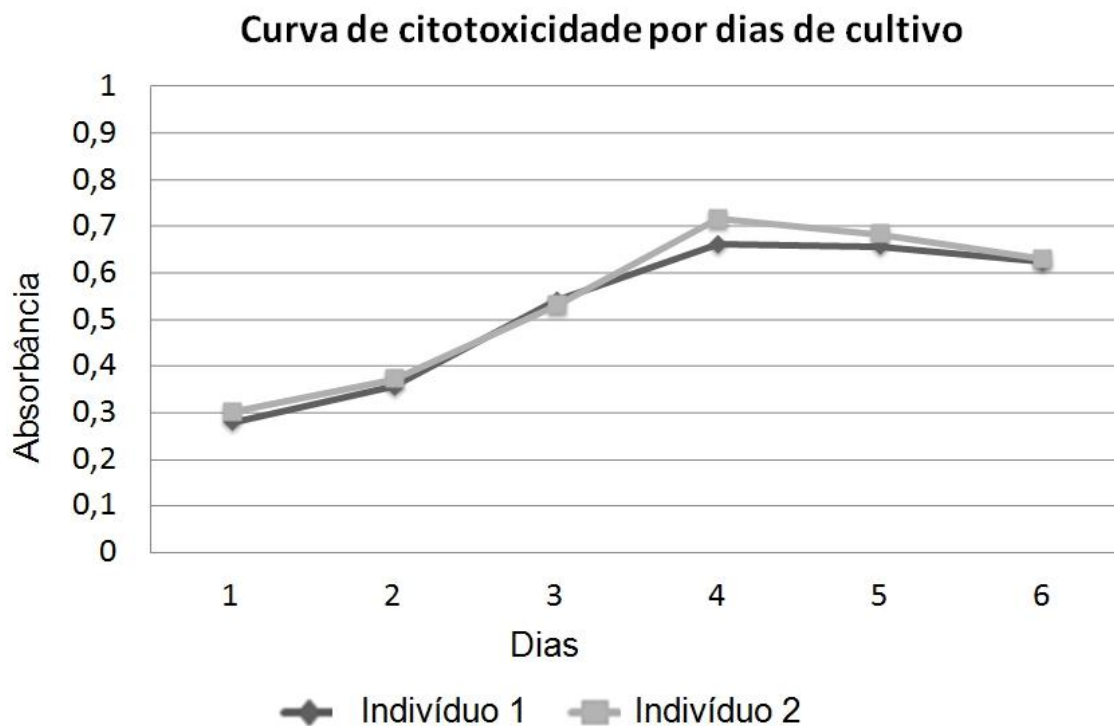
TCD3 = 95,74% pureza



NK = 93,58% pureza

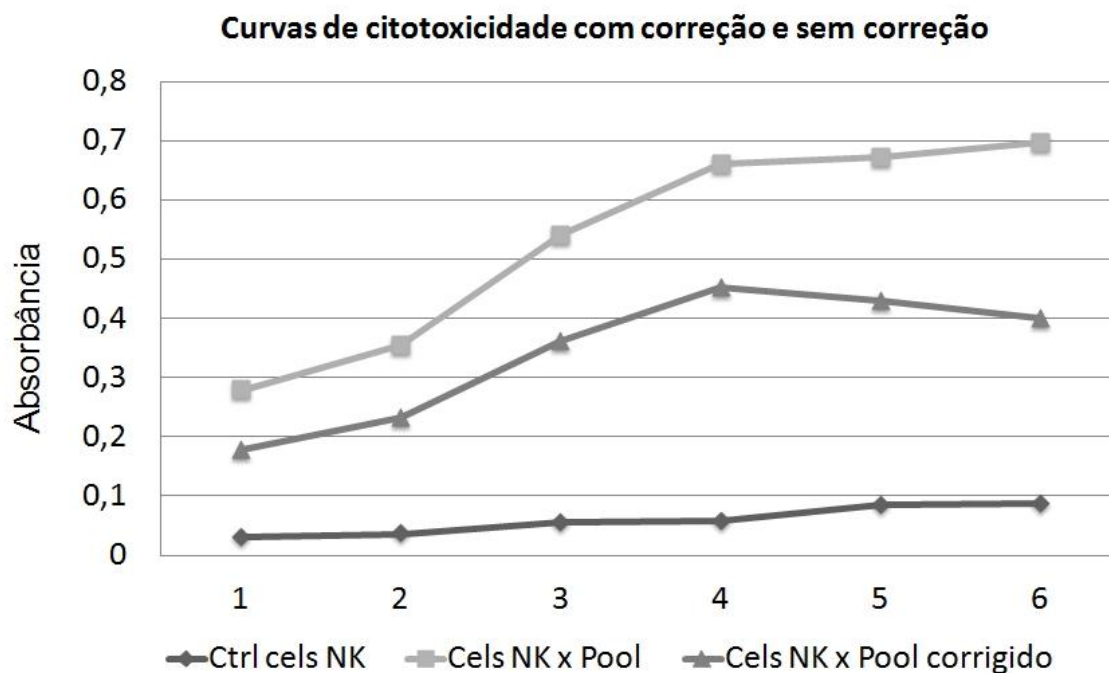


9.15 PADRONIZAÇÃO E CINÉTICA DO CULTIVO CELULAR



Através da padronização do cultivo foi possível verificar qual seria a quantidade de dias que as células dos ensaios de citotoxicidade deveriam permanecer em cultivo para que fosse possível detectar níveis consideráveis de LDH (proteína presente no sobrenadante e mensurada pelo ensaio de citotoxicidade). De acordo como gráfico, conseguimos uma curva, onde o pico máximo de citotoxicidade se dá em torno do quarto dia de cultivo, que foi o adotado para os ensaio.

9.16 CORREÇÃO DO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE



Nos ensaios de citotoxicidade utilizados o um kit de detecção da Roche. Este kit sugere que sejam utilizados alguns controles para correção da citotoxicidade mensurada. Estes controles se referem a uma padronização da liberação de LDH espontânea pelas células alvo e células efectoras, além de corrigir a citotoxicidade de todos os testes de acordo com um controle para liberação máxima de LDH. Neste caso utilizamos o pool de células T como nosso padrão de máxima liberação biológica.

ANEXO I

PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO

- 1) Sangue deve estar a temperatura ambiente; PBS deve estar a temperatura ambiente.
- 2) Centrifugar o sangue no próprio tubo de coleta a 1500 rpm por 10 min para formação de buffy coat.
- 3) Retirar excesso de plasma com cuidado para não sugar células, até mais ou menos 0,5cm acima da linha do buffy coat.
- 4) Retirar as células e transferir o sangue para um tubo falcon; não é necessário recolher as hemácias.
- 5) Adicionar 2 a 4 vezes de PBS 1X ao volume de sangue (para 40mL de sangue, 100mL de PBS 1X);
- 6) Homogeneizar bem;
- 7) Adicionar a solução de sangue + PBS lentamente e com muito cuidado sobre a solução de Ficoll aliqüotada em tubo falcon (para cada 140mL de solução, 40mL de Ficoll);
- 8) Centrifugar por 30 min a 2000 rpm (corresponde aproximadamente a 400 G);
Obs.: centrifugação a temperatura ambiente e com freios desligados.
- 9) Retirar a fase correspondente ao plasma diluído a partir da superfície, parando cerca de 0,5 cm antes do anel de PBMC;
- 10) Retirar a fase com plasma diluído (0,5cm) + anel de PBMC com cuidado para não pegar hemácias, transferindo a fase para um tubo falcon novo de 50mL;
- 11) Lavar com PBS 1X, completando até 50mL e homogeneizar bem;
- 12) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm (a partir daqui, refrigerar centrífuga entre 4 e 8°C e religar freios);
- 13) Aspirar sobrenadante e ressuspender *pellet* em volume pequeno de PBS 1X;
- 14) Ressuspender em 10mL de PBS 1X e retirar uma alíquota para contagem (50µL), uma para verificação de viabilidade (100µL) e 300 mil células para verificação de pureza no citômetro;

- 15) Completar logo em seguida até 50mL para finalizar 2^a lavagem;
- 16) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm;
- 17) Aspirar sobrenadante e, se necessário, retirar o que restar com auxílio de micropipeta com cuidado para não aspirar células.

ANEXO IIPROTOCOLO PARA ISOLAMENTO DE CÉLULAS CD56⁺ e CD3⁺

- 1) Ressuspender *pellet* em 80µL de solução de enxágue MACS para cada 10⁷ (10 milhões) células em tubo falcon de 14mL;
- 2) Adicionar 20µL de beads magnéticos CD3 para cada 10⁷ células;
- 3) Homogeneizar bem;
- 4) Incubar por 15 min entre 4 e 8°C
- 5) Lavar com 1 a 2mL de solução de enxágue MACS para cada 10⁷ células;
- 6) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm;
- 7) Aspirar sobrenadante e ressuspender até 10⁸ células em 1mL de solução de enxágue MACS;
Obs.: cuidar para não formar bolhas, pois esta solução será usada na coluna. Se houver grumos de células, retirá-los.
- 8) Posicionar a coluna no magneto;
- 9) Hidratar a coluna LS com 3mL de solução de enxágue MACS;
- 10) Assim que parar de gotejar, aplicar a amostra na coluna;
- 11) Quando a amostra terminar de passar, lavar 5 vezes com 3mL de solução de enxágue MACS, sempre esperando parar de gotejar para iniciar nova lavagem;
- 12) Para melhorar pureza, retirar cuidadosamente última gota fazendo uso do êmbolo;
- 13) Retirar a coluna do magneto e adicionar 5mL de solução de enxágue MACS;
- 14) Colocar o êmbolo e empurrar para retirar as células retidas na coluna, que são as células de interesse;
Obs.: antes de empurrar o êmbolo, deixar escorrer cerca de 1mL para que as células se soltem um pouco da coluna, diminuindo o estresse mecânico que poderia ativá-las.
- 15) Retirar o êmbolo, colocar mais 2mL de solução de enxágue MACS e empurrar novamente;
- 16) Retirar uma alíquota de 50µL para a contagem (fator de diluição: 7 mL), 200 mil células CD3⁺ para verificação de pureza da separação

- 17) Reservar a fração POSITVA CD3+ em gelo. Proceder para o aumento de pureza da fração NEGATIVA.
- 18) Preparar uma coluna LD.
- 19) Hidratar a coluna LD com 3mL de solução de enxágue MACS;
- 20) Assim que parar de gotejar, aplicar a amostra na coluna;
- 21) Quando a amostra terminar de passar, lavar 5 vezes com 3mL de solução de enxágue MACS, sempre esperando parar de gotejar para iniciar nova lavagem;
- 22) Para melhorar pureza, retirar cuidadosamente última gota fazendo uso do êmbolo;
- 23) Retirar a coluna do magneto e descartá-la.
- 24) A partir da fração negativa, fazer para a separação de células NK.
- 25) Centrifugar a fração negativa (CD3-) por 5 min a 2500 rpm;
- 26) Aspirar sobrenadante e ressuspender pellet em 80µL de solução de enxágue MACS para cada 10^7 células;
- 27) Adicionar 20µL de beads magnéticos CD56 para cada 10^7 células;
- 28) Homogeneizar bem;
- 29) Incubar por 15 min entre 4 e 8°C
- 30) Lavar com 1 a 2mL de solução de enxágue MACS para cada 10^7 células;
- 31) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm;
- 32) Aspirar sobrenadante e ressuspender até 10^8 células em 1mL de solução de enxágue MACS;
Obs.: cuidar para não formar bolhas, pois esta solução será usada na coluna. Se houver grumos de células, retirá-los.
- 33) Posicionar a coluna no magneto;
- 34) Hidratar a coluna LS com 3mL de solução de enxágue MACS;
- 35) Assim que parar de gotejar, aplicar a amostra na coluna;
- 36) Quando a amostra terminar de passar, lavar 5 vezes com 3mL de solução de enxágue MACS, sempre esperando parar de gotejar para iniciar nova lavagem;
- 37) Para melhorar pureza, retirar cuidadosamente última gota fazendo uso do êmbolo;
- 38) Retirar a coluna do magneto e adicionar 5mL de solução de enxágue MACS;

39) Colocar o êmbolo e empurrar para retirar as células retidas na coluna, que são as células de interesse;

Obs.: antes de empurrar o êmbolo, deixar escorrer cerca de 1mL para que as células se soltem um pouco da coluna, diminuindo o estresse mecânico que poderia ativá-las.

40) Retirar o êmbolo, colocar mais 2mL de solução de enxágue MACS e empurrar novamente;

41) Retirar uma alíquota de 50µL para a contagem (fator de diluição: 7 mL) e 200 mil células CD56⁺ para verificação de pureza da separação;

42) Congelar a -20°C a fração negativa (CD3⁻CD56⁻) para extração de DNA;