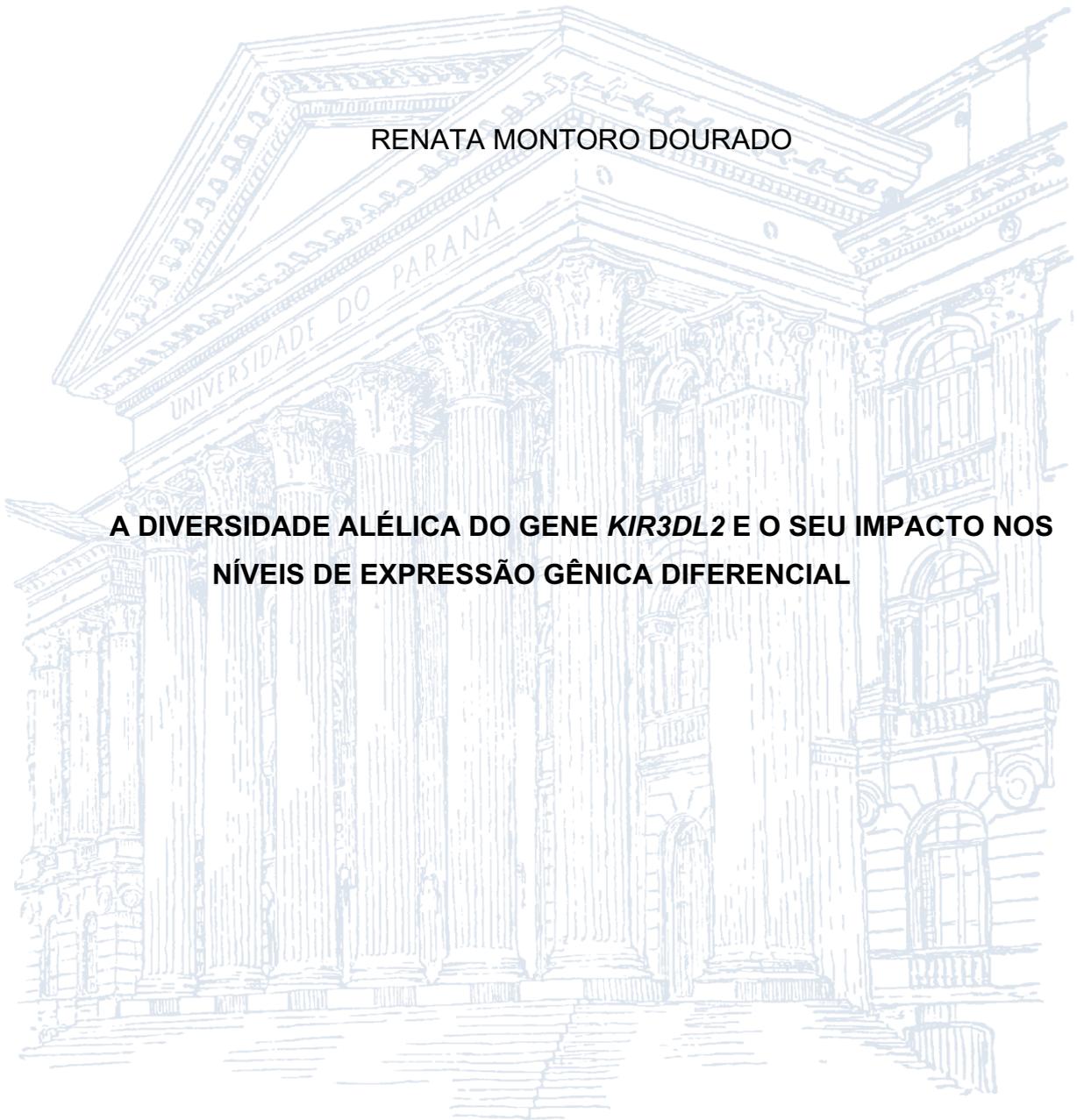


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATA MONTORO DOURADO

**A DIVERSIDADE ALÉLICA DO GENE *KIR3DL2* E O SEU IMPACTO NOS
NÍVEIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL**

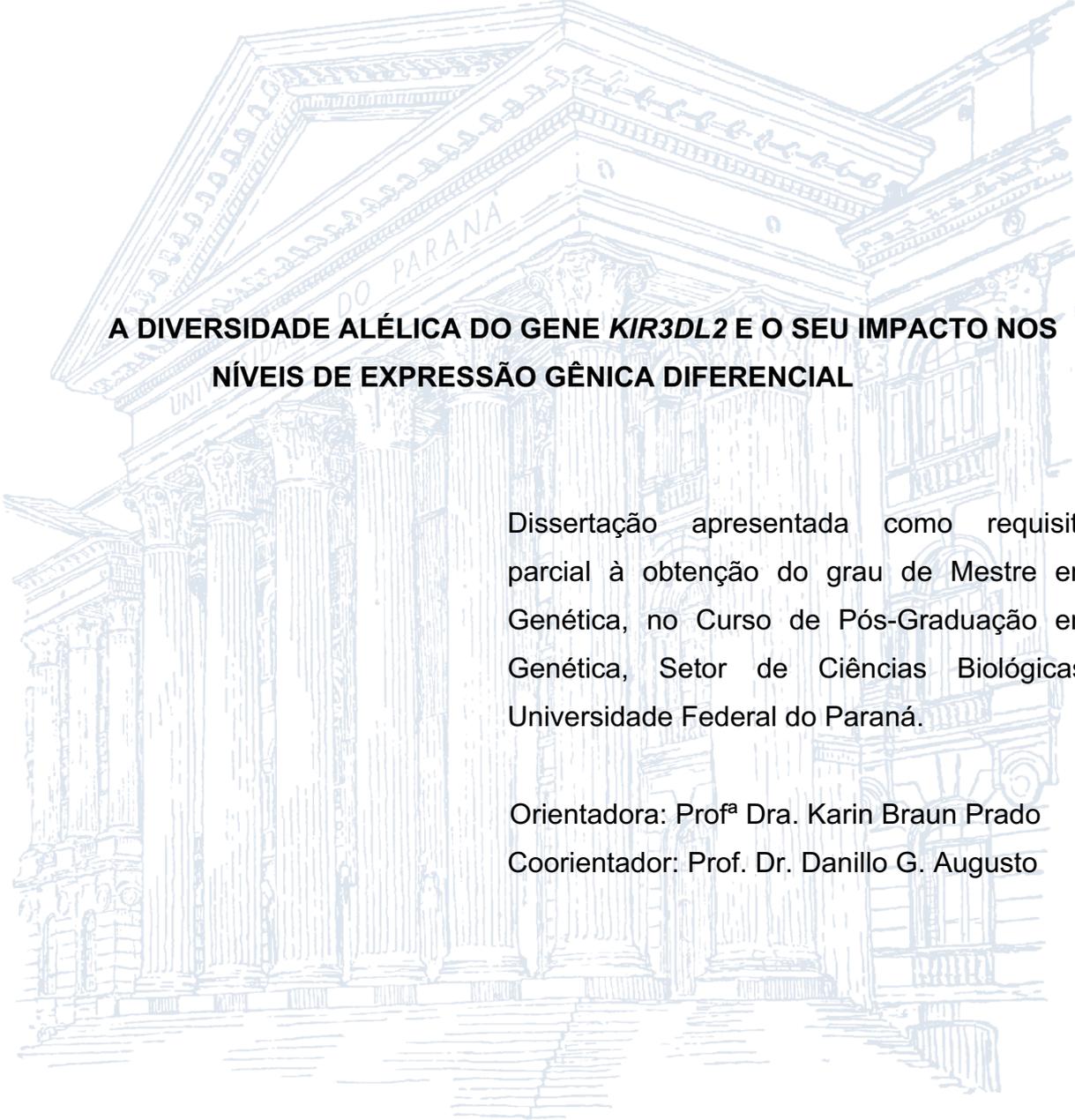


CURITIBA

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATA MONTORO DOURADO



A DIVERSIDADE ALÉLICA DO GENE *KIR3DL2* E O SEU IMPACTO NOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Genética, no Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dra. Karin Braun Prado

Coorientador: Prof. Dr. Danillo G. Augusto

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Dourado, Renata Montoro

A diversidade alélica do gene *KIR3DL2* e o seu impacto nos níveis de expressão gênica diferencial./ Renata Montoro Dourado. – Curitiba, 2017. 109 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Karin Braun Prado

Co-orientador: Danillo Gardenal Augusto

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

1. Alelos. 2. Receptores KIR3DL2. 3. Celulas killer. I. Título II. Prado, Karin Braun. III. Augusto, Danillo Gardenal. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 575.2



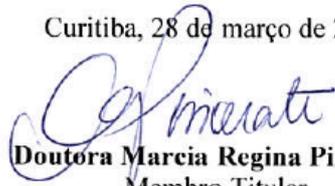
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
CENTRO POLITÉCNICO - JARDIM DAS AMÉRICAS - CAIXA
POSTAL 19071 - CEP 81531-990 - CTBA, BRASIL 41 3361 1587
PPG-GEN@UFPR.BR

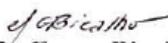


PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de mestrado de RENATA MONTORO DOURADO, intitulada: "A Diversidade Alélica do Gene KIR3DL2 e o seu Impacto nos Níveis de Expressão Gênica Diferencial", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

Curitiba, 28 de março de 2017


Doutora Marcia Regina Pincerati
Membro Titular


Doutora Maria da Graça Bicalho
Membro Titular


Doutora Liana Alves de Oliveira
Membro Titular


Doutor Danilo Cardenal Augusto
Presidente

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Karin e Danillo, pela confiança, ensinamentos, paciência, pelas muitas horas gastas comigo e pela amizade durante esses dois anos de trabalho. Obrigada Karin por ter se tornado muito mais que uma orientadora. Obrigada Danillo, o rei dos *KIR*, por ter compartilhado seu vasto conhecimento comigo. Vocês são exemplos de pessoas e profissionais. Sem vocês, nada teria sido possível.

A professora Maria Luiza Petzl-Erler por abrir as portas do laboratório e por ser exemplo para todos nós.

Aos meus pais, pois sei que apesar de não estar mais aqui há 17 anos, minha mãe me acompanha aonde quer que esteja, torcendo e aplaudindo cada conquista. Ao meu pai, obrigada por permitir que eu chegasse onde estou e por ter incentivado todo esse trajeto. O seu apoio incondicional foi muito importante. Nunca mediu esforços para dar à mim as melhores oportunidades. Espero poder te trazer muito orgulho ainda e recompensar todo o esforço que fez para me fazer chegar até aqui.

A minha irmã, figura de superação e força de vontade, que apesar de tudo que passou nessa vida me dá forças para seguir e enfrentar os obstáculos de todos os dias. Tenho muito orgulho de você e de tudo que você passou bravamente.

Ao meu namorado Renan, meu ponto de equilíbrio. Sua presença me tranquiliza e seu apoio me conforta. Obrigada por aguentar pacientemente meus surtos e ausências nesses dois últimos anos. Sua compreensão e incentivo foram imprescindíveis para que eu concluísse essa etapa. Você sempre acreditou em mim mesmo quando nem mesmo eu acreditava mais.

A minha super amiga Verónica, paraguaia que veio para ficar na minha vida e no meu coração. Não tenho palavras para agradecer sua importância nesse trabalho. Obrigada pelas correções, formatações, companhia no lab, os sequenciamentos, almoços, jantas e cafés. Sem esquecer também das conversas sem fim, compartilhando das mesmas angústias, aflições e medos, mas também de todas as alegrias e conquistas!

Lu, sem sua ajuda seria tudo muito mais difícil. Obrigada por purificar e levar as muitas placas para sequenciar, buscar borrachinhas e passar células no citômetro. Pessoa mais prestativa que você vai ser difícil encontrar, quero levar para toda vida.

A todos os outros integrantes do Laboratório de Genética Molecular Humana, Mari, Tici, Lu, Gabi, Sara, Amanda, Tamyres, Karolliny, e aos demais, pelo convívio, risadas e ajudas. Obrigada por terem se tornado minha segunda família.

As minhas amigas biomédicas, obrigada pelos momentos de descontração, desabafos, conselhos e pela doação de sangue sempre que precisei hehe

A professora Roseli Wassem que tornou a tão temida clonagem possível.

Aos órgãos de fomento, CNPq e CAPES, pelo financiamento de minha bolsa de mestrado e financiamento de projetos como este.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

RESUMO

A família de genes *KIR* (do inglês, *killer cell immunoglobulin-like receptors*) desempenha um papel central na imunidade inata e adaptativa e seu polimorfismo tem sido associado a suscetibilidade diferencial a diversas doenças. Esses genes exibem extensa variabilidade, tanto em termos de ausência e presença de genes, quanto em nível alélico. Os receptores codificados por esses genes são expressos na superfície das células NK e de alguns subtipos de células T e podem transduzir sinais ativadores ou inibidores. Pouco se conhece a respeito dos seus níveis de expressão gênica diferencial, tampouco dos mecanismos de regulação. O gene *KIR3DL2* codifica um receptor inibidor e é o segundo gene *KIR* mais polimórfico e polialélico do complexo, com mais de 80 alelos descritos. O objetivo desse trabalho foi analisar se o polimorfismo alélico de *KIR3DL2* impacta na sua expressão gênica diferencial. Para isso, caracterizamos a diversidade alélica de *KIR3DL2* em uma população de euro-descendentes de Curitiba e região metropolitana ($n = 235$), através de sequenciamento de DNA. As frequências genotípicas estavam de acordo com as esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo os genótipos mais comuns: *3DL2*001/007* (11,5%), *3DL2*001/002* (6,8%) e *3DL2*002/007* (6,8%). Os alelos mais frequentes encontrados nessa população foram *3DL2*007* (21,7%), *3DL2*001* (21,3%) e *3DL2*002* (20%). Um total de 40 indivíduos com genótipos específicos e comuns na população desse estudo foram selecionados para a análise de expressão diferencial por citometria de fluxo. A análise de expressão diferencial foi realizada com os indivíduos portadores dos alelos mais frequentes encontrados na população, sendo eles: *3DL2*001*, *3DL2*002*, *3DL2*003*, *3DL2*005*, *3DL2*007*, *3DL2*009*, *3DL2*010* e *3DL2*011*. Verificamos que o polimorfismo alélico de *KIR3DL2* está associado não somente com níveis de expressão diferencial, mas também com diferentes quantidades de células NK que exibem *KIR3DL2* em sua superfície. O alelo *KIR3DL2*002* foi associado ao maior nível de expressão de *KIR3DL2* e ao maior número de células NK *3DL2* positivas. Já *3DL2*010* foi associado ao menor nível de expressão e a menor quantidade de células NK com *KIR3DL2* presente na superfície celular. Além disso, demonstramos que um polimorfismo na região 3' UTR, na posição 16545A>G (*rs1865095*) marca os níveis de expressão de *KIR3DL2*. Sugerimos que esta expressão diferencial possa estar relacionada à ligação de miRNAs nesta região, especificamente o miR-2114-3p. A presença de ligantes específicos (HLA-A3, -A11 e -B27) não está associada a diferentes níveis de expressão de *KIR3DL2* ($p = 0,5739$) nem a diferentes quantidades de células NK *KIR3DL2* positivas ($p = 0,7772$). Além disso, nenhuma correlação foi encontrada entre a expressão diferencial dos alelos de *KIR3DL2* e a expressão diferencial dos alelos de *HLA-A*. Como perspectivas futuras pretendemos analisar, através de co-cultivo celular, a atividade citotóxica das células NK de indivíduos com diferentes genótipos homocigotos, como *KIR3DL2*001/KIR3DL2*001*, *KIR3DL2*002/KIR3DL2*002*, *KIR3DL2*007/KIR3DL2*007* e *KIR3DL2*010/KIR3DL2*010* a fim de corroborar as hipóteses geradas.

Palavras-chave: Células NK, *KIR3DL2*, variabilidade alélica, HLA-A3, HLA-A11, HLA-B27, expressão diferencial.

ABSTRACT

The *KIR* (killer cell immunoglobulin-like receptors) gene family plays a central role in innate and adaptive immunity and has been associated with differential susceptibility to diseases. Besides the uncommon presence and absence polymorphism that occurs in *KIR*, these genes also exhibit an extensive allelic variation. The receptors encoded by these genes are expressed on the surface of NK cells and on some subset of T cells. They can transduce either activating or inhibiting signals. The differential expression levels and the mechanisms of genetic regulation of these receptors are poorly known. The *KIR3DL2* gene encodes an inhibitory receptor and it is one of the most polymorphic and polyallelic *KIR*, with more than 80 alleles described so far. This study aimed to analyze if there are a profound impact of *KIR3DL2* allelic polymorphism on its differential gene expression. Allelic diversity of *KIR3DL2* was characterized in an euro-descendant population from Curitiba and metropolitan region, state of PR (n = 235), by sequencing-based typing. Genotype frequencies were in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium and the most frequent genotype was *3DL2*001/007* (11.5%), followed by *3DL2*001/002* (6.8%) and *3DL2*002/007* (6.8%). The most frequent alleles in the population were *3DL2*007* (21.7%), *3DL2*001* (21.3%) and *3DL2*002* (20%). A total of 40 individuals with specific and common genotypes were selected for differential expression analysis by flow cytometry. The differential expression analysis was made for the most common alleles found in the population: *3DL2*001*, *3DL2*002*, *3DL2*003*, *3DL2*005*, *3DL2*007*, *3DL2*009*, *3DL2*010* and *3DL2*011*. We verified that the allelic polymorphism of *KIR3DL2* was associated not only with the differential expression but also with the different amount of NK cells that display *KIR3DL2* on their surface. *KIR3DL2*002* allele was associated with higher expression of *KIR3DL2* and higher number of *KIR3DL2* positive NK cells, while *KIR3DL2*010* was related to the lowest expression and lowest level of *KIR3DL2* positive NK cells. It has also been found that a polymorphism in the 3' UTR, 16545A>G (*rs1865095*), was associated with *KIR3DL2* differential expression level. We suggest that it may be related to miRNAs binding, specifically miR-2114-3p. The presence of specific HLA class I ligands (HLA-A3, -A11 and -B27) was not associated with *KIR3DL2* differential expression levels ($p = 0.5739$) nor with different amount of NK *KIR3DL2*⁺ cells ($p = 0.7772$). In addition, no correlation was found between the differential expression of the *KIR3DL2* alleles and the differential expression of the HLA-A alleles. As future perspectives, it is intended to analyze the cytotoxic activity of NK cells from individuals with different genotypes like *KIR3DL2*001/KIR3DL2*001*, *KIR3DL2*002/KIR3DL2*002*, *KIR3DL2*007/KIR3DL2*007* and *KIR3DL2*010/KIR3DL2*010* through co-culture to corroborate the hypotheses generated.

Key-words: NK cells, *KIR3DL2*, allelic variability, HLA-A3, HLA-A11, HLA-B27, differential expression.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO DE CÉLULAS NK HUMANAS.....	19
FIGURA 2 - AS DUAS PRINCIPAIS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS NK.....	21
FIGURA 3 - AÇÃO DAS CÉLULAS NK FRENTE A DIFERENTES CENÁRIOS	24
FIGURA 4 - AS DUAS VIAS DE MORTE CELULAR MEDIADA PELAS CÉLULAS NK..	26
FIGURA 5 - ORGANIZAÇÃO DOS COMPLEXOS LRC E NKC, OS QUAIS CONTÉM OS PRINCIPAIS GENES QUE CODIFICAM RECEPTORES DE CÉLULAS NK EM HUMANOS	27
FIGURA 6 - ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>KIR</i> E CORRESPONDÊNCIA ENTRE OS ÉXONS E OS DOMÍNIOS PROTEICOS.....	28
FIGURA 7 - RECEPTORES <i>KIR</i> PRESENTES NA SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS NK E SEUS RESPECTIVOS LIGANTES HLA	29
FIGURA 8 - ESTRUTURA DAS MOLÉCULAS <i>KIR</i> COM DOIS (2D) OU TRÊS (3D) DOMÍNIOS EXTRACELULARES SEMELHANTES A IMUNOGLOBULINA	31
FIGURA 9 - NOMENCLATURA DOS GENES <i>KIR</i>	32
FIGURA 10 - MECANISMO DE AÇÃO DOS RECEPTORES <i>KIR</i> ATIVADORES E INIBIDORES.....	33
FIGURA 11 - DIFERENTES HAPLÓTIPOS <i>KIR</i> DETERMINADOS POR ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO FAMILIAR	35
FIGURA 12 - DIFERENTES NÍVEIS DE DIVERSIDADE DOS GENES <i>KIR</i>	37
FIGURA 13 - ASSOCIAÇÕES ENCONTRADAS COM O AUMENTO/DIMINUIÇÃO DA ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS NK PELOS RECEPTORES <i>KIR</i> EM DIFERENTES DOENÇAS.....	44
FIGURA 14 - ORGANIZAÇÃO DO GENE <i>KIR3DL2</i>	50
FIGURA 15 - PRODUTOS DE PCR VISUALIZADOS POR SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA EM GEL DE AGAROSE 1%	52
FIGURA 16 - ANÁLISE DE ELETROFEROGRAMA OBTIDO NO SOFTWARE <i>MUTATION SURVEYOR® DNA VARIANT ANALYSIS SOFTWARE</i>	54
FIGURA 17 - LIGAÇÃO DO PRODUTO DE PCR NO VETOR PTZ57R/T	56
FIGURA 18 - ESTRATÉGIA DE <i>GATE</i> UTILIZADA PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS ALELOS DE <i>KIR3DL2</i> POR CITOMETRIA DE FLUXO	61

FIGURA 19 - PORTADORES DE DIFERENTES ALELOS DE <i>KIR3DL2</i> APRESENTAM NÍVEIS DIFERENCIAIS DE EXPRESSÃO NA SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS NK.....	72
FIGURA 20 - A VARIAÇÃO ALÉLICA DE <i>KIR3DL2</i> IMPACTA NA QUANTIDADE DE CÉLULAS NK QUE APRESENTAM O RECEPTOR NA SUPERFÍCIE CELULAR	73
FIGURA 21 - PORTADORES DOS ALELOS <i>3DL2*002</i> E <i>3DL2*010</i> APRESENTAM NÍVEIS DIFERENCIAIS DE EXPRESSÃO DE <i>KIR3DL2</i> NA SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS NK E TAMBÉM DIFERENTES QUANTIDADES DE CÉLULAS NK <i>3DL2</i> POSITIVAS ...	74
FIGURA 22 - EXPRESSÃO DIFERENCIAL E QUANTIDADE DE CÉLULAS NK <i>3DL2</i> POSITIVAS ENTRE OS PORTADORES DOS ALELOS <i>3DL2*001</i> , <i>3DL2*002</i> E <i>3DL2*007</i>	75
FIGURA 23 - EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE <i>KIR3DL2</i> E QUANTIDADE DE CÉLULAS NK APRESENTANDO <i>KIR3DL2</i> NA SUA SUPERFÍCIE ENTRE OS INDIVÍDUOS COM GENÓTIPOS <i>CC</i> , <i>CT</i> E <i>TT</i> NA POSIÇÃO 1190	76
FIGURA 24 - EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE <i>KIR3DL2</i> E QUANTIDADE DE CÉLULAS NK APRESENTANDO <i>KIR3DL2</i> NA SUA SUPERFÍCIE ENTRE OS INDIVÍDUOS COM GENÓTIPOS <i>AA</i> E <i>AG</i> NA POSIÇÃO 16545	77
FIGURA 25 - DEMONSTRAÇÃO DA POSSÍVEL LIGAÇÃO ENTRE <i>MIIR-2114-3P</i> E <i>MRNA DE KIR3DL2</i>	78
FIGURA 26 - A PRESENÇA DE LIGANTES <i>HLA-A3</i> , <i>HLA-A11</i> E <i>HLA-B27</i> NÃO ESTÁ ASSOCIADA A NÍVEIS DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE <i>KIR3DL2</i>	78
FIGURA 27 - A PRESENÇA DE LIGANTES <i>HLA-A3</i> , <i>HLA-A11</i> E <i>HLA-B27</i> NÃO ESTÁ ASSOCIADA A DIFERENTES PORCENTAGENS DE CÉLULAS NK <i>3DL2</i> POSITIVAS	79
FIGURA 28 - ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS ALELOS DE <i>KIR3DL2</i> E DOS ALELOS DE <i>HLA-A</i>	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS USADAS PARA DIFERENCIAR OS PRINCIPAIS SUBTIPOS DE CÉLULAS NK DURANTE O PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO.....	20
TABELA 2 - DESCRIÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DE CADA ÉXON E SUAS RESPECTIVAS TEMPERATURAS DE FUSÃO (TM) E TAMANHOS DE FRAGMENTOS GERADOS, EM PARES DE BASE.....	51
TABELA 3 - DESCRIÇÃO DO PAR DE <i>PRIMERS</i> UTILIZADO PARA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO ÉXON 3 DO GENE <i>KIR3DL2</i>	53
TABELA 4 - PAINEL DE ANTICORPOS UTILIZADO	60
TABELA 5 - SÍTIOS VARIÁVEIS ENCONTRADOS NO GENE <i>KIR3DL2</i>	65
TABELA 6 - SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DOS ALELOS DE <i>KIR3DL2</i> IDENTIFICADOS NA POPULAÇÃO DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA E ALTERAÇÕES DE AMINOÁCIDOS GERADAS	66
TABELA 7 - ALELOS NOVOS IDENTIFICADOS EM <i>KIR3DL2</i> E ALTERAÇÕES DE AMINOÁCIDOS GERADAS	67
TABELA 8 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE <i>KIR3DL2</i> E COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DOS ALELOS ENTRE A POPULAÇÃO DE CURITIBA E A POPULAÇÃO DE BELO HORIZONTE.....	68
TABELA 9 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DE <i>KIR3DL2</i> E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (<i>p</i>).....	69
TABELA 10 - DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE AS POPULAÇÕES PARA O GENE <i>KIR3DL2</i>	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo, do inglês, <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> .
AML1	Proteína da leucemia mieloide aguda, do inglês, <i>acute myeloid leucemia 1 protein</i>
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CD	Grupos de diferenciação das células do sistema imune, do inglês <i>cluster of differentiation</i>
CD16	Receptor de membrana da superfamília de imunoglobulinas
CD3	Complexo de sinalização de TCR presente em linfócitos T
CD56	Receptor das células exterminadoras naturais
CD94/NKG2A	Receptor heterodímero das células exterminadoras naturais
CpG	Regiões ricas em dinucleotídeos citosina e guanina.
DAP-12	Proteína ativadora-DNAX de 12kDa
DECH	Doença do enxerto contra hospedeiro
D0, D1 e D2	Domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulinas dos receptores KIR
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado, do inglês <i>Deoxynucleoside Triphosphates</i>
D.O.	Densidade ótica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, do inglês <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	Dispersão frontal da luz, do inglês <i>Forward Scatter</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês, <i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	Antígenos leucocitários humanos, do inglês <i>Human Leukocyte Antigens</i>
HPC	Célula progenitora hematopoiética, do inglês <i>hematopoietic progenitor cell</i>
IC	Intervalo de confiança

IL	Interleucina
IPD	Do inglês, <i>Immuno Data Polymorphisms</i>
INF	Interferon
ITAM	Motivos ativadores baseados em tirosina, do inglês <i>Immunotyrosine-based activatory motif</i>
ITIM	Motivos inibidores baseados em tirosina, do inglês <i>Immunotyrosine-based inhibitory motif</i>
KIR	Receptor de célula natural killer semelhante à imunoglobulina, do inglês, <i>killer cell immunoglobulin-like receptor</i>
KLR	Receptor semelhante a lectina, do inglês, <i>killer cell lectin-like receptors</i>
LAIR	Receptor semelhante a imunoglobulina associado a leucócito, do inglês, <i>leucocyte associated immunoglobulin-like receptor</i>
LILR/ILT	Receptores leucocitários semelhantes a imunoglobulinas, do inglês, <i>leucocyte immunoglobulin-like receptors</i>
LGMH	Laboratório de Genética Molecular Humana
LRC	Complexo de receptores leucocitários, do inglês <i>Leukocyte Receptor Complex</i>
MEIO LB	Meio de cultura Luria-Bertani
MFI	Mediana da intensidade de fluorescência, do inglês, <i>Median Fluorescence Intensity</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>
NCR	Receptores naturais de citotoxicidade, do inglês <i>Natural Cytotoxicity Receptor</i>
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NK	Células exterminadoras naturais, do inglês <i>natural killer</i>
NKT	Células exterminadoras naturais do tipo T, do inglês <i>natural killer T cells</i>
NKC	Complexo de receptores das células exterminadoras naturais, do inglês <i>Natural killer complex</i> .
NKG2D	Receptor das células exterminadoras naturais e células B

NKT	Células exterminadoras naturais tipo célula T, do inglês, <i>natural killer T cell</i>
OR	Razão de chances, do inglês, <i>odds ratio</i>
Pb	Pares de base
PBS	Solução salina fosfatada, do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Ficoeritrina, do inglês <i>phycoerythrin</i>
PE-Cy 5	Ficoeritrina–cianina 5, do inglês <i>phycoerythrin-cyanin 5</i>
PF	Pênfigo foliáceo
Prol	Promotor intermediário de KIR, do inglês, <i>intermediate KIR promoter</i>
SIFT	Classificação entre tolerante e intolerante, do inglês, <i>sorting tolerant from intolerante</i>
SHP	Fosfatase contendo domínios de homologia a Src, do inglês, <i>src homology region containing phosphatase</i>
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSC	Dispersão lateral da luz, do inglês <i>side scatter</i>
SSP	<i>Primers</i> de sequência específica, do inglês <i>sequence-specific primers</i>
TCR	Receptor de células T, do inglês <i>T cell receptor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumor necrosis fator</i>
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócito-monócito, do inglês <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating fator</i>
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UTR	Região não traduzida, do inglês, <i>untranslated region</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 CÉLULAS NATURAL KILLER.....	18
2.2 DESENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS NK.....	18
2.3 CÉLULAS NK CD56 ^{bright} e CD56 ^{dim}	20
2.4 FUNÇÃO EFETORA DAS CÉLULAS NK	22
2.5 MECANISMO DE AÇÃO DAS CÉLULAS NK	25
2.6 RECEPTORES DE CÉLULAS NK	26
2.7 GENES <i>KIR</i>	27
2.8 NOMENCLATURA <i>KIR</i>	30
2.9 FUNÇÃO <i>KIR</i>	32
2.10 HAPLOGRUPOS <i>KIR</i>	33
2.11 EXPRESSÃO CLONAL DOS RECEPTORES <i>KIR</i>	36
2.12 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>KIR</i>	38
2.13 GENES <i>KIR</i> E SEU PAPEL NAS DOENÇAS	40
2.13.1 <i>KIR</i> e vírus da imunodeficiência humana (HIV)	40
2.13.2 Doenças autoimunes.....	41
2.13.3 Câncer.....	42
2.13.4 Reprodução.....	43

2.13.5 Genes <i>KIR</i> e seu papel nos transplantes	44
2.14 <i>KIR3DL2/45</i>	
3 OBJETIVOS	48
3.1 OBJETIVO GERAL	48
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	49
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA	50
4.3 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	50
4.4 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO PELO MÉTODO DE SANGER.....	53
4.5 LEITURA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS.....	54
4.6 CLONAGEM PARA CONFIRMAÇÃO DE ALELOS NOVOS	55
4.7 CÉLULAS COMPETENTES.....	56
4.8 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO	56
4.9 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL.....	57
4.10 PURIFICAÇÃO	58
4.11 SELEÇÃO DE INDIVÍDUOS PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL ...	58
4.12 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS (PBMC).....	59
4.13 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	59

4.14 AQUISIÇÃO E ANÁLISE NO CITÔMETRO DE FLUXO	60
4.15 ANÁLISE DA PRESENÇA DOS LIGANTES HLA CLASSE I ESPECÍFICOS E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE <i>KIR3DL2</i>	61
4.16 CORRELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS ALELOS DE <i>KIR3DL2</i> E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS ALELOS DE <i>HLA-A</i>	62
4.17 ANÁLISE DOS DADOS	62
5 RESULTADOS	64
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	64
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS ALELOS DE <i>KIR3DL2</i>	71
6 DISCUSSÃO	81
7 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	92
APÊNDICE 1	103
APÊNDICE 2	104
APÊNDICE 3	105
ANEXO 1	106

1 INTRODUÇÃO

Os receptores KIR (do inglês, *killer cell immunoglobulin-like receptors*), presentes na superfície das células NK (do inglês, *natural killer*) e de algumas células T, conhecidas como NKT (do inglês, *natural killer T cells*), desempenham um papel central na resposta imune (DUPONT; SELVAKUMAR e STEFFENS, 1997).

As células NK tem papel fundamental no reconhecimento das células infectadas, cancerosas ou malignamente alteradas (HERBERMAN; ORTALDO, 1981). Entretanto, para que essas células desempenhem sua função, há a necessidade da interação entre os receptores das células NK e seus ligantes específicos. Os receptores KIR, presentes na superfície das células NK, reconhecem as moléculas HLA de classe I (do inglês, *human leukocyte antigens*). Dessa interação, sinais ativadores e inibidores podem ser gerados no interior celular, sendo que o balanço final desses sinais regula a citotoxicidade e secreção de citocinas pelas células NK (VIVIER; NUNÈS e VÉLY, 2004). Nesse sentido, as diferentes moléculas KIR podem contribuir com a suscetibilidade ou proteção às doenças.

Há 15 genes *KIR* e 2 pseudogenes descritos, sendo que esses genes apresentam uma incomum variação de ausência e presença. Apesar dessa variação ser extensivamente estudada em diversas populações mundiais, a diversidade alélica de *KIR* é ainda pouco conhecida. Ainda menos conhecido, é o impacto funcional dessa diversidade alélica.

Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a variação alélica do gene *KIR3DL2* em uma amostra da população de Curitiba e região metropolitana a fim de posteriormente analisar o impacto dessa variação na expressão diferencial dos alelos de *KIR3DL2*. Níveis diferenciais de expressão gênica foram previamente relacionados à susceptibilidade à doença autoimune pênfigo foliáceo (PF). Esse estudo, portanto, é importante não apenas para a melhor compreensão da família gênica *KIR*, em especial *KIR3DL2*, mas também no entendimento de como esses genes alteram a susceptibilidade a doenças.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÉLULAS NATURAL KILLER

As células NK, também conhecidas como exterminadoras naturais, assassinas naturais ou ainda *natural killer*, foram descritas inicialmente em 1975 como um subtipo de linfócitos capazes de ter atividade citotóxica *in vitro* contra células leucêmicas sem sensibilização prévia (KIESSLING *et al.*, 1975). Dessa forma, são amplamente conhecidas pela sua capacidade citolítica e participam da primeira linha de defesa do organismo, a imunidade inata (HERBERMAN; ORTALDO, 1981). Elas também secretam citocinas e quimiocinas que recrutam outras células de defesa do organismo para o local de inflamação, estimulam a hematopoese, induzem proliferação e ativação granulocítica e, portanto, amplificam a resposta inflamatória. Essas células também contribuem controlando a intensidade e a qualidade da resposta das células T, proporcionando assim, uma ligação entre a imunidade inata, a imunidade adaptativa e a autoimunidade (MORETTA *et al.*, 2002; TRAPANI e SMYTH, 2002). Participam ainda em mecanismos patológicos e fisiológicos como a rejeição de transplantes (RUGGERI *et al.*, 1999; VAMPA *et al.*, 2003), defesa do hospedeiro contra infecções parasitárias (ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.*, 2003), sucesso reprodutivo (TROWSDALE; MOFFETT, 2008) e ocorrência de pré-eclâmpsia (HIBY *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2011).

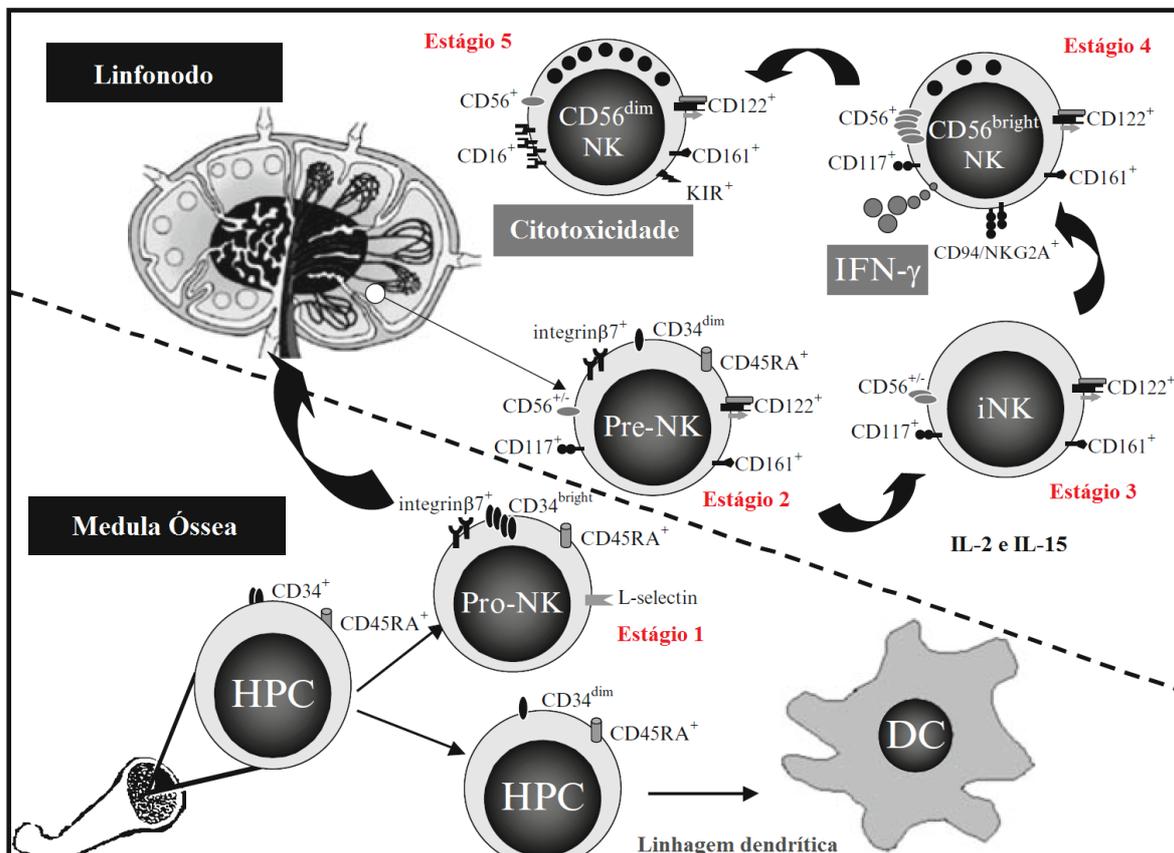
As células NK correspondem a cerca de 5 a 15% dos linfócitos circulantes no sangue (BIRON *et al.*, 1999). Quando estimuladas, há intensificação da sua atividade citotóxica e são capazes de lisar células infectadas por vírus, células neoplásicas e anormais. A citotoxicidade mediada pelas células NK é considerada rápida e muito potente. Dessa forma, a morte da célula alvo pode ocorrer em minutos, dificultando a atuação de mecanismos de resistência. Além disso, essas células podem ativar outras células imunes através da lise celular e/ou produção de citocinas e quimiocinas (WESTERVELT; LEY, 1990).

2.2 DESENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS NK

É consenso entre os pesquisadores que o desenvolvimento das células NK ocorre, primeiramente, na medula óssea. Esse ambiente possui outras células hematopoiéticas e estroma, fatores cruciais para promover a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células NK em intermediários celulares (YOKOYAMA *et al.*, 2004).

Vários estágios fenotípicos e funcionais foram identificados no desenvolvimento das células NK, conforme pode ser observado na FIGURA 1. O desenvolvimento das células NK humanas ocorre primeiramente na medula óssea sob influência de fatores do estroma celular, os quais impulsionam o início da diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas CD34⁺ (HPC) em precursores de células NK CD34^{bright}CD45RA⁺ (Pro-NK). Em um segundo momento, essas células, que também expressam moléculas de adesão (L-selectina e integrina $\beta 7$), se deslocam prontamente para os linfonodos, onde, sob a influência de IL-2 e IL-15, secretadas pelas células T, diferenciam-se em células NK imaturas que podem ainda diferenciar-se em células NK CD56^{bright} e CD56^{dim} (FREUD; CALIGIURI, 2006).

FIGURA 1 - ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO DE CÉLULAS NK HUMANAS



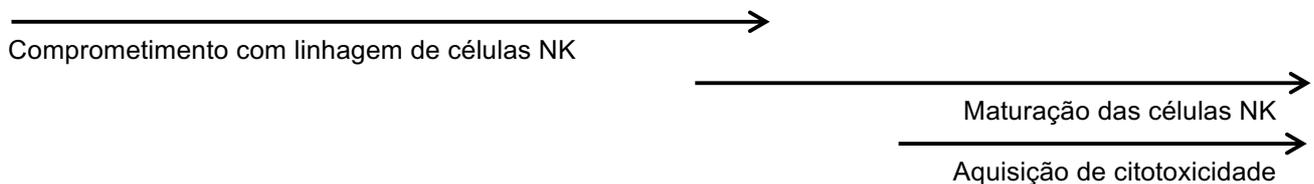
A medida em que as células NK progridem do estágio 1 para o estágio 3, tornam-se comprometidas com a linhagem celular NK e perdem a capacidade de desenvolvimento de células T ou células dendríticas. Nos estágios 3 a 5, as células NK sofrem maturação funcional e transição, de modo que as células NK imaturas do estágio 3, podem produzir fatores de crescimento. No estágio 4 as células NK CD56^{bright} contribuem, preferencialmente, com a secreção de *interferon gama* (IFN- γ) e no estágio 5 as células NK CD56^{dim} são principalmente citotóxicas.

FONTE: Adaptado de TOLEDO *et al.*, 2010

O painel de marcadores de superfície celular da TABELA 1 pode ser utilizado para diferenciar os distintos estágios funcionais de desenvolvimento de células NK nos linfonodos (ZAMAI *et al.*, 1998; TOLEDO *et al.*, 2010).

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS USADAS PARA DIFERENCIAR OS PRINCIPAIS SUBTIPOS DE CÉLULAS NK DURANTE O PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO

Estágio 1 (Pró-NK)	Estágio 2 (Pré-NK)	Estágio 3 (Célula NK imatura)	Estágio 4 (CD56 ^{bright})	Estágio 5 (CD56 ^{dim})
CD34 (+)	CD34 (+)	CD34 (-)	CD34 (-)	CD34 (-)
CD117 (-)	CD117 (+)	CD117 (+)	CD117 (+/-)	CD117 (-)
CD94 (-)	CD94 (-)	CD94 (-)	CD94 (+)	CD94 (+/-)
CD16 (-)	CD16 (-)	CD16 (-)	CD16 (-)	CD16 (+)



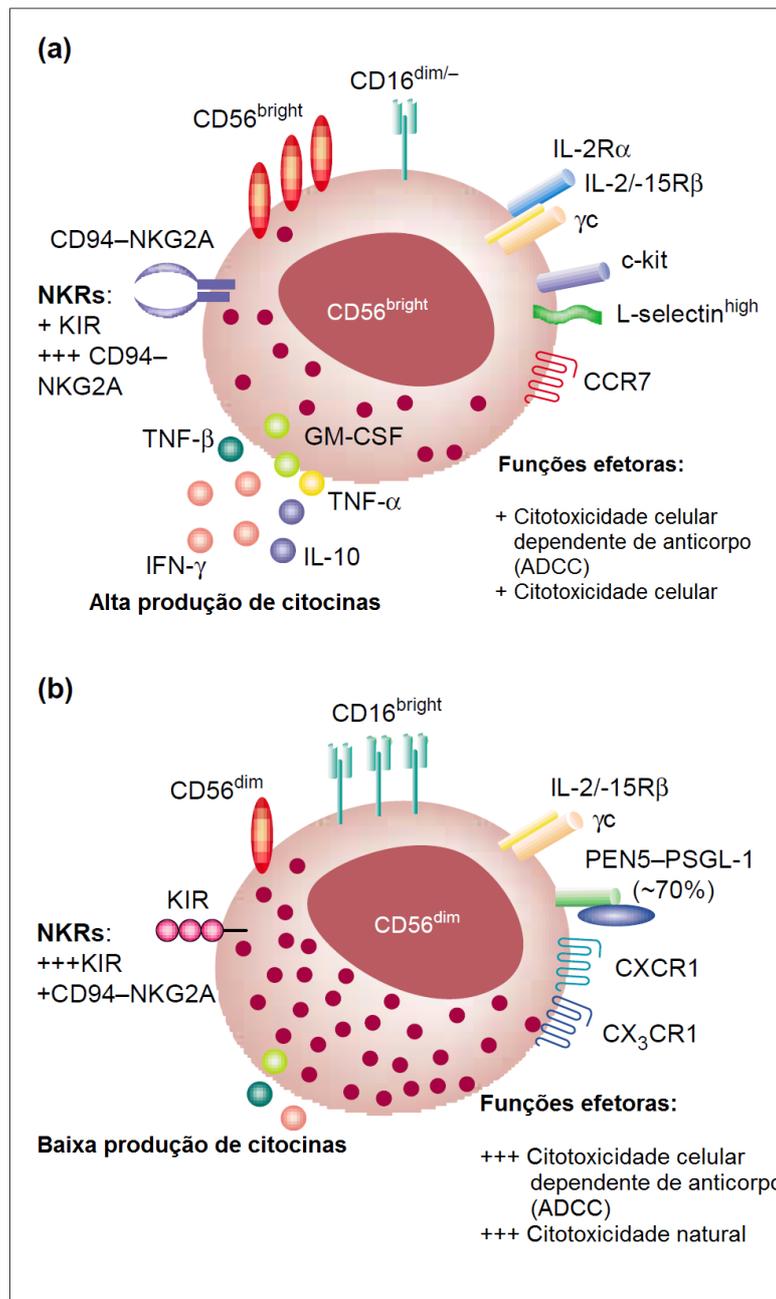
Essa tabela traz os marcadores mais importantes adquiridos durante os 5 estágios de desenvolvimento.
 FONTE: Adaptado de TOLEDO *et al.*, 2010

2.3 CÉLULAS NK CD56^{bright} e CD56^{dim}

Em geral, as células NK maduras são caracterizadas fenotipicamente pela presença de marcadores de superfície como CD56 e CD16 e ausência de expressão de CD3. Apesar de constituírem uma subpopulação de linfócitos, as células NK não apresentam receptores antigênicos de células T (TCR, do inglês *T cell receptor*) (FARAG; CALIGIURI, 2006; MORETTA *et al.*, 2008). Dois subtipos distintos de células NK podem ser identificados com base no nível de expressão de CD56 e CD16 (FIGURA 2). A maioria delas, aproximadamente 90%, tem baixa expressão de CD56 e alta expressão de CD16, sendo chamadas de CD56^{dim}. Esse subconjunto de células é potencialmente citotóxico, participando da citotoxicidade natural e da citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC, do inglês *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), produzindo baixa quantidade de citocinas. Já os outros 10% de células NK circulantes, são classificadas como CD56^{bright} e possuem altos níveis de expressão de CD56 e baixos níveis de CD16, sendo responsáveis pela secreção de citocinas imunoregulatórias, como IFN- γ , fator de necrose tumoral (TNF- α e TNF- β), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e interleucinas (IL-10 e IL-13). As células CD56^{dim} estão majoritariamente presentes no sangue periférico e possuem maior atividade citotóxica quando comparadas às células CD56^{bright}. Estas, por sua vez, encontram-se

principalmente nos tecidos linfoides secundários, na mesma região onde estão os linfócitos T e as células dendríticas, consistente com o seu potencial papel imunoregulatório (PUNT; OWEN e CALIGIURI, 2001; FARAG E CALIGIURI, 2006).

FIGURA 2 - AS DUAS PRINCIPAIS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS NK



(a) Células CD56^{bright}, com alta expressão de CD56 e baixa expressão de CD16. A principal característica dessas células é a produção de citocinas. (b) Células CD56^{dim}, com alta expressão de CD16 e baixa expressão de CD56, podendo apresentar alta capacidade citolítica.

FONTE: Adaptado de COOPER *et al.*, 2001.

2.4 FUNÇÃO EFETORA DAS CÉLULAS NK

As células NK possuem um grande repertório de receptores em sua superfície que, em conjunto, regulam sua ação efetora (VIVIER, NUNÈS e VÉLY, 2004; VIVIER *et al.*, 2011). Um desses grupos de receptores pertence à família das imunoglobulinas, os receptores KIR, os quais reconhecem moléculas HLA de classe I codificadas pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*). As moléculas HLA de classe I clássicas (HLA-A, HLA-B e HLA-C) são expressas na superfície de praticamente todas as células nucleadas. Estas moléculas têm como função principal apresentar antígenos na superfície celular para posterior reconhecimento pelas células T, desencadeando a resposta imune apropriada (JANEWAY *et al.*, 2001). Entretanto, elas também atuam no controle da atividade exterminadora das células NK.

Muitas células tumorais e infectadas por vírus têm mecanismos que diminuem a expressão de moléculas HLA de classe I na superfície celular (BIRON *et al.*, 1999). A diminuição ou ausência de expressão das moléculas HLA classe I, relatada como a falta da expressão do próprio (do inglês, *missing self*) (VILCHES e PARHAM, 2002), impede a geração de sinais inibidores nas células NK. Nesse caso, o receptor inibidor das células NK não interage com o seu ligante HLA de classe I, devido à sua ausência na célula-alvo. O impedimento do envio do sinal inibidor promove o ataque das células NK à célula-alvo. Por outro lado, a expressão de moléculas HLA de classe I garante a identificação das células próprias e saudáveis do organismo pela ligação dessas moléculas aos receptores inibidores específicos das células NK, protegendo-as de um ataque inapropriado. Essa ligação gera sinais inibidores que interrompem os sinais ativadores das células NK e garantem a sobrevivência das células normais do organismo (BIRON *et al.*, 1999; VILCHES; PARHAM, 2002).

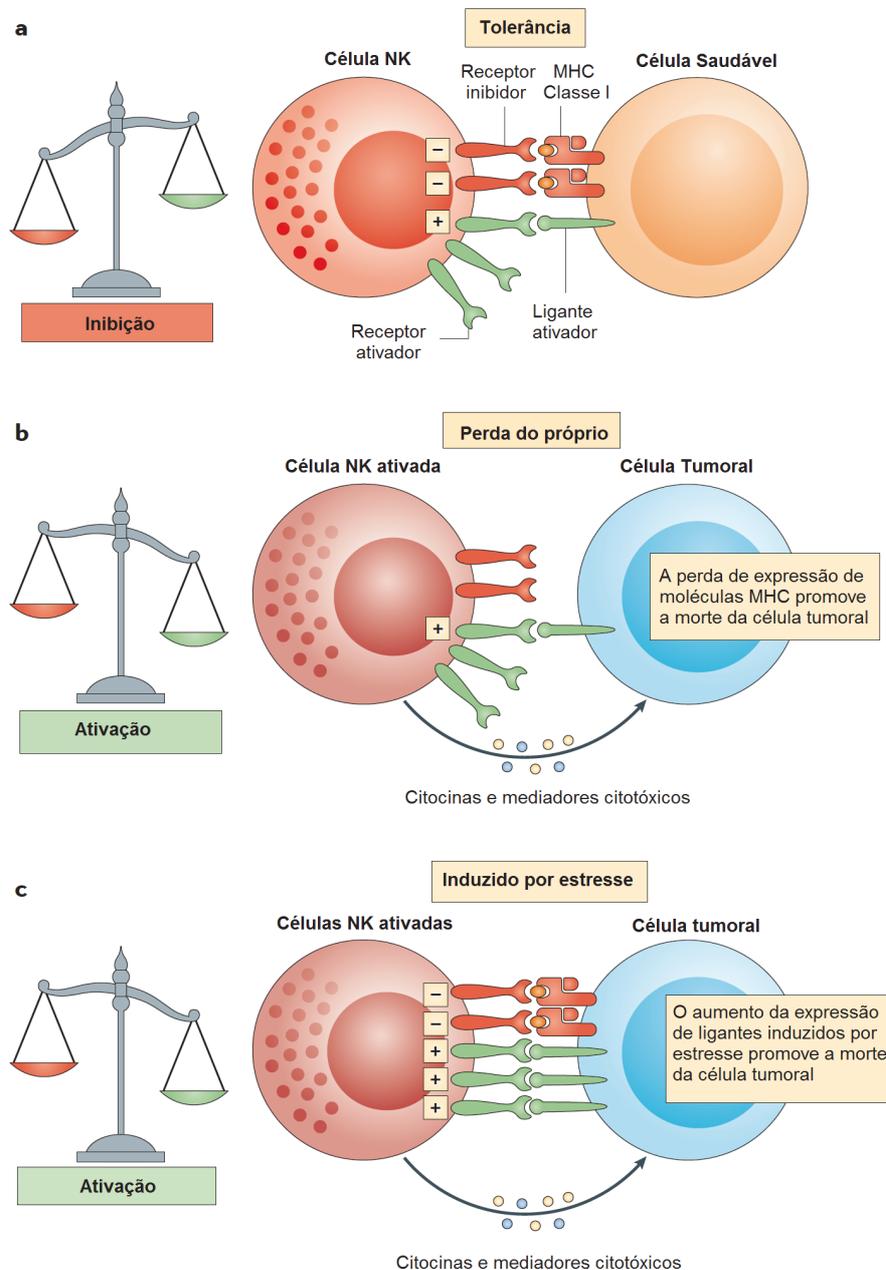
Para que as células NK atuem de maneira adequada, elas possuem um mecanismo de tolerância às células próprias e passam por um processo de educação ou licenciamento nas fases iniciais do seu desenvolvimento (RAULET; VANCE, 2006). Entretanto, como esse processo acontece ainda não está completamente claro. As primeiras evidências sugerem que há expressão de pelo menos um receptor inibidor na superfície das células NK, capaz de reconhecer moléculas HLA de classe I nas células saudáveis do organismo. As células que expressam esse receptor são chamadas de

células licenciadas/tolerantes (FIGURA 3A). Por outro lado, outros estudos apontam que as células NK que não expressam nenhum receptor inibidor que reconhece moléculas HLA de classe I presentes nas células saudáveis do organismo, continuam tolerantes, porém tornam-se anérgicas e irresponsivas, através de um processo chamado “desarmamento” (RAULET; VANCE, 2006; SUN; LANIER, 2011).

A tarefa exercida pelas células NK de reconhecer a perda ou a alteração da expressão de moléculas HLA de classe I na superfície das células alvo é essencial para o bom funcionamento da resposta imune. Isso porque, na resposta imunológica adaptativa, a ausência de expressão de moléculas HLA representa um mecanismo de escape ao ataque das células T, já que estas só reconhecem antígenos no contexto HLA (UHRBERG, 2005). Dessa maneira, é necessária uma quantidade apropriada e específica, tanto das moléculas HLA de classe I na superfície de células-alvo, como de receptores ativadores e inibidores na superfície das células NK, a fim de ter uma resposta imunológica conveniente (BIRON *et al.*, 1999).

Várias respostas podem ser geradas em diferentes situações fisiológicas, dependendo do balanço de sinais desencadeados pelos receptores das células NK e da expressão de moléculas HLA classe I na superfície das células alvo (FIGURA 3). Quando o sinal de interação entre o receptor inibidor e seu ligante é superior ao sinal de interação fornecido pelo receptor ativador, a lise celular pelas células NK é inibida (FIGURA 3A). Já a promoção da lise celular é dada quando o receptor ativador reconhece o seu ligante na célula-alvo na ausência da interação receptor inibidor/ligante (FIGURA 3B). Outro modo para que ocorra a ativação das células NK e lise celular é quando a interação receptor ativador/ligante é preponderante sobre a interação receptor inibidor/ligante (FIGURA 3C) (VIVIER *et al.*, 2004, 2011, 2012). Importante salientar que para a ativação das células NK e sua consequente proliferação, produção de IFN- γ e atividade citotóxica, a ação de citocinas inflamatórias é requerida. Essas citocinas são secretadas por células dendríticas, macrófagos e tecidos infectados por patógenos, sendo IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IFN- α e INF- β , as principais necessárias nesse processo (BIRON, 2001).

FIGURA 3 - AÇÃO DAS CÉLULAS NK FRENTE A DIFERENTES CENÁRIOS



(a) Observa-se a predominância de sinais inibidores e, portanto, a célula NK não é ativada. Isso acontece nas células saudáveis do organismo, em que o sinal gerado pelos receptores ativadores é barrado pelos sinais gerados pelos receptores inibidores. (b) A diminuição da expressão de moléculas HLA, processo que ocorre nas células infectadas por vírus e células tumorais, é reconhecida pelas células NK. Essa ausência de sinais inibidores de morte permite o ataque à célula alvo. (c) Existe ligação de receptores tanto ativadores quanto inibidores com seus respectivos ligantes, gerando sinais ativadores e inibidores, simultaneamente. Assim, o balanço entre os sinais gerados determina a resposta da célula NK. Nesse caso específico, houve o aumento da expressão de ligantes induzidos por estresse, levando a uma predominância de sinais ativadores, e, conseqüentemente, lise da célula alvo.

FONTE: Adaptado de VIVIER *et al.*, 2012

Apesar de alguns receptores ativadores apresentarem uma estrutura de reconhecimento do ligante muito semelhante a receptores inibidores, a afinidade de ligação das variantes ativadoras é fortemente reduzida em comparação às variantes inibidoras. Por esse motivo, ocorre o prevalectimento dos sinais inibidores quando há a ligação de receptores inibidores e ativadores simultaneamente (FARAG *et al.*, 2002; UHRBERG, 2005). No entanto, o aumento excessivo de sinais ativadores pode superar os sinais inibidores e levar a NK ao ataque. Isso significa que existe um balanço fino entre sinais ativadores e inibidores na regulação das NK (PARHAM, 2005).

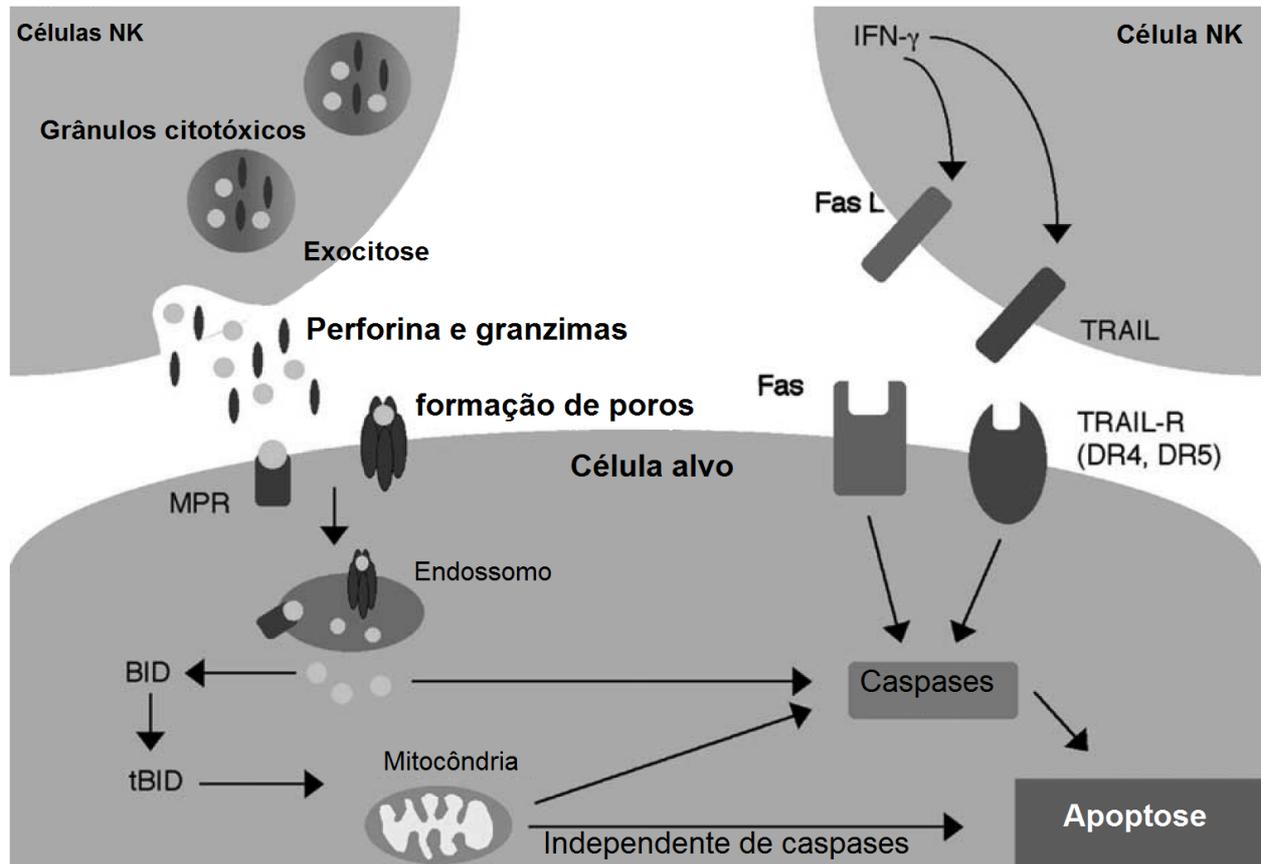
2.5 MECANISMO DE AÇÃO DAS CÉLULAS NK

Para efetivarem a sua função, as células NK possuem dois mecanismos de ação. O principal deles se dá através da exocitose de grânulos de granzimas e perforinas (FIGURA 4). Quando sinais de receptores ativadores prevalecem, as células NK são ativadas e interagem com as células alvo através de moléculas de adesão e integrinas (TASSI *et al.*, 2006). Dessa interação ocorrem alterações dinâmicas na morfologia das células exterminadoras naturais. A principal delas é a movimentação de grânulos líticos em direção ao sítio de interação com a célula alvo através de modificações na estrutura de citoesqueleto das células NK. Em seguida, a membrana externa do grânulo se funde com a membrana citoplasmática, permitindo a liberação do seu conteúdo no espaço sináptico. Os principais conteúdos destes grânulos são moléculas de perforina e granzima. As perforinas são proteínas que formam poros na membrana das células alvo que podem perturbar a permeabilidade celular e levar essas células à lise osmótica. As granzimas pertencem a uma família de serina proteases envolvidas no processo de apoptose, sendo a granzima B considerada o mais importante membro pró-apoptótico desta família (TRAPANI e SMYTH, 2002; DJEU *et al.*, 2002; UHRBERG, 2005).

O outro mecanismo de morte celular mediado por células NK é através da ligação de receptores específicos presentes nas células alvo com ligantes na superfície das células NK. Esses ligantes pertencem a superfamília do TNF (do inglês, *tumor necrosis factor*) e a sua ligação induz a apoptose da célula alvo. As células NK podem apresentar dois membros desta família, FasL e TRAIL, e sua expressão pode ser induzida por IFN- γ . Para que o mecanismo de morte celular seja ativado, é necessário que esses ligantes interajam com seus respectivos receptores na célula alvo, Fas e TRAIL-R (DR4, DR5), os quais contêm um domínio de morte conservado que indiretamente ativa a cascata

enzimática das caspases e leva a célula à morte por apoptose (FIGURA 4) (ZAMAI *et al.*, 1998; WALLACE; SMYTH, 2005).

FIGURA 4 - AS DUAS VIAS DE MORTE CELULAR MEDIADA PELAS CÉLULAS NK



À esquerda, a via de exocitose de grânulos, a qual envolve a liberação de grânulos de perforina e granzima para o espaço intracelular (entre a célula NK e a célula alvo). À direita, a via mediada por membros da família TNF, FasL e TRAIL, os quais são expressos pelas células NK e regulados, principalmente, por $\text{INF-}\gamma$. Esses ligantes são importantes mediadores de apoptose celular através dos seus correspondentes receptores Fas e TRAIL-R (DR4, DR5), respectivamente.

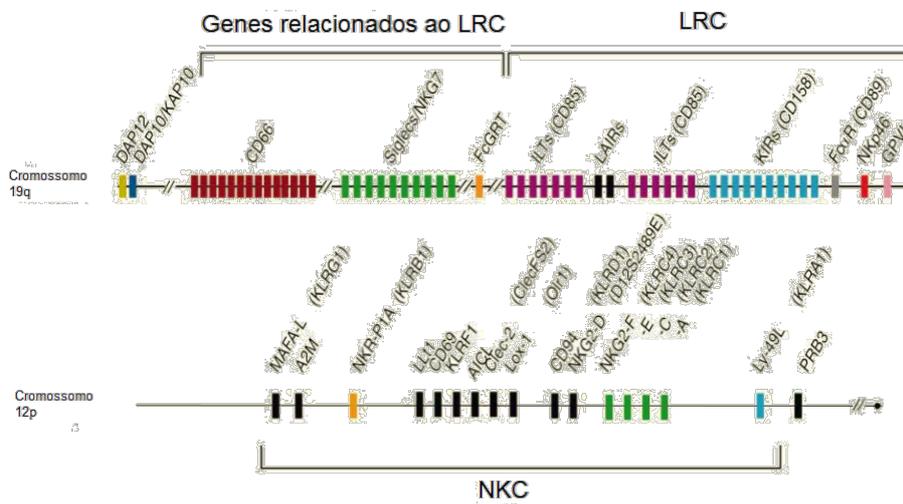
FONTE: Adaptado de SMYTH *et al.*, 2005.

2.6 RECEPTORES DE CÉLULAS NK

A maioria dos receptores das células NK são codificados por genes presentes em dois cromossomos distintos (FIGURA 5). No braço curto do cromossomo 12, na região genômica 12p13, de aproximadamente 2 Mb, está o complexo de receptores de células *Natural Killer* (NKC, do inglês *Natural Killer Complex*), que compreende genes de receptores semelhantes a lectina do tipo C, como o *CD94* e o *NKG2*. Já no braço longo do cromossomo 19, na região genômica 19q13, localiza-se o complexo de receptores

leucocitários (LRC, do inglês *Leucocyte Receptor Complex*), de aproximadamente 1 Mb (WILSON *et al.*, 2000). O complexo LRC compreende mais de 25 genes, entre eles, os genes *KIR* (que compreendem 150 Kb dessa região) e os genes que codificam outras moléculas de superfície celular, como proteínas DAP, antígenos CD66 e ainda outros tipos de receptores, como os receptores leucocitários semelhantes a imunoglobulinas (LILR, do inglês *leucocyte immunoglobulin-like receptors*) e receptores semelhantes a imunoglobulinas associados a leucócitos (LAIR, do inglês *leucocyte-associated immunoglobulin-like receptor*) (FIGURA 5) (KHAKOO *et al.*, 2000).

FIGURA 5 - ORGANIZAÇÃO DOS COMPLEXOS LRC E NKC, OS QUAIS CONTÊM OS PRINCIPAIS GENES QUE CODIFICAM RECEPTORES DE CÉLULAS NK EM HUMANOS



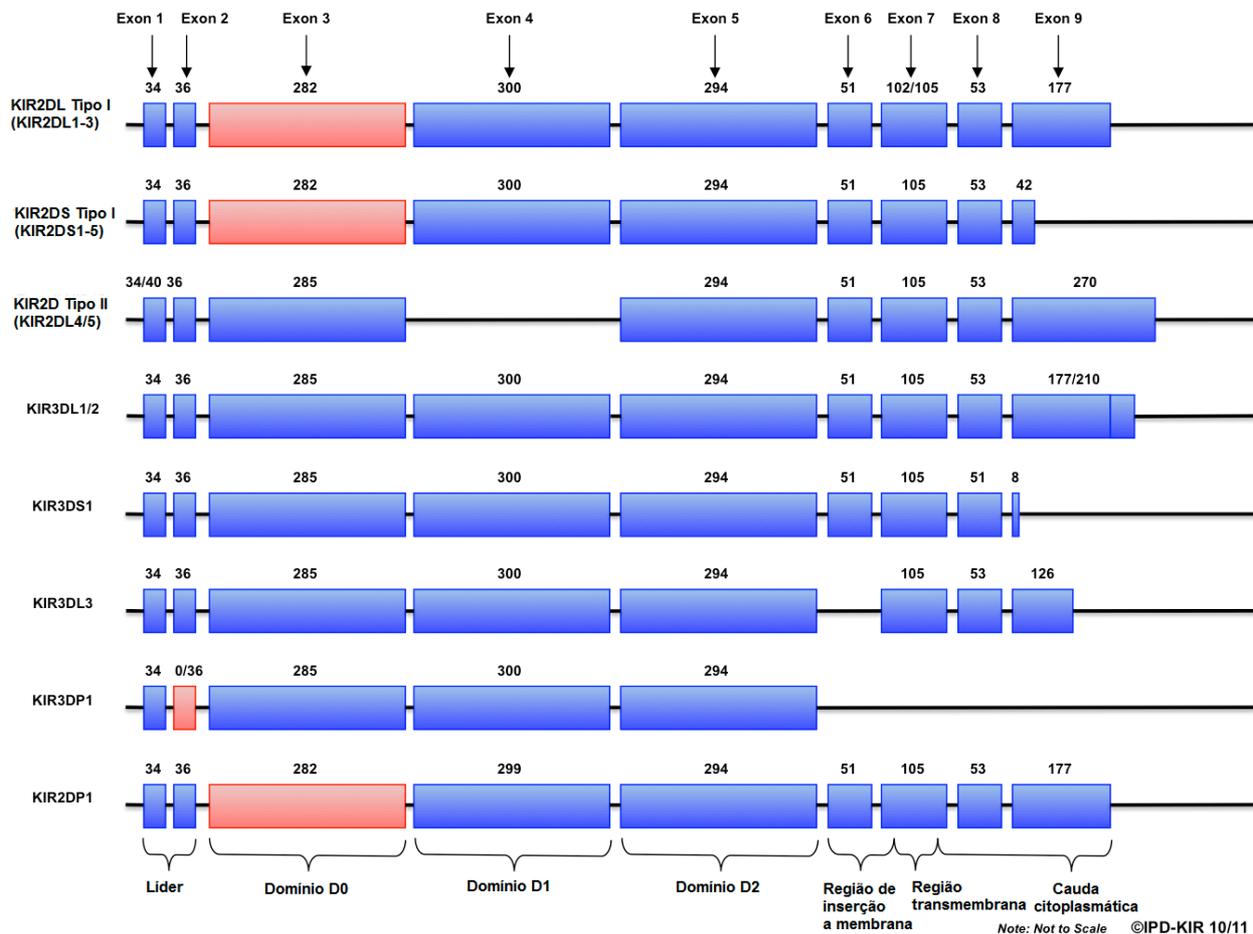
FONTE: Adaptado de TROWSDALE, 2001.

2.7 GENES *KIR*

Acredita-se que a família de genes *KIR* originou-se de *KIRX*, um único gene localizado dentro do *locus* LILR, após duplicação. Este gene sofreu, subsequentemente, múltiplas duplicações que originaram os *loci* *KIR* existentes (KHAKOO, 2010). Atualmente, essa família é composta por 15 genes e 2 pseudogenes, os quais podem variar em tamanho, de 4 Kb a 16 Kb (VILCHES e PARHAM, 2002) e em número de éxons, de 4 a 9 (FIGURA 6). Os dois primeiros éxons codificam a sequência sinal ou líder. Já os éxons 3, 4 e 5 codificam os domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulinas D0, D1 e D2, respectivamente. O éxon 6 codifica a região de inserção da molécula na membrana

plasmática e o éxon 7 codifica a região transmembrana. Por último, os éxons 8 e 9 codificam a cauda citoplasmática (VILCHES e PARHAM, 2002; MARAGON *et al.*, 2008).

FIGURA 6 - ORGANIZAÇÃO DOS GENES *KIR* E CORRESPONDÊNCIA ENTRE OS ÉXONS E OS DOMÍNIOS PROTEICOS

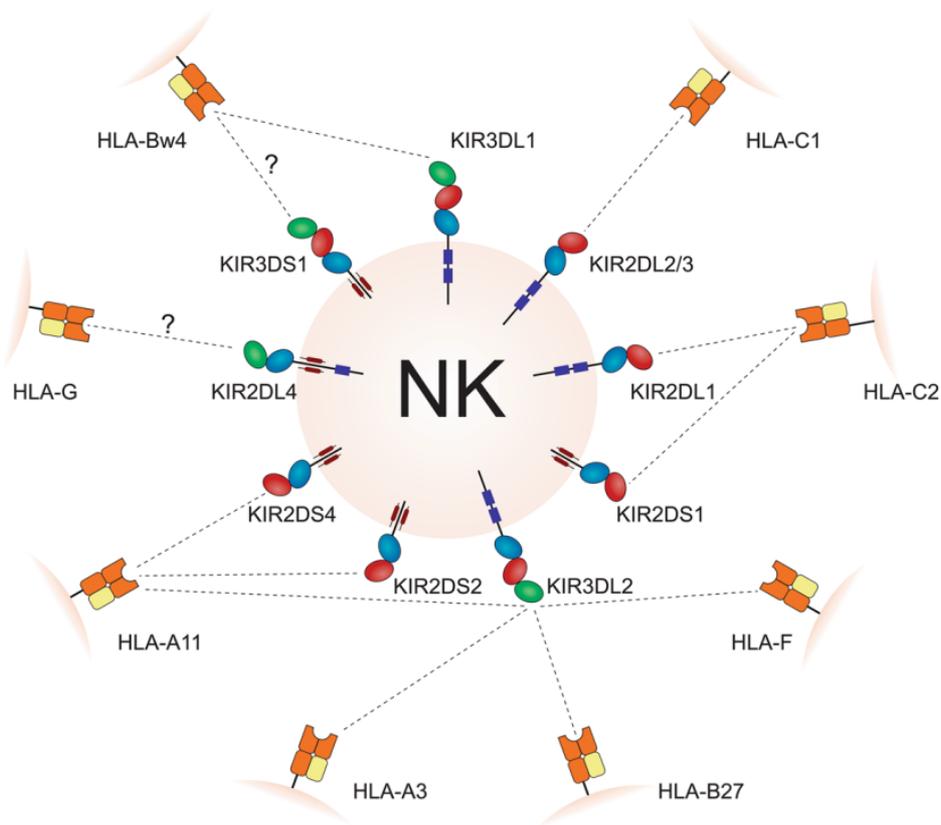


As regiões codificadoras (éxons) são mostradas em azul e os números representam seus tamanhos em pares de base. O pseudoéxon 3 em *KIR2DL*, *KIR2DS* e *KIR2DP1* e o éxon 2 que é ocasionalmente deletado em *KIR3DP1* são mostrados em vermelho.

FONTE: Adaptado de IPD (ROBINSON *et al.*, 2010).

Os ligantes dos receptores *KIR* são moléculas HLA de classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-F e possivelmente HLA-G). Essas moléculas são heterodímeros que consistem em duas cadeias: cadeia alfa, com três domínios, $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, e cadeia beta, β -2 microglobulina, conforme demonstrado na FIGURA 7 (COOPER *et al.*, 2001; VILCHES; PARHAM, 2002; AUGUSTO; PETZL-ERLER, 2015). Importante salientar que os genes que codificam essas moléculas estão presentes no cromossomo 6 e segregam independentemente dos genes *KIR*.

FIGURA 7 - RECEPTORES KIR PRESENTES NA SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS NK E SEUS RESPECTIVOS LIGANTES HLA



Pontos de interrogação indicam interações ainda controversas.
 FONTE: AUGUSTO E PETZL-ERLER, 2015.

A família de genes *KIR* constitui-se por uma série de genes que compartilham entre si 85% a 99% de similaridade de sequência. Esse arranjo favorece uma rápida evolução por recombinação não homóloga e assim essa região genômica se expandiu e se contraiu ao longo do tempo (MARTIN *et al.*, 2003). Outro fator que pode ter influenciado na rápida evolução dos genes *KIR*, pode estar relacionado à interação entre moléculas *KIR* e *HLA*. O elevado polimorfismo de *KIR* e *HLA*, combinado com o fato de que essas duas famílias segregam independentemente, permite que indivíduos possuam receptores *KIR* para os quais eles não tenham os respectivos ligantes *HLA* de classe I, e vice-versa (DU *et al.*, 2007). Entretanto, há indícios de que combinações funcionais *KIR-HLA* (presença de receptores para os quais há também ligantes presentes) são favorecidos pela seleção natural, de forma que *KIR* e *HLA* coevoluem como um único sistema (revisado por AUGUSTO; PETZL-ERLER, 2015). Estudos sugerem que os genes que codificam os receptores das células NK que reconhecem moléculas de *HLA* classe I evoluíram rapidamente em consequência da evolução de seus ligantes, mantendo, dessa

forma, as interações e respostas apropriadas (KHAKOO *et al.*, 2000). As infecções, particularmente as epidemias severas, desempenham um papel importante na evolução, em especial para populações pequenas e isoladas. Uma intensa restrição seletiva pode acelerar a evolução dos mecanismos que contribuem para a sobrevivência e reconstituição da população após as epidemias. Vestígios de coevolução de *KIR* e *HLA* foram encontrados em uma pequena população africana e população de ameríndios isolados, os quais passaram por períodos de alta incidência de malária e com epidemias de hepatite, pressões que aparentemente selecionaram certas combinações de *KIR* e *HLA* (revisado em AUGUSTO; PETZL-ERLER, 2015). Além disso, a presença de determinados receptores *KIR* e ligantes *HLA* é importante para placentação e suprimento adequado de sangue para o feto e, conseqüentemente, para o sucesso na reprodução. Portanto, certas combinações *KIR-HLA* podem ser favorecidas por seleção natural não somente pela sua função na resposta imune, mas também por sua influência direta na reprodução (revisado em AUGUSTO; PETZL-ERLER, 2015).

2.8 NOMENCLATURA *KIR*

A nomenclatura do sistema gênico *KIR* considera a estrutura da proteína *KIR* formada, sendo classificados com base no número de domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulinas (2D ou 3D) e características da cauda citoplasmática do receptor *KIR* (VILCHES e PARHAM, 2002).

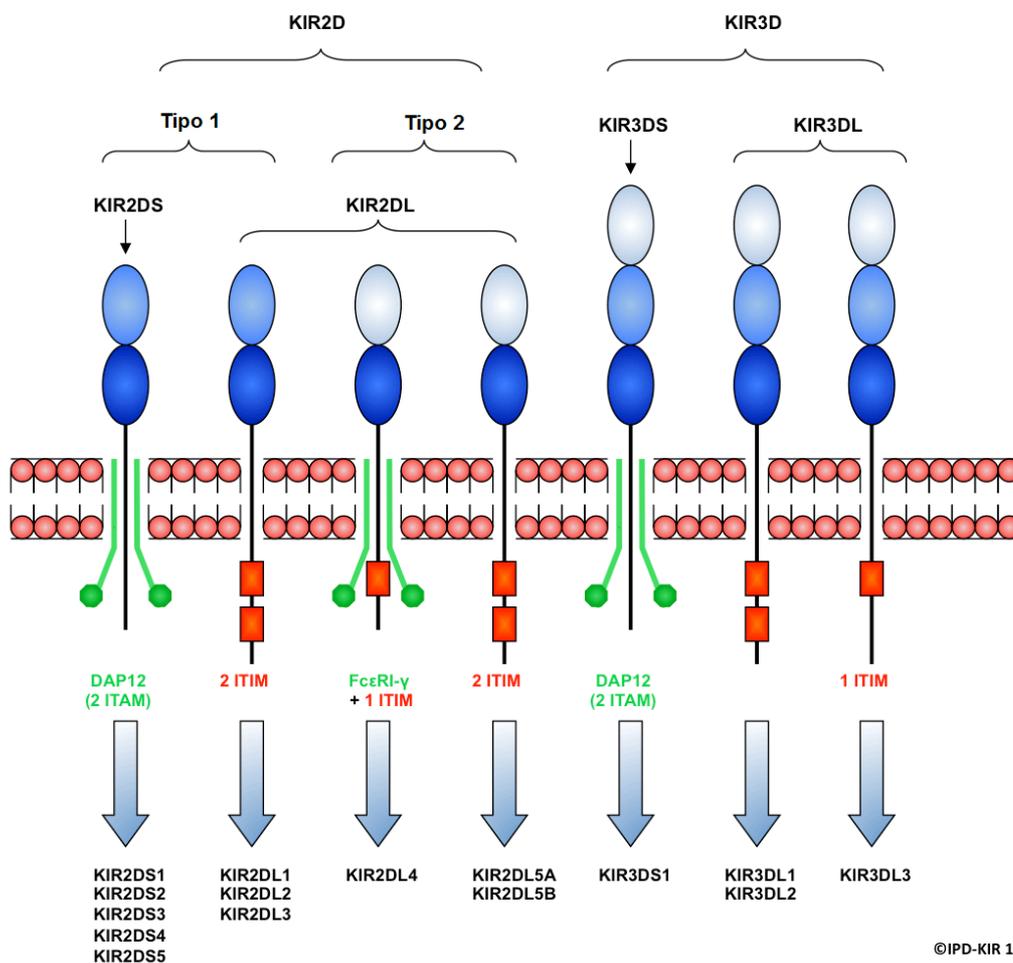
As moléculas *KIR* podem ter dois ou três domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulinas, ou seja, 2D ou 3D. As que predominam nos seres humanos possuem dois domínios e podem ser de dois tipos: *KIR2D* tipo 1, com os domínios D1 e D2, e o tipo 2, com os domínios D0 e D2. Já os receptores *KIR3D* possuem D0, D1 e D2 (FIGURA 8) (MORETTA e MORETTA, 2004). Foi demonstrado por cristalografia de raios-x, que as alças dos domínios D1 e D2 dos receptores do tipo *KIR2D* ligam-se entre as $\alpha 1$ e $\alpha 2$ hélices das moléculas *HLA* de classe I (BOYINGTON *et al.*, 2000). Os receptores do tipo *KIR3D* interagem de forma semelhante, com a diferença que o domínio distal D0 estaria intensificando essa ligação (KHAKOO *et al.*, 2002).

Quanto ao tamanho das caudas citoplasmáticas, as moléculas *KIR* podem ser caracterizadas por possuírem caudas longas L (do inglês, *long*) ou caudas curtas S (do inglês, *short*). O tamanho das caudas desses receptores está diretamente relacionado a sua atividade funcional, sendo os receptores de cauda longa inibidores e os de cauda

curta, ativadores. Os números de 1 a 5 após o sufixo L ou S foram adicionados à medida que os genes que codificam essas moléculas foram sendo descobertos (VILCHES e PARHAM, 2002).

Já os pseudogenes *KIR* são identificados pela letra “P” logo após o dígito correspondente ao tipo de domínio extracelular semelhante a imunoglobulina, como os pseudogenes *KIR2DP1* e *KIR3DP1* (MORETTA; MORETTA, 2004).

FIGURA 8 - ESTRUTURA DAS MOLÉCULAS KIR COM DOIS (2D) OU TRÊS (3D) DOMÍNIOS EXTRACELULARES SEMELHANTES A IMUNOGLOBULINA



FONTE: Adaptado de ROBINSON *et al.*, 2010.

A nomenclatura dos alelos de *KIR* é semelhante à nomenclatura adotada para os *loci HLA* (GARDINER *et al.*, 2001; SHILLING *et al.*, 2002). Assim, após o nome do gene, um asterisco é utilizado como separador entre o nome do gene e a designação do alelo. Os primeiros três dígitos da designação numérica são usados para indicar alelos que

diferem na sequência codificadora de proteínas, ou seja, diferem na região exônica, através de mutações não sinônimas. Os próximos dois dígitos são usados para distinguir alelos que diferem por diferenças sinônimas dentro da região codificadora. Os dois dígitos finais são usados para distinguir alelos que diferem somente por substituições em um íntron, promotor ou outra região não codificadora da sequência (ROBINSON *et al.*, 2013). Na FIGURA 9, podemos observar um exemplo de nomenclatura completa para o gene *KIR2DL1*.

FIGURA 9 - NOMENCLATURA DOS GENES *KIR*



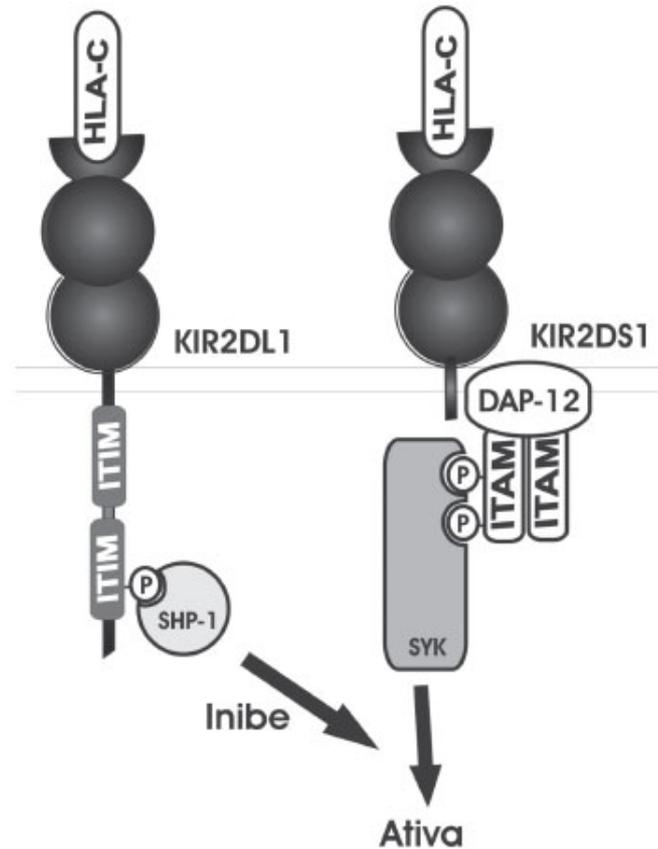
FONTE: Adaptado de ROBINSON *et al.*, 2013.

2.9 FUNÇÃO *KIR*

A cauda citoplasmática, juntamente com a porção transmembrana das moléculas *KIR*, está relacionada à sua atividade funcional. Em geral, os receptores de cauda longa L são inibidores devido a sua habilidade em recrutar e ativar tirosinas fosfatases, através de seus motivos inibidores baseados em tirosina, os ITIMs (do inglês, *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*). Esses motivos inibidores são capazes de desfosforilar muitos alvos da via ativadora e, portanto, liberar sinais inibidores (LANIER, 1998). Por outro lado, os de cauda curta S possuem um aminoácido carregado positivamente na porção transmembrana, permitindo associação com a molécula DAP-12 que libera sinais ativadores por meio de motivos ativadores baseados em tirosina, os ITAMs (do inglês, *immunoreceptor tyrosine-based activating motifs*) (FIGURA 10) (LANIER, 1998; VILCHES e PARHAM, 2002). A molécula *KIR2DL4* é uma exceção, pois possui uma cauda citoplasmática longa e também resíduos carregados positivamente na região transmembrana, associados tanto com ITIM, como com ITAM, e podendo, portanto, atuar

na transdução de sinais ativadores e inibidores, sendo os sinais ativadores predominantes aos inibidores (KIKUCHI-MAKI *et al.*, 2003).

FIGURA 10 - MECANISMO DE AÇÃO DOS RECEPTORES KIR ATIVADORES E INIBIDORES



Quando o receptor KIR inibidor interage com o seu ligante HLA, a família de cinases src (SHP-1 e possivelmente SHP-2, do inglês, *src homology region 2-domain phosphatase 1 e 2*) fosforila os motivos ITIM. SHP-1 é capaz de desfosforilar muitos alvos da via ativadora, e, portanto, mediando o sinal inibidor. Em contraste, quando receptores KIR ativadores ligam-se aos seus ligantes específicos, a família de cinases src fosforila o motivo ITAM que possui a molécula adaptadora DAP-12 que se liga e ativa a família de tirosina cinases Syk que desencadeiam a cascata de ativação. Como os receptores KIR inibidores tem uma afinidade maior pelas moléculas de HLA classe I, a ligação conjunta de receptores ativadores e inibidores, resulta na geração de um sinal negativo e não ativação da citotoxicidade das células NK.

FONTE: ALMEIDA-OLIVEIRA; DIAMOND, 2008.

2.10 HAPLOGRUPOS *KIR*

Devido a extensa variação de ausência e presença de genes, a família *KIR* exibe uma grande quantidade de haplótipos, sendo que cada um dos genes em cada haplótipo pode ainda possuir grande variabilidade alélica (VALIANTE *et al.*, 1997; SHILLING *et al.*, 2002). Essas características de diversidade, associadas à elevada heteroziguidade em

populações, fazem com que seja praticamente impossível encontrar duas pessoas não relacionadas geneticamente que possuam a mesma diversidade *KIR*.

O complexo *KIR* apresenta 15 genes e 2 pseudogenes, sendo que *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* e *KIR3DL3* são genes inibidores e *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*, ativadores (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir> - ROBINSON *et al.*, 2013). *KIR2DL4* transduz tanto sinais ativadores quanto inibidores e *KIR2DP1* e *KIR3DP1* são pseudogenes (TROWSDALE, 2001; VILCHES e PARHAM, 2002).

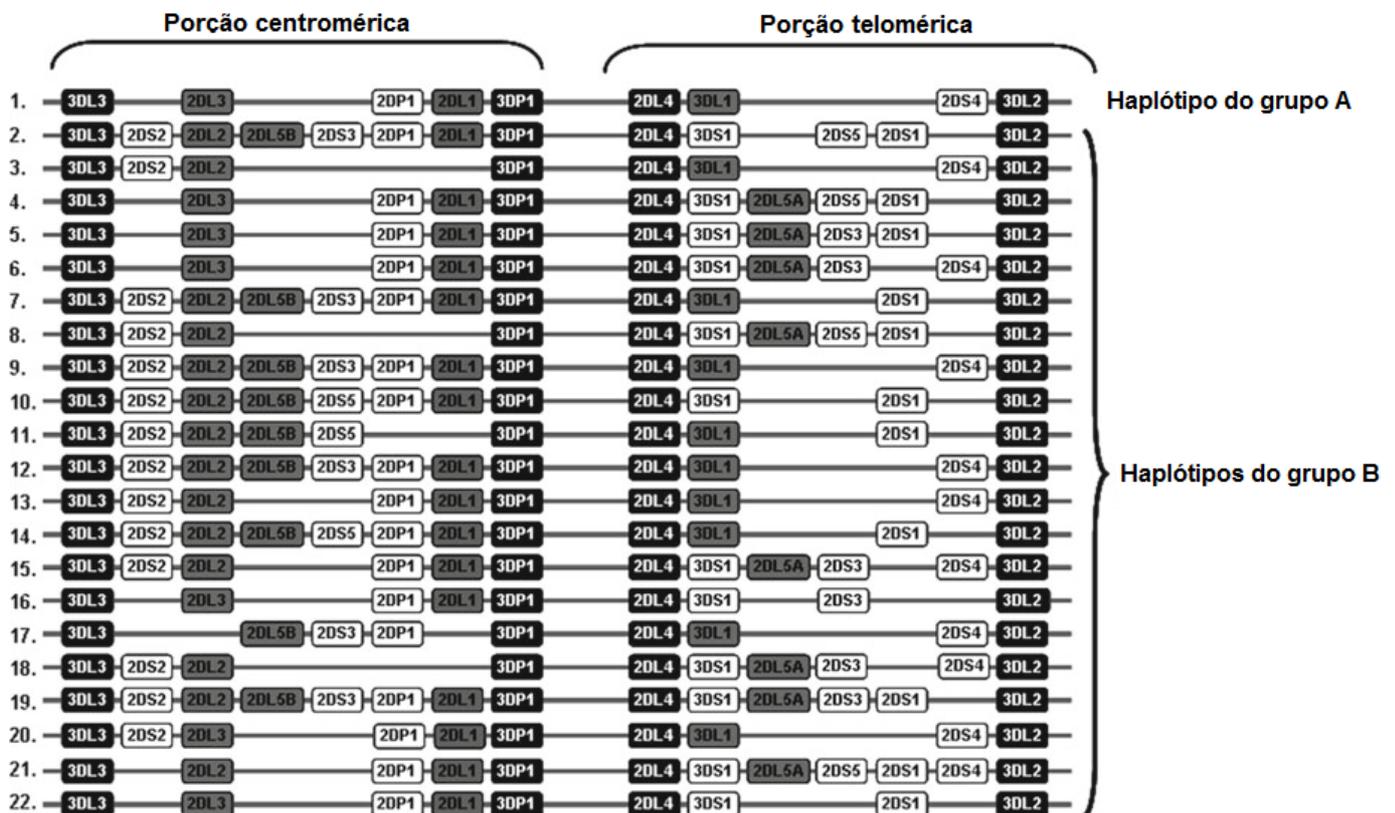
Dentre esses genes e pseudogenes, quatro deles são considerados genes moldura, que estão presentes em praticamente todos os indivíduos: *KIR3DL3* presente na porção terminal centromérica e *KIR3DL2* na região telomérica. Já *KIR3DP1* encontra-se ao centro, juntamente com *KIR2DL4* (WILSON *et al.*, 2000; VILCHES e PARHAM, 2002; HSU *et al.*, 2002) (FIGURA 11).

De acordo com o conteúdo gênico, dois grupos de haplótipos *KIR* podem ser encontrados: haplogrupo A e haplogrupo B (VALIANTE *et al.*, 1997). O haplogrupo A normalmente tem uma menor variação quanto à sua organização gênica, sendo sua diversidade ditada majoritariamente pela diversidade alélica. Ele possui, além dos quatro genes moldura, os genes *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4* e *KIR2DP1*. Como característica marcante desse haplogrupo, está a presença de somente um gene codificando um receptor ativador clássico, o gene *KIR2DS4*, além de *KIR2DL4* que é um gene moldura que promove sinais ativadores e inibidores. Contudo, a descrição de um alelo nulo de *KIR2DS4* apresentando frequência de 80% em uma população irlandesa (MAXWELL *et al.*, 2002) e a existência de um grande número de alelos não funcionais para *KIR2DL4*, causados por deleções que alteram o quadro de leitura (YAWATA *et al.*, 2002), fez concluir que, como o haplótipo A carrega apenas dois genes capazes de exercer função ativadora (*KIR2DS4* e *KIR2DL4*), muitos indivíduos homocigotos para este haplótipo não apresentam nenhum gene *KIR* ativador (HSU *et al.*, 2002; KIKUCHI-MAKI *et al.*, 2003).

Em contraste, o haplogrupo B contém muitos haplótipos que diferem quanto ao conteúdo gênico e é caracterizado pela presença de um ou mais dos seguintes genes: *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e os pseudogenes *KIR2DP1* e *KIR3DP1* (UHRBERG; PARHAM e WERNET, 2002; ROBINSON *et al.*, 2010). Esse haplogrupo

possui de um a cinco *KIR* ativadores de cauda curta e pode incorporar genes inibidores ausentes no haplogrupo A, como *KIR2DL2* e *KIR2DL5* (VALIANTE *et al.*, 1997). Dessa forma, todas as outras combinações existentes que não a formada pelos genes do haplogrupo A, enquadram-se como haplogrupo B. Na FIGURA 11, pode-se observar os diferentes haplótipos encontrados em estudos de segregação em famílias, sendo que os haplótipos do grupo A mudam muito pouco em termos de conteúdo gênico, enquanto que há centenas de combinações de genes possíveis para o grupo B.

FIGURA 11 - DIFERENTES HAPLÓTIPOS *KIR* DETERMINADOS POR ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO FAMILIAR



1. Representa o haplótipo do grupo A e os haplótipos restantes pertencem ao grupo B. O haplótipo A possui, em geral, uma menor variação quanto a sua organização gênica, enquanto que há diversas combinações de haplótipos do grupo B. Os genes moldura, presentes em praticamente todos os haplótipos estão em preto, genes *KIR* ativadores estão em branco e aqueles que codificam para receptores inibidores estão em cinza. *KIR2DP1* e *KIR3DP1* são pseudogenes que não codificam receptores.

FONTE: Adaptado de RAJALINGAM, 2012.

Todas as populações humanas possuem tanto haplótipos do grupo A, quanto do B, mas sua distribuição varia consideravelmente entre as diferentes populações. Indivíduos homocigotos *AA* e homocigotos *BB* são igualmente frequentes na população europeia e, portanto, os haplótipos A e B tem uma distribuição semelhante nessa

população (UHRBERG *et al.*, 1997). Já nas populações asiáticas, como japoneses, chineses e coreanos, sabe-se que a frequência do haplogrupo A é muito elevada, gerando uma grande quantidade de homocigotos AA (YAWATA *et al.*, 2002; WHANG *et al.*, 2005). Indivíduos heterocigotos AB ou homocigotos BB são mais comuns em nativos das Américas (GENDZEKHADZE *et al.*, 2006; EWERTON *et al.*, 2007), Austrália e Índia (HSU *et al.*, 2002; RAJALINGAM *et al.*, 2008). As células NK de indivíduos portadores de haplótipos do grupo B, apresentam em sua superfície mais receptores KIR ativadores e, teoricamente, respondem mais vigorosamente a patógenos. Rajalingam e colaboradores (2008) sugeriram que as altas frequências de haplótipos do grupo B em populações da Índia, Austrália e Américas foram consequência de seleção natural, uma vez que maior quantidade de genes ativadores favoreceria a sobrevivência frente aos grandes desafios ambientais que essas populações sofreram durante suas extensas migrações e exposições a patógenos. Essa hipótese não pôde ser corroborada em populações isoladas do Brasil. Augusto e colaboradores (2015) demonstraram que a grande variação de frequências de haplogrupos B em populações ameríndias era mais compatível com deriva genética do que seleção natural.

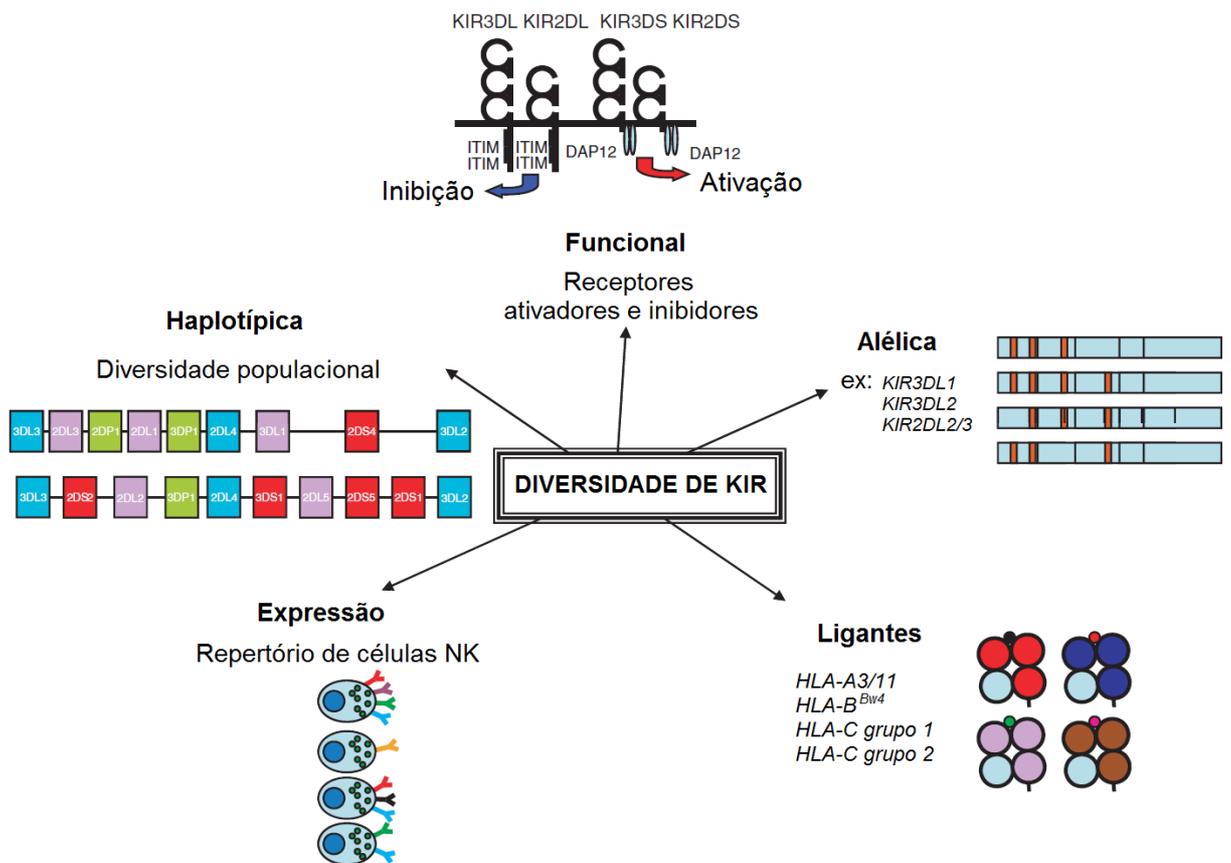
2.11 EXPRESSÃO CLONAL DOS RECEPTORES KIR

Além da variação do conteúdo de genes *KIR* de indivíduo para indivíduo, e da extensa variabilidade alélica encontrada nesses genes, o padrão de apresentação dos receptores KIR na superfície de cada célula também varia. Isso resulta em diferentes repertórios de receptores KIR na superfície das células NK. Os receptores KIR possuem uma distribuição diferente em cada clone de células NK maduras, de modo que cada célula NK de um indivíduo não apresenta todo o conjunto de receptores codificados por todos os genes *KIR* presentes no genoma, mas apenas uma parte deles em uma combinação aleatória. Esse fenômeno é semelhante ao que ocorre com os receptores de células B e T. Entretanto, enquanto o repertório de receptores de células B e T são gerados através de recombinação somática e subsequente apresentação de um único receptor por célula, o conjunto de receptores KIR na superfície de cada NK é gerado através da expressão de diferentes combinações de genes *KIR* em diferentes células NK (VALIANTE *et al.*, 1997; UHRBERG, MARKUS, 2005). Cada célula NK apresenta de um a oito diferentes receptores (UHRBERG, MARKUS, 2005). A distribuição de KIR nas células NK parece ser amplamente estocástica: a frequência com que uma célula NK

coexpressa dois receptores KIR geralmente é igual ao produto das frequências de expressão individuais de ambos os receptores. Essa diversidade combinatória leva a uma ampla gama de especificidades de células NK funcionais, que podem ser críticas para uma detecção rápida e sensível de níveis alterados de HLA nas células alvo (SANTOURLIDIS *et al.*, 2002; UHRBERG, MARKUS, 2005).

A FIGURA 12 demonstra não só a expressão clonal dos receptores KIR nas células NK, formando diferentes repertórios de NK, mas também resume todos os outros níveis de diversidade KIR que podem ser encontrados e que foram explicados anteriormente. Toda essa diversidade de KIR pode causar grande impacto funcional nas células NK, afetando a resposta e o nível de atividade dessas células (VALIANTE *et al.*, 1997).

FIGURA 12 - DIFERENTES NÍVEIS DE DIVERSIDADE DOS GENES KIR



FONTE: Adaptado de CHEENT; KHAKOO, 2009.

2.12 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *KIR*

Os fatores que controlam a expressão dos genes *KIR* ainda não são bem compreendidos. Os progressos na elucidação de como os genes *KIR* são regulados tem sido limitados devido à alta complexidade do *loci* dos genes *KIR* e ao fato desses genes não estarem presentes em modelos de roedores, os quais são passíveis de manipulação genômica.

Em humanos, existe um promotor bidirecional proximal conservado na maioria dos genes *KIR*. Algumas evidências apontam que esses promotores controlam a expressão de *KIR* na superfície das células NK por meio da troca da direção da transcrição durante o desenvolvimento destas células (DAVIES *et al.*, 2007). Nesse sentido, Davies e colaboradores (2007) observaram que a atividade do promotor pode ser influenciada por sequências flanqueadoras, sendo os sítios de ligação para os fatores de transcrição 5'-YY1 (Yin Yang 1) e 3'-Sp 1 (proteína de especificidade 1) importantes na modulação da atividade transcricional. Em geral, a ausência de ligação de 5'-YY1 promove uma atividade mais forte do promotor reverso, o mesmo acontece com a ligação de 3'-Sp1, resultando em um aumento dos níveis de transcritos reversos (DAVIES *et al.*, 2007; ANDERSON, 2014). Os mesmos autores observaram que transcritos reversos são encontrados em células NK imaturas que não apresentam *KIR* em sua superfície. Estes mesmos transcritos reversos estão ausentes em células NK maduras que apresentam *KIR* em sua superfície, sugerindo que a transcrição reversa bloqueia a ativação do gene em células NK precursoras e imaturas. Portanto, dependendo da afinidade de ligação entre os fatores de transcrição competitivos envolvidos, pode ou não ocorrer a expressão do gene. Isso resulta em expressão e repertório variado de subpopulações de células NK que apresentam diferentes combinações de receptores de superfície e são capazes de responder a uma grande variabilidade de estímulos (KULKARNI *et al.*, 2008; ANDERSON, 2014).

Apesar desses achados, o alinhamento de uma sequência de 460 pb de 15 diferentes regiões promotoras de genes *KIR* demonstrou 91% de similaridade. Portanto, o elevado nível de similaridade entre as regiões promotoras fornece poucas pistas de como os fatores de transcrição podem ser específicos para expressão dos diferentes genes *KIR* (TROWSDALE *et al.*, 2001). Então, acredita-se que, além da presença do promotor proximal bidirecional, outros fatores alterem a expressão desses genes. Outra

hipótese sugere que a metilação dos sítios promotores em ilhas CpG estaria controlando a transcrição diferenciada desses genes em subconjuntos de células NK (SANTOURLIDIS *et al.*, 2002). A metilação do DNA tem o potencial de diversificar a expressão de células individuais da mesma linhagem. Santourlidis e colaboradores (2002) demonstraram que pequenas ilhas CpG em torno do sítio de início de transcrição de cada gene *KIR* são constantemente desmetiladas em genes *KIR* expressos e metiladas em genes *KIR* não expressos, concluindo que o padrão clonal da expressão de genes *KIR* é principalmente determinado e mantido por processos epigenéticos através da metilação do DNA (SANTOURLIDIS *et al.*, 2002).

Além dessas hipóteses, a identificação de variantes *KIR2DL5* não expressas levaram Vilches e colaboradores (2000) a sugerir que uma mutação em um sítio de ligação de fator de transcrição de AML1 (do inglês, *acute myeloid leucemia 1 protein*) pode impedir essas variantes de serem expressas. O sítio de ligação de AML1 é conservado entre todos os outros promotores *KIR*, com exceção de *KIR2DL5*. Esse fator de transcrição AML1 controla a expressão e função de diversos genes que são essenciais para o desenvolvimento e função de células hematopoiéticas, incluindo aqueles que codificam receptores de linfócitos B e T e granzima B, protease que está presente nos grânulos líticos de células NK, uma indicação da atividade de AML1 nessas células (VILCHES *et al.*, 2000; TROWSDALE *et al.*, 2001).

Por fim, um último estudo demonstrou que todos os genes *KIR* possuem uma região intergênica de 2 Kb a montante do sítio de início da tradução, com exceção de *KIR2DL4*, o qual possui uma região de 14 Kb (CICHOCKI *et al.*, 2009). Além disso, foi observada a existência de elementos promotores distais e transcritos de *splicing* originados desses elementos distais. Devido ao fato de o promotor distal conter um sítio de ligação ao fator de transcrição c-Myc, foi hipotetizado que c-Myc pode ligar-se ao elemento promotor distal e diretamente afetar a expressão dos genes *KIR*, já que c-Myc é um fator de transcrição que se liga a motivos de DNA e resulta em ativação transcricional ou silenciamento de genes alvo (CICHOCKI *et al.*, 2009).

Nota-se que ainda não há um consenso, tampouco somente um mecanismo descrito, para a regulação da expressão desses genes. Entretanto, diversos grupos têm estudado e criado hipóteses para o mecanismo de regulação com a finalidade de esclarecer esse fenômeno.

2.13 GENES *KIR* E SEU PAPEL NAS DOENÇAS

2.13.1 *KIR* e vírus da imunodeficiência humana (HIV)

Foi observado que nos indivíduos infectados com HIV (do inglês *human immunodeficiency virus*), a combinação do receptor *KIR3DS1* com o seu ligante específico HLA-Bw4 está associada à progressão mais lenta da infecção, menor carga viral e proteção contra infecções oportunistas (MARTIN *et al.*, 2002; QI *et al.*, 2006). As células NK que apresentam *KIR3DS1* em sua superfície inibem fortemente a replicação do vírus em células que apresentam o ligante HLA-Bw4 quando comparadas às células NK que não apresentam *KIR3DS1*, demonstrando a influência de *KIR3DS1* e seu ligante HLA-Bw4 na atividade anti-HIV. Long e colaboradores (2008) observaram que a presença de *KIR3DS1* está associada a função efetora aumentada das células NK, produzindo altos níveis de IFN- γ e, conseqüentemente, maior citotoxicidade dessas células.

Outros dados importantes são relativos a *KIR3DL1* na presença do mesmo ligante HLA-Bw4. O gene *KIR3DL1* possui marcante diversidade alélica, sendo que seus alelos têm padrões diferenciais de expressão nas células NK, podendo ser agrupados em alelos de alta e baixa expressão (*KIR3DL1*high*, do inglês alto e *KIR3DL1*low*, do inglês baixo, respectivamente) e variantes que não apresentam *KIR3DL1* (*KIR3DL1*004*) (GARDINER *et al.*, 2001). Os alelos *KIR3DL1*h* (**001*, **002*, **008*, **009*, **015*) demonstraram afinidade maior pelos ligantes HLA-Bw4 e dessa interação, resultou uma maior inibição da citotoxicidade pelas células NK. Indivíduos que possuíam esses alelos demonstraram menor carga viral e progressão mais lenta da infecção quando comparados a outras combinações de genótipos *KIR3DL1/HLA-B* (MARTIN *et al.*, 2007). Embora esses resultados pareçam contradizer o modelo anterior, no qual a ativação das células NK é protetora, na verdade, demonstram a importância da inibição das células NK para sua educação. Sabe-se, que as interações entre os receptores *KIR* inibidores e moléculas HLA de classe I são importantes em estabelecer tolerância às células saudáveis, assim como permitir a ativação de células NK maduras. Esses resultados indicam, portanto, que interações mais fortes e mais inibidoras conferidas pelo receptor *KIR3DL1* e seu ligante específico durante o desenvolvimento das células NK, permite uma resposta mais violenta dessas células quando ocorre a diminuição ou a perda da expressão de HLA durante a infecção viral, tornando o ataque das células NK mais apropriado (KIM *et al.*, 2005; ANFOSSI *et al.*, 2006).

2.13.2 Doenças autoimunes

Em geral, os genes *KIR* ativadores parecem aumentar a resposta autoimune, sendo considerados fatores de risco em diversos estudos. Haplótipos que conferem maior grau de ativação, como os haplótipos do grupo B, foram associados com maior suscetibilidade a maioria das doenças autoimunes, enquanto que haplótipos que conferem maior inibição (ausência de receptores *KIR* ativadores), como os haplótipos do grupo A, são protetores (NELSON *et al.*, 2004).

Foi observado que a frequência de *KIR2DS2* estava aumentada em pacientes com artrite reumatoide (revisado em KULKARNI *et al.*, 2008). Além disso, indivíduos portadores de haplótipos do grupo B e indivíduos portadores de *KIR2DS1* sozinho ou em combinação com seu ligante HLA-Cw6, foram associados a um maior risco de desenvolver psoríase (revisado em KULKARNI *et al.*, 2008).

O oposto é observado na doença pênfigo foliáceo (PF). O PF é uma doença autoimune, na qual há formação de autoanticorpos contra a desmogleína 1, uma glicoproteína constituinte dos desmossomos da epiderme (CHIDGEY, 2002). Augusto e colaboradores (2012) encontraram que *KIR3DS1* e HLA-Bw4 estão associados com proteção contra PF, tanto isolados quanto combinados, mas uma maior significância foi encontrada na presença de ambos juntos ($OR = 0,34$, $p < 10^{-3}$). Nesse mesmo estudo, os autores também encontraram que a presença de três ou mais genes *KIR* ativadores confere proteção contra PF ($OR = 0,44$, $p = 0,001$). Algumas particularidades do PF poderiam explicar o porquê da função ativadora de *KIR* ser protetora contra a doença. Diferentemente das outras doenças autoimunes, PF apresenta alta incidência e prevalência em algumas áreas endêmicas do Brasil. Essa característica incomum mostra que um (ou mais) fatores ambientais podem ser o gatilho necessário para desencadear a doença. Há evidências de que um mosquito, da família *Simuliidae*, pode estar envolvido na infecção, contribuindo com uma proteína, vírus ou micro-organismo, o qual poderia iniciar a resposta autoimune em indivíduos geneticamente suscetíveis (AOKI *et al.*, 2004). Além disso, outros fatores também estão associados ao PF, como a baixa qualidade de vida, a proximidade a rios, alguns tipos de comida, entre outros, sendo que os pacientes estão normalmente expostos a esse contexto ambiental durante sua vida toda. Portanto, a presença de mais genes *KIR* ativadores, poderia estar influenciando na ativação das

células NK, representando uma melhor proteção contra vírus, micro-organismos ou outros fatores ambientais que estariam ajudando a desencadear o PF.

2.13.3 Câncer

O impacto do polimorfismo de *KIR* em câncer foi revisado recentemente por Augusto (2016). Nos tumores, a perda ou a diminuição da expressão de moléculas HLA de classe I tem papel fundamental para o reconhecimento e eliminação dessas células pelas NK. De um modo geral, a diminuição da expressão de moléculas HLA na superfície das células neoplásicas leva a ausência da interação entre receptores inibidores e seus ligantes HLA e promove a ativação das NK e consequente eliminação da célula tumoral.

O primeiro estudo demonstrando a importância do polimorfismo de presença e ausência de *KIR* nas leucemias associou *KIR2DL2* ao maior risco de desenvolver este câncer (VERHEYDEN *et al.*, 2004). Contrastando esse estudo, Middleton e colaboradores (2009) encontraram que *KIR2DL2* protege contra o desenvolvimento da leucemia. Nenhum desses resultados puderam ser corroborados por Zhang e colaboradores (2010). Outros estudos mais recentes foram realizados e não encontraram nenhuma associação entre presença e ausência de *KIR* e leucemia (BABOR *et al.*, 2012; OEVERMANN *et al.*, 2015). Por fim, Smith e colaboradores (2014) sugeriram que a importância de *KIR* na leucemia varia entre diferentes grupos étnicos.

O câncer de mama também foi analisado quanto ao polimorfismo de presença e ausência de *KIR*. Ozturk e colaboradores (2012) encontraram *KIR2DS1* associado com maior risco no desenvolvimento de câncer de mama ($p = 0,03$) e frequências de *KIR2DL1* aumentada no grupo controle ($p = 0,02$) quando comparado ao grupo de pacientes. Entretanto, esses achados não puderam ser confirmados por um estudo maior realizado com uma população predominantemente euro-descendente do Brasil (JOBIM *et al.*, 2013).

Para o melanoma foi observado que altos níveis de inibição mediada por genes *KIR*, podem facilitar a fuga do tumor. O genótipo *KIR2DL2/KIR2DL3/HLA-C1* é mais frequente em pacientes do que quando comparados a controles (revisado em KULKARNI *et al.*, 2008).

Panorama diferente é visto nas neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC). Indivíduos com o haplótipo A, nos quais predomina geração de sinais inibidores, levam a proteção ao desenvolvimento da patologia. Nesse caso, a ativação excessiva das células NK pode contribuir para um estado de inflamação crônica em resposta ao papiloma vírus

humano, o principal agente causador do câncer do colo do útero (CARRINGTON *et al.*, 2005).

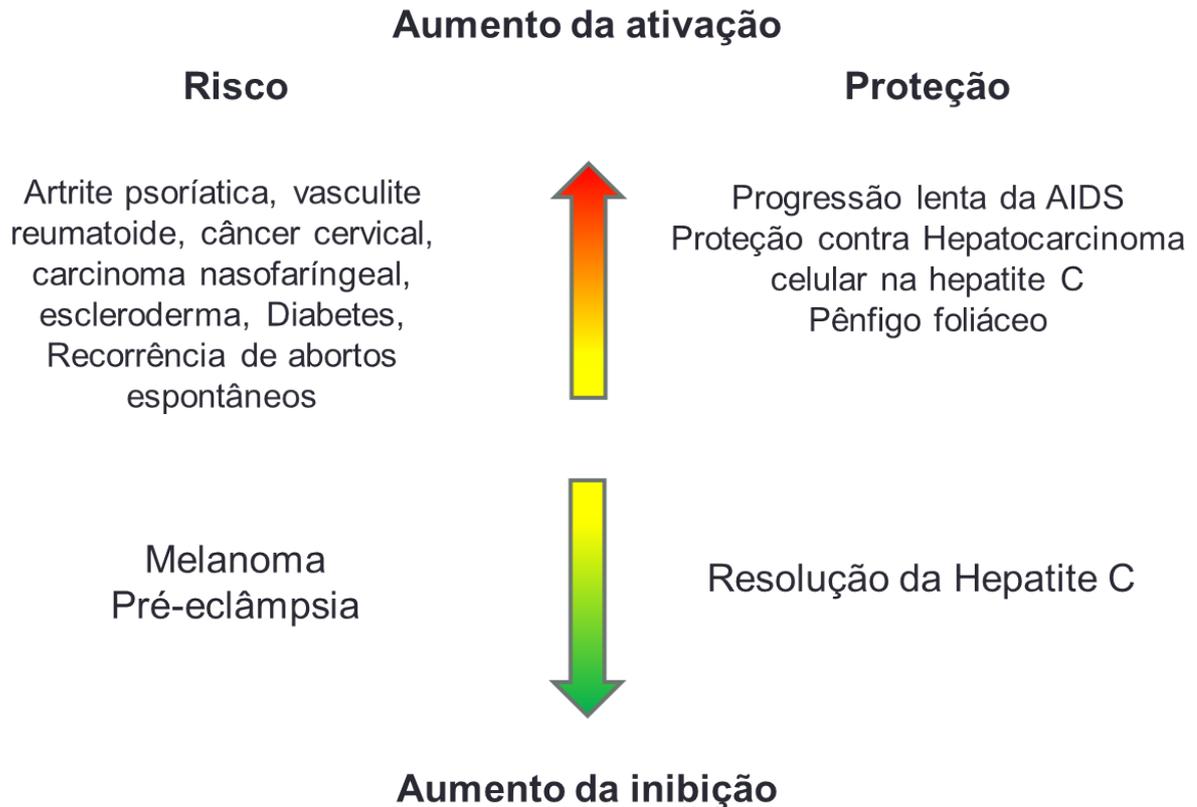
Dada a importância das células NK e dos seus receptores no reconhecimento da diminuição da expressão de moléculas HLA nas células alvo tumorais, seria esperado que o polimorfismo de presença e ausência de *KIR* influenciasse amplamente a resposta aos diversos cânceres. Entretanto, as evidências para isso não são tão fortes assim. Como dito, vários estudos têm sido realizados com o intuito de esclarecer o papel de *KIR* no câncer, dos quais muitos foram realizados com amostras muito pequenas, mal caracterizadas e não foram replicados em outras populações. Portanto, não há trabalhos suficientes, com amostras populacionais homogêneas e bem caracterizadas, que possam revelar o real impacto do polimorfismo de presença e ausência de *KIR* no desenvolvimento dos tumores (AUGUSTO, 2016).

2.13.4 Reprodução

Observou-se nas mulheres com pré-eclâmpsia uma predominância do haplogrupo A em homozigose (haplótipo com maior quantidade de genes inibidores), o que sugere que a forte inibição das células NK uterinas impede o remodelamento dos vasos sanguíneos maternos. Por outro lado, a diminuição da frequência de genes *KIR* inibidores ou o aumento do número de ligantes *KIR*-HLA ativadores estão associados com abortos espontâneos e recorrência de abortos (HIBY *et al.*, 2004). Portanto, há a necessidade de um balanço fino entre os níveis de ativação e inibição para o sucesso reprodutivo, no qual tanto a extensiva ativação, como a excessiva inibição das células NK podem ser prejudiciais na manutenção da gravidez (HIBY *et al.*, 2004).

Na FIGURA 13 pode-se observar um resumo das diversas patologias que estão associadas ao aumento ou diminuição da ativação das células NK pelos receptores *KIR*.

FIGURA 13 - ASSOCIAÇÕES ENCONTRADAS COM O AUMENTO/DIMINUIÇÃO DA ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS NK PELOS RECEPTORES KIR EM DIFERENTES DOENÇAS



Os sinais gerados pela interação entre os receptores KIR e as moléculas HLA classe I, afetam a resposta das células NK, as quais podem levar a suscetibilidade diferencial às doenças.

FONTE: Adaptado de KULKARNI *et al.*, 2008.

2.13.5 Genes *KIR* e seu papel nos transplantes

O transplante é o processo de retirada de células, tecidos ou órgãos, chamados de enxerto, de um indivíduo e a sua inserção no mesmo indivíduo (enxerto autólogo ou auto-enxerto) ou em um indivíduo diferente da mesma espécie (enxerto alogênico ou aloenxerto). Na prática clínica, o transplante é utilizado para suprir um déficit funcional ou anatômico no receptor e essa abordagem vem crescendo sistematicamente nos últimos 40 anos.

Uma grande consequência dos transplantes é que limita o seu sucesso, é a rejeição do órgão por parte do sistema imune do receptor. A rejeição ocorre quando há uma resposta de células T do receptor às moléculas HLA “estranhas” (alogênicas) presentes no enxerto. Entretanto, apesar da rejeição ser um processo majoritariamente dependente de células T, sabe-se que a atividade aumentada de células NK pode estar

envolvida com a destruição do aloenxerto e aumento da inflamação (NEMLANDER *et al.*, 1983; BALDWIN *et al.*, 2001).

Em humanos, o aumento do número de células NK circulantes foi observado durante a rejeição aguda de aloenxertos renais e cardíacos (COOKSEY *et al.*, 1984; PETERSSON *et al.*, 1997). Observou-se que logo após o transplante renal, as células NK são ativadas, mesmo apesar da forte imunossupressão, sugerindo que a ação citotóxica destas células do paciente contra células do doador possa ser um alvo do processo de rejeição. Os pacientes que apresentaram um acréscimo na reatividade pós-transplante possuíam um número maior de genes *KIR* ativadores para ligantes HLA classe I do doador quando comparados com aqueles que não apresentaram acréscimo de reatividade (VAMPA *et al.*, 2003).

Portanto, além de estarem associados a doenças complexas, virais e manutenção da gravidez, as células NK e, conseqüentemente, os receptores KIR, também podem ter participação na rejeição de transplantes. Isto demonstra a necessidade e importância em se parear doadores e receptores não só em função do genótipo *HLA*, mas também levando em consideração os genes *KIR* (FLODSTROM *et al.*, 2002).

2.14 *KIR3DL2*

O gene que codifica a molécula *KIR3DL2* (cd158k) está presente na região telomérica em praticamente todos os haplótipos *KIR* e, portanto, é referido como gene moldura (WILSON *et al.*, 2000; VILCHES e PARHAM, 2002; HSU *et al.*, 2002). Ele codifica uma molécula que possui 70 kDa, com três domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulinas (D0, D1 e D2), uma cauda citoplasmática longa e dois motivos inibidores baseados em tirosina e, portanto, gera sinais inibidores. Estudos apontam que os principais ligantes de *KIR3DL2* são moléculas HLA-A3, HLA-A11 e, mais recentemente descritos, HLA-B27, moléculas de HLA classe I de conformação aberta e, por fim, HLA-F (HANSASUTA *et al.*, 2004; CAULI *et al.*, 2013; GOODRIDGE *et al.*, 2013; RYSNIK *et al.*, 2016).

Esse é o gene *KIR* mais longo, com 16.776 pares de bases, nove éxons, e é também o segundo gene mais polimórfico e polialélico da família, com 86 alelos descritos (VILCHES e PARHAM, 2002; ROBINSON *et al.*, 2010). Em geral, os alelos *KIR3DL2*001*, *KIR3DL2*002* e *KIR3DL2*007* são os mais frequentemente encontrados nas populações mundiais, incluindo estudo realizado na região sudeste do Brasil (MIDDLETON *et al.*,

2008) e populações ameríndias brasileiras, sendo que em duas destas, Kaingang de Ivaí e Guarani M'bya (KIV e GRC, respectivamente), o alelo *KIR3DL2*010* também é frequentemente encontrado (AUGUSTO, 2012).

Tanto interações entre o receptor codificado por esse gene e seus ligantes, quanto as diferentes variantes do gene foram associadas a diversas doenças e também no diagnóstico diferencial. A presença de KIR3DL2 na superfície das células NK é utilizada no diagnóstico diferencial da síndrome de Sézary e outras doenças eritrodérmicas benignas, doenças que dificilmente são diferenciadas devido a pouca especificidade de resultados histológicos (ORTONNE *et al.*, 2008).

Na espondilite anquilosante, a molécula HLA-B27 está fortemente associada à doença (BROWN *et al.*, 1996). Os receptores KIR3DL1 e KIR3DL2 ligam-se a HLA-Bw4, epítipo presente na molécula HLA-B27, com exceção de HLA-B*27:08. Harvey e colaboradores (2009) observaram um maior número de células NK que expressam KIR3DL2 nas células mononucleadas do sangue periférico e fluido sinovial de pacientes com espondilite anquilosante (HARVEY *et al.*, 2009). Portanto, devido ao fato da ligação de KIR3DL2 e seus ligantes contribuírem para a inibição de citotoxicidade, foi sugerido que estas interações promoveriam a sobrevivência de leucócitos pró-inflamatórios em pacientes com essa enfermidade, estando associados positivamente com o desenvolvimento da doença (WONG-BAEZA *et al.*, 2013).

A diversidade alélica desse gene já foi associada à susceptibilidade a malária (ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.*, 2003), pré-eclâmpsia (WANG *et al.*, 2011) e também ao pênfigo foliáceo (AUGUSTO *et al.*, 2015). Na malária foi observado que indivíduos portadores do alelo *KIR3DL2*002* secretam maiores níveis de IFN- γ em resposta às células infectadas com *P. falciparum*.

Na pré-eclâmpsia (PE), observou-se que o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês, *single nucleotide polymorphism*) 1190C>T (*rs3745902*), localizado na cauda citoplasmática do receptor de KIR3DL2, tem uma tendência a associação com PE. O alelo T que codifica uma metionina é mais frequente no grupo controle do que no grupo de mulheres com pré-eclâmpsia, indicando uma tendência protetora deste alelo (*OR* = 0,694; *p* = 0,064) (WANG *et al.*, 2011).

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa com o pênfigo foliáceo já haviam encontrado associação entre a presença de mais de três genes *KIR* ativadores e proteção ao PF. Além disso, outro estudo recente do grupo encontrou que o alelo *KIR3DL2*001*

tem sua frequência aumentada em pacientes, conferindo um maior risco à doença ($OR = 2,04$; $p = 0,007$). Esse risco é ainda maior na presença de HLA-A3 ou HLA-A11 ($OR = 3,76$ $p = 0,013$), ligantes específicos de KIR3DL2. Por isso, sugeriu-se que o alelo *KIR3DL2*001* era mais inibidor que os demais, e, portanto, levando a maior suscetibilidade a patologia (AUGUSTO *et al.*, 2015).

O SNP 1190C>T (*rs3745902*) foi associado a proteção ao PF ($OR = 0,52$; $p = 0,018$). Indivíduos que tem a metionina nessa posição (1190T) exibiram uma menor quantidade de células NK 3DL2 positivas e também uma menor intensidade de fluorescência de KIR3DL2 quando analisados por citometria de fluxo. Sugeriu-se que a presença da variante 1190T permite uma menor geração de sinais inibidores, demonstrando que além desse alelo marcar a expressão diferencial de *KIR3DL2* está associado a proteção ao PF (AUGUSTO *et al.*, 2015).

Dada a importância da variabilidade desse gene para diferentes doenças e que o polialelismo pode afetar o nível de expressão gênica diferencial resultando em suscetibilidade diferencial às patologias, o intuito desse trabalho foi primeiramente caracterizar a diversidade alélica de *KIR3DL2* na população de Curitiba e região metropolitana. Tendo a caracterizado, verificar os níveis de expressão diferencial dos alelos mais frequentes encontrados, os quais podem ter um impacto direto nos mecanismos que desencadeiam as doenças, inclusive o PF, o qual motivou esse estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar se o polimorfismo alélico de *KIR3DL2* impacta na sua expressão gênica diferencial.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a diversidade alélica do gene *KIR3DL2* em uma amostra da população de euro-descendentes de Curitiba e região metropolitana;
- Comparar as frequências alélicas obtidas com as descritas em outras populações;
- Avaliar se há diferença nos níveis de expressão entre portadores de diferentes alelos de *KIR3DL2*;
- Verificar se a presença dos ligantes específicos de *KIR3DL2* influencia os níveis de expressão diferencial desse receptor na superfície das células NK;
- Verificar se a presença dos ligantes específicos de *KIR3DL2* influencia na quantidade de células NK *KIR3DL2* positivas;
- Analisar se há correlação entre os níveis de expressão diferencial dos alelos de *KIR3DL2* e os níveis de expressão diferencial dos alelos de *HLA-A*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Amostras de DNA genômico de 175 indivíduos pertencentes ao Biorrepositório do Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) foram selecionadas. A coleta do material biológico destes indivíduos foi realizada previamente por integrantes do grupo. Entretanto, para complementar a amostra procedeu-se à coleta de 8 mL de sangue periférico de outros 60 indivíduos, totalizando 235 indivíduos analisados. Utilizou-se, como critérios de inclusão para escolha das amostras, indivíduos euro-descendentes, saudáveis e residentes em Curitiba e região metropolitana.

Devido a metodologia baseada em sequenciamento utilizada no presente estudo não conseguir distinguir alguns genótipos, pelo desconhecimento da fase de alguns sítios variantes, coletou-se sangue periférico de outros 18 indivíduos, familiares daqueles em que as ambiguidades ocorreram. A análise desses indivíduos foi feita somente para investigação da fase das variantes e solução das ambiguidades e foram, portanto, excluídas das análises de cálculo de frequência alélica e genotípica. Essa exclusão deu-se por conta do grau de parentesco entre os indivíduos, levando a uma maior probabilidade de encontrar um indivíduo que tenha dois alelos idênticos por descendência e, conseqüentemente, podendo aumentar a frequência de determinados alelos, fazendo com que a amostra deixasse de representar a população em questão.

Importante salientar que, dos 235 indivíduos que fazem parte desse estudo, 115 foram genotipados por sequenciamento no trabalho de tese do Dr. Danillo G. Augusto, no Instituto Nacional do Câncer (NCI, do inglês, *National Cancer Institute*).

Os termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE; ANEXO 1) foram assinados de modo que os participantes admitiram, voluntariamente, a utilização das amostras de sangue no projeto de pesquisa. O projeto foi registrado sob o número: 02727412.4.00000096 para a Certificação de apresentação para apreciação ética (CAAE). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Humanos da Universidade Federal do Paraná e o parecer de aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) é de número 505.988.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA dos 175 indivíduos já pertencentes ao Banco de amostras do LGMH foi extraído a partir do sangue total, através do método fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (SAMBROOK *et al.*, 1989). Já para extração do DNA das 82 amostras coletadas posteriormente, utilizou-se o kit de extração *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega), de acordo com instruções do fabricante. A concentração de todas as soluções de DNA uso foram ajustadas para 20 ng/μL.

4.3 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram a presença de *KIR3DL2* em 100% dos haplótipos dos indivíduos analisados na população em questão (AUGUSTO, 2012). Para a amplificação dos éxons 3, 4, 5, 7, 8 e 9 do gene *KIR3DL2*, além dos introns 7 e 8 (FIGURA 14), empregou-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*). No total, foram necessárias 4 reações de amplificação. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para cada um dos fragmentos, desenhados por Augusto (2012), anelam-se nas posições indicadas na FIGURA 14 e suas sequências encontram-se na TABELA 2.

FIGURA 14 - ORGANIZAÇÃO DO GENE *KIR3DL2*



Os números representam o tamanho, em pares de base, dos éxons e dos introns. A correlação entre os éxons e os domínios da proteína também são demonstrados, além da posição de anelamento aproximada dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no presente estudo. A figura não está em escala.
 FONTE: Adaptado de Augusto, 2012.

TABELA 2 - DESCRIÇÃO DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DE CADA ÉXON E SUAS RESPECTIVAS TEMPERATURAS DE FUSÃO (T_m) E TAMANHOS DE FRAGMENTOS GERADOS, EM PARES DE BASE

Éxons	ID oligonucleotídeo	Sequência 5' - 3'	Direção	T _m (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
3	3DL2_ex2_775_Fwd	AGGGGGCCTGGCCACT	<i>Forward</i>	60	1198
	3DL2_int3_1973_Rev	GTTTACAATGTAGCCATCATTGGC	<i>Reverse</i>		
4	3DL2ex4.5	TCCCTCCTGGCCCACCCAGGG	<i>Forward</i>	58	283
	3DL2ex4.3-2	CTGTGATCACGATGTCCAGG	<i>Reverse</i>		
5	3DL2.ex5.5	GACCTTGTCTGTAGCTCCT	<i>Forward</i>	65	192
	3DL2_KIR20.3	CACACGCAGGGCAGGG	<i>Reverse</i>		
7,8 e 9	3DL2ex7.5	GTATCTGCAGACACCTGCAT	<i>Forward</i>	58	983
	3DL2ex9.3-2	CAGCTGCTGGTTCATTGGAT	<i>Reverse</i>		

FONTE: Adaptado de Augusto, 2012.

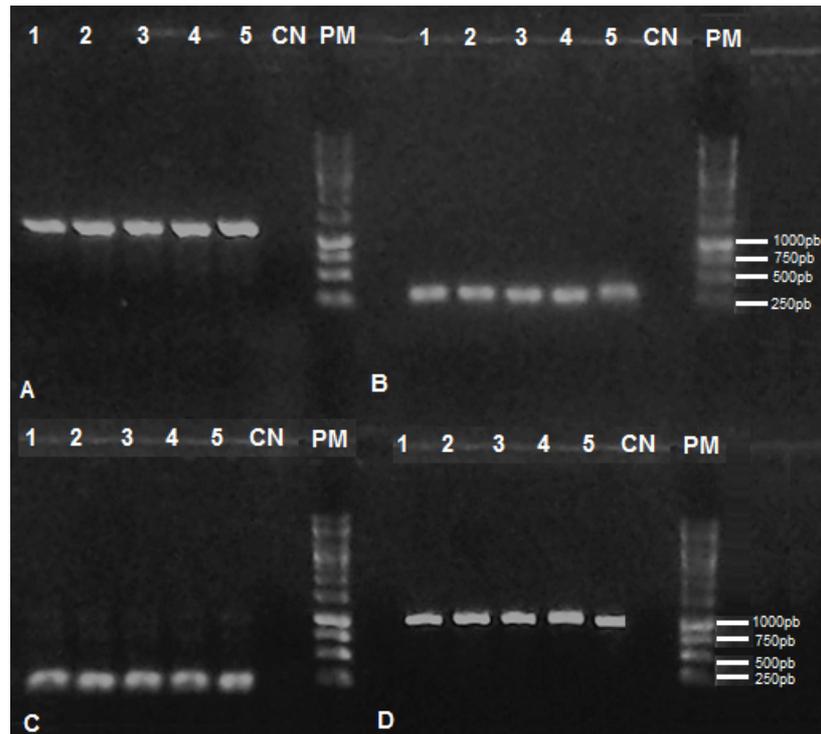
As amplificações foram realizadas para um volume final de 10 µL. Cada reação continha: tampão 1X (Invitrogen™); 0,3 mM de cada dNTP (Life Technologies); 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen™); 0,5 µM de cada *primer* específico; 0,8 U de Taq polimerase Platinum® (Invitrogen™), 20 ng de DNA genômico e H₂O.

As reações foram executadas no termociclador *Mastercycler ep Gradient S* (Eppendorf), utilizando as seguintes condições de ciclagem para cada amplificação: para o éxon 3 foi realizado um passo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 60°C por 60 segundos, 72°C por 45 segundos, seguido de um último passo de extensão final a 72°C por 7 minutos. Éxon 4: iniciou-se com um passo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 5 ciclos de 94°C por 15 segundos, 65°C por 15 segundos, 72°C por 30 segundos, seguidos de 26 ciclos de 94°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos, 72°C por 30 segundos. Além disso, mais 4 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos, e, por fim, um passo de extensão final a 72°C por 7 minutos. Éxon 5: um passo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 56°C por 15 segundos, 72°C por 30 segundos, seguido de um último passo de extensão final a 72°C por 7 minutos. Para os éxon 7, 8 e 9 procedeu-se um passo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 60 segundos, 72°C por 45 segundos, seguido de um último passo de extensão final a 72°C por 7 minutos.

Para confirmação da amplificação do fragmento, foram realizadas corridas eletroforéticas a 80 V por 40 minutos, aplicando-se 2 µL do produto de PCR junto a 2 µL de tampão de corrida, em gel de agarose 1% contendo 1 µL do corante de ácidos nucleicos

UniSafe Dye (Uniscience). Posteriormente, os géis de agarose foram visualizados e fotografados através de sistema de fotodocumentação computadorizado, conforme mostrado na FIGURA 15.

FIGURA 15 - PRODUTOS DE PCR VISUALIZADOS POR SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA EM GEL DE AGAROSE 1%



(A) amplificação do éxon 3 (fragmento de 1198pb). (B) amplificação do éxon 4 (fragmento de 283pb). (C) amplificação do éxon 5 (fragmento de 192 pb) e por fim, (D) amplificação dos éxons 7, 8 e 9, além dos introns 7 e 8 (fragmento de 983pb). Um controle negativo (CN) foi empregado em todas as reações de amplificação para excluir a possibilidade de contaminação. O marcador de peso molecular (PM; GeneRuler 1kB DNA Ladder) (Sinapse Biotecnologia) foi utilizado em todas as corridas eletroforéticas.
 FONTE: O autor (2016)

A fim de evitar que reagentes utilizados na PCR interferissem na reação de sequenciamento, os produtos de amplificação foram purificados por método enzimático. Empregou-se, para isso, a enzima exonsuclease I, que degrada DNA de fita simples (*primers*), e a fosfatase alcalina, que elimina grupos fosfato e inativa os nucleotídeos da reação anterior. A cada 5 μ L de produto de PCR, foram adicionados 2 μ L de solução de purificação contendo 4 U da enzima exonsuclease I (Fermentas) e 0,7 U da enzima fosfatase alcalina (*Thermo Scientific*). Esta solução foi levada ao termociclador com a seguinte condição de ciclagem: ativação enzimática a 37° C por 60 minutos e inativação enzimática a 80° C por 20 minutos, para degradação das enzimas de purificação.

4.4 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO PELO MÉTODO DE SANGER

As reações de sequenciamento dos éxons 3, 4, 5, 7, 8 e 9 do gene *KIR3DL2* foram realizadas pelo método de terminação da cadeia de Sanger. No total, foram necessárias 4 reações de sequenciamento. Para um volume final de 10 µL utilizou-se: 0,3 µL de *Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Standart v3.1 (Life Technologies)*, 0,1 µL de oligonucleotídeo a uma concentração de 20 pmol/µL, 1,9 µL de tampão de sequenciamento (*Big Dye® Terminator v.3.1 5X Sequencing Buffer*) e 2 µL de produto de PCR purificado. As reações foram realizadas em placas de reação de 96 poços *Microamp® Optical (Life Technologies)*. As condições de ciclagem consistiram em uma etapa de desnaturação inicial a 95 °C por 1 minuto; seguida por 25 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 segundos, hibridação a 50 °C por 5 segundos e extensão a 60 °C, por 4 minutos.

Para o sequenciamento do éxon 3, utilizou-se oligonucleotídeos diferentes daqueles utilizados na amplificação (TABELA 3) desenhados por Augusto, 2016. Para os outros éxons (4, 5, 7, 8 e 9), os mesmos oligonucleotídeos foram utilizados, tanto na reação de amplificação, quanto na de sequenciamento, conforme já demonstrado na TABELA 2.

TABELA 3 - DESCRIÇÃO DO PAR DE *PRIMERS* UTILIZADO PARA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO ÉXON 3 DO GENE *KIR3DL2*

Éxon	ID oligonucleotídeo	Sequência 5' - 3'	Direção
3	3DL2_seq_Int2_1385_Fwd	GACGCCATGTCTATGTGGGG	<i>Forward</i>
	3DL2_seq_Int3_1903_Rev	CCCTTGACCCCAAATACAGTTG	<i>Reverse</i>

FONTE: O autor (2016).

Após a reação de sequenciamento, foi realizada uma purificação do DNA antes da injeção das amostras no sequenciador, a fim de que os reagentes utilizados não interferissem na eletroforese capilar e leitura das bases. Em cada amostra foram adicionados 2,5 µL de EDTA 125 mM (Merck) e 30 µL de etanol absoluto (Merck). Após a incubação em temperatura ambiente por 15 minutos, seguiu-se uma centrifugação a 3220 x g por 45 minutos a 18 °C. O sobrenadante foi descartado por inversão e a placa com as amostras foi centrifugada invertida rapidamente até 300 x g. Foram adicionados 30 µL de etanol 70% à temperatura ambiente e feita uma centrifugação a 3220 x g por 5 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi novamente descartado por inversão e a placa centrifugada

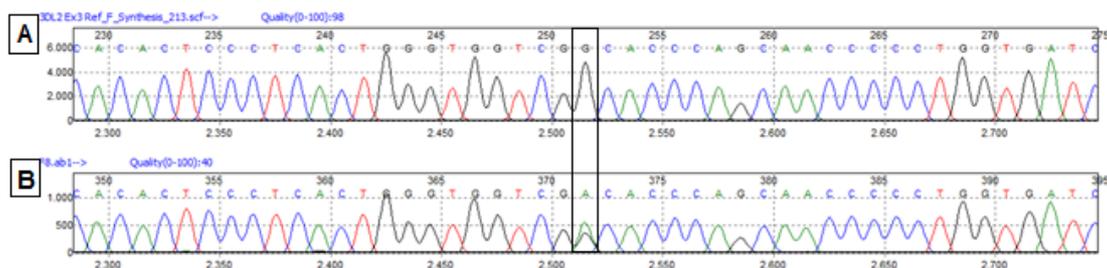
invertida até 300 x g. Após isso, a placa foi deixada por 20 minutos à temperatura ambiente para que todo o álcool evaporasse. Em seguida, a mesma foi selada e armazenada a -20°C. Antes da injeção das amostras no sequenciador, estas foram ressuspensas em 10 µL de Hi-Di Formamida (*Life Technologies*).

A eletroforese capilar para leitura das sequências nucleotídicas foi realizada no sequenciador 3500xl *Genetic Analyzer* (*Life Technologies*) com os seguintes reagentes: *POP-7 Polymer for 3500/3500xl Genetic Analyzers*, *Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series*, *Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series* e *Conditioning Reagent 3500 Series* (*Life Technologies*).

4.5 LEITURA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

A visualização dos eletroferogramas e verificação da qualidade das sequências foram realizadas através do programa *Chromas Lite* versão 2.1 (*Technelysium*). O alinhamento das sequências e identificação dos sítios com variações foi realizado com o programa *Mutation Surveyor® DNA Variant Analysis Software* v5.0.1 (*Softgenetics*) (FIGURA 16). Com base nos sítios com variações, os alelos de cada indivíduo foram definidos utilizando a base de dados IPD-KIR (*Immuno Polymorphism Database*) (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir> - ROBINSON *et al.*, 2010), importante base de dados que fornece um repositório centralizado para as sequências de *KIR*.

FIGURA 16 - ANÁLISE DE ELETROFEROGRAMA OBTIDO NO SOFTWARE *MUTATION SURVEYOR® DNA VARIANT ANALYSIS SOFTWARE*



(A) Sequência de DNA referência do éxon 3, disponível na base de dados IPD-KIR (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir>). (B) Sequência de DNA obtida de um determinado indivíduo através do método de sequenciamento de Sanger. É possível constatar indivíduo heterozigoto na posição demarcada. FONTE: O autor (2016).

A metodologia baseada em sequenciamento utilizada, otimizada e validada por Augusto (2012), não consegue distinguir alguns genótipos, devido ao desconhecimento da fase de alguns sítios variáveis. Foram observadas as seguintes ambiguidades:

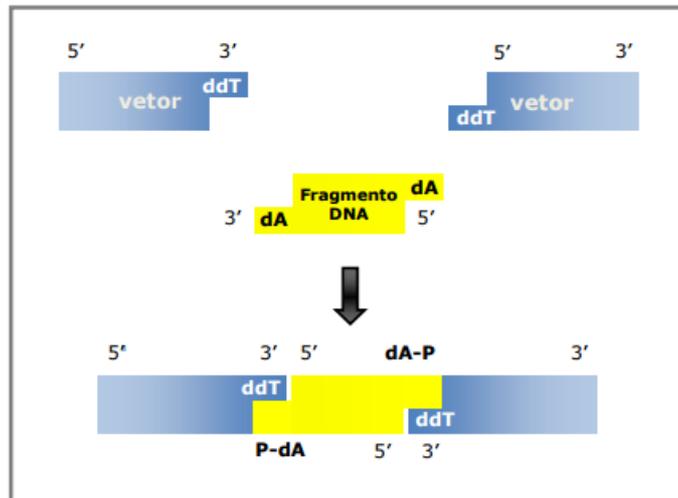
3DL2*002/3DL2*007 e 3DL2*010/3DL2*015, 3DL2*001/3DL2*007 e 3DL2*006/3DL2*010, 3DL2*001/3DL2*011 e 3DL2*003/3DL2*010 e 3DL2*003/3DL2*007 e 3DL2*006/3DL2*011. Para resolvê-las, por segregação familiar, procedeu-se a análise de indivíduos aparentados. A análise dos genótipos dos indivíduos e seus familiares pode ser encontrada no APÊNDICE 1.

4.6 CLONAGEM PARA CONFIRMAÇÃO DE ALELOS NOVOS

As amostras que possuíam sequência distinta daquelas descritas no banco de dados IPD-KIR ou as amostras daqueles indivíduos em que a realização da coleta de aparentados para se conhecer a fase não foi possível, foram submetidas a clonagem para confirmação de sequência. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Interação Planta Bactéria (LIPB – UFPR) com auxílio da Profa. Dra. Roseli Wassem. Para isso, procedeu-se a amplificação dos fragmentos contendo os SNPs a serem confirmados, com a enzima *Taq Platinum DNA polimerase* (Invitrogen). Foi utilizada eletroforese em gel de agarose para visualizar e analisar os produtos de PCR obtidos. Após a corrida, os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/ml, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados por fotodocumentador (*Cell biosciences*).

Os fragmentos amplificados por PCR foram clonados no vetor linearizado pTZ57R/T (Fermentas). Este vetor é pré-digerido com a enzima *Eco321* e tratado com a enzima deoxinucleotidil transferase terminal, que catalisa a adição de nucleotídeos deoxitimidina (ddT) às terminações 3'OH do DNA. Para uma correta e eficiente ligação dos produtos de PCR amplificados no vetor de clonagem, fez-se necessária a modificação prévia destes através da introdução, *in vitro*, de uma adenina em suas extremidades 3' terminais mediante utilização de dATP e um ciclo de extensão a 72°C (FIGURA 17). Posteriormente, o vetor linearizado e o inserto foram ligados de acordo com as orientações do fabricante da enzima ligase. A ligação foi incubada a 8°C *overnight*.

FIGURA 17 - LIGAÇÃO DO PRODUTO DE PCR NO VETOR PTZ57R/T



FONTE: FELICIANO, 2009.

4.7 CÉLULAS COMPETENTES

Foi realizado um pré-inóculo de 5 mL com a estirpe de *E. coli* DH10B, aproximadamente 12 horas antes do procedimento. No dia seguinte, 500 µL desse pré-inóculo foi inoculado em 120 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) em um erlenmeyer de 500 mL. Essa solução foi deixada incubando a uma temperatura de 37 °C sob agitação constante de 120 rpm, em agitador New Brunswick, modelo I26 (New Brunswick Scientific), que permitiu a oxigenação do meio, até atingir uma densidade óptica (D.O.) entre 0,2 e 0,4. Após atingir a D.O. desejada a cultura foi distribuída em quatro tubos falcon de 50 mL estéreis e centrifugadas a 2500 x g em uma temperatura de 4 °C por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão e o *pellet* ressuspense em 15 mL de solução de MgCl₂ 100 mM estéril e gelada. Uma nova centrifugação foi realizada, o sobrenadante descartado por inversão e o *pellet* ressuspense em 25 mL de solução de CaCl₂ 100 mM e incubado em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida a cultura foi novamente centrifugada, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 2 mL de CaCl₂ 100 mM preparado com 20% de glicerol. Aliquotou-se essa solução em porções de 100 µL em tubos de 1,5 mL estéreis e gelados.

4.8 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO

Adicionaram-se 5 µL do DNA a ser transformado, já ligado ao plasmídeo, às alíquotas de *E. coli*. Essa solução foi incubada por trinta minutos em banho de gelo. Em

seguida, a reação foi submetida a um choque térmico de 42 °C durante 45 segundos e novamente incubada em gelo por cinco minutos. Após isso, foi adicionado 1 mL de meio LB ao tubo e as células foram recuperadas sob agitação constante de 120 rpm, em agitador New Brunswick, modelo I26, por 40 minutos a 37 °C. Para selecionar os clones transformantes, 300 µL das células foram plaqueadas em meio LB sólido (SAMBROOK *et al.*, 1989) com antibióticos específicos (100 µM de IPTG, 30 µg/mL de X-gal e 250 µg/mL de ampicilina) e incubadas na estufa a 37 °C por 16 horas.

4.9 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

No dia seguinte ao plaqueamento, diversas colônias brancas e azuis cresceram na placa contendo o meio seletivo. A seleção dos transformantes foi baseada na coloração das colônias. O X-Gal foi utilizado para triagem azul-branca (*blue-white screening*). No vetor utilizado há um sítio de clonagem múltipla no meio da sequência codificadora da β-galactosidase, no qual é possível inserir DNA exógeno de interesse. Com isso, a sequência da β-galactosidase é quebrada somente nas células transformadas com vetor contendo o inserto. Por sua vez, essas células de interesse passam a não expressar mais a enzima β-galactosidase e não podem mais clivar a X-gal em seus produtos galactose e 5-bromo-4-cloro-3-indoxil. O 5-bromo-4-cloro-3-indoxil na presença do ar é oxidado e convertido no corante azul 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo. Portanto, as células que receberam o inserto de interesse não possuem a atividade da β-galactosidase e não apresentam o produto azul, fruto do metabolismo desta enzima. Nesse sentido, as colônias que receberam o inserto, e, portanto, com coloração branca, foram selecionadas e multiplicadas em meio líquido LB e incubadas à 37 °C sob agitação constante. Alíquotas de 1,5 mL foram centrifugadas por 45 segundos a 2500 x g. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspensão com a adição de 150 µL de GET (glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris HCl pH 8,0 25 mM). Para a lise das células, foi acrescentado 150 µL de solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,18M). Para neutralizar o pH foi adicionado 150 µL de KacF (acetato de potássio 3M, ácido fórmico 1,8M, pH 4,8) e deixado no gelo por 5 minutos. Foi adicionado, em seguida, 50 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e a mistura foi homogeneizada e centrifugada por cinco minutos. Foi coletado 450 µL do sobrenadante, que foi transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado com 1 mL de etanol 100% e centrifugado por dez minutos. A lavagem do DNA foi feita

com 1 mL de etanol 70%, centrifugado por 5 minutos a 2500 x g e seco. O DNA foi então dissolvido em 20 µL de água ultra pura.

4.10 PURIFICAÇÃO

Adicionaram-se 79,5 µL de água e 0,5 µL de RNase 10 mg/mL às amostras de DNA plasmidial e procedeu-se a incubação a 37 °C por três horas. Após esse tempo, foi adicionado 30 µL de clorofórmio, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 3 minutos a 2500 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Ao sobrenadante coletado, foi adicionado 160 µL de etanol absoluto, seguido de homogeneização por inversão e centrifugação por 10 minutos a 2500 x g. O *pellet* foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a mesma rotação. O DNA foi seco e dissolvido em 10 µL de água ultra pura.

Foi utilizada eletroforese em gel de agarose (0,8%) para visualizar e analisar os produtos de clonagem purificados. Utilizou-se 1 µL do produto purificado e 1 µL de azul de bromofenol. Após a corrida, os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/m, visualizados em transluminador de luz ultravioleta e fotografados por fotodocumentador (*Cell biosciences*).

As reações de sequenciamento pós clonagem em *E. coli* foram realizadas conforme já descrito anteriormente nos itens 4.4 e 4.5.

4.11 SELEÇÃO DE INDIVÍDUOS PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL

Após resultado de sequenciamento, amostras de sangue periférico de indivíduos com genótipos *KIR3DL2* mais frequentemente encontrados na população do estudo foram selecionadas a fim de analisar a expressão diferencial de alelos desse gene. Os alelos analisados foram *KIR3DL2*001*, *KIR3DL2*002*, *KIR3DL2*003*, *KIR3DL2*005*, *KIR3DL2*007*, *KIR3DL2*009*, *KIR3DL2*010* e *KIR3DL2*011*.

Para essa análise, procedeu-se a coleta de 8 mL de sangue periférico de 40 indivíduos, em tubo com anticoagulante EDTA. Logo após a coleta, as amostras de sangue periférico foram processadas, para obtenção de células mononucleadas, e analisadas em citômetro de fluxo modelo FACSVerse (*BD Biosciences*).

4.12 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS (PBMC)

As amostras de sangue periférico coletadas em tubos de EDTA foram vertidas em tubos falcon de 50 mL. Adicionou-se a esse tubo, solução salina fosfatada tamponada (PBS 1X), até completar o volume de 50 mL. A tubos falcon Leucosep™ (Greiner bio-one) de 50 mL, próprios para separação de células mononucleadas, adicionou-se 15 mL de Ficoll Hypaque (*Sigma Aldrich*) com densidade de 1,077g/mL e centrifugou-se a 400 x g por 1 minuto a fim de que o reagente se concentrasse no fundo do tubo, antes da barreira porosa de separação. À esse tubo, adicionou-se a mistura de sangue periférico diluído em PBS 1X e procedeu-se a uma centrifugação a 1000 x g por 10 minutos. Após centrifugação, observou-se a formação de um anel de células mononucleadas acima da barreira porosa do tubo falcon Leucosep, o qual foi transferido para um novo tubo falcon de 50 mL. Ao novo tubo falcon contendo o anel de células mononucleadas, completou-se o volume até 50 mL com PBS 1X e uma nova centrifugação foi realizada, dessa vez a 400 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão e as células ressuspensas em volume apropriado para contagem celular em câmara de Neubauer. Em geral as células foram ressuspensas em 20 mL. Posteriormente, para contagem de células e análise da viabilidade celular foram realizadas alíquotas de 45 µL dessa suspensão com 5 µL de azul de tripan.

Após contagem, as células mononucleadas foram aliqotadas em tubos para citometria contendo em cada tubo, aproximadamente, 500.000 células.

4.13 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL POR CITOMETRIA DE FLUXO

Aos tubos de citometria, contendo aproximadamente 500.000 células cada, adicionou-se 500 µL de PBS 1X e centrifugou-se por 5 minutos a 400 x g. Posteriormente, os tubos foram invertidos, a fim de descartar o sobrenadante, e adicionou-se 2 µL de anticorpo anti-KIR3DL2 conjugado ao fluorocromo ficoeritrina (PE) (*Miltenyi Biotec*); 2 µL de anticorpo anti-CD56 conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (*Biolegend*) e 2 µL de anticorpo anti-CD3 conjugado ao fluorocromo ficoeritrina-cianina 5 (PE-Cy5) (*Biolegend*) (TABELA 4). Incubou-se por 20 minutos em temperatura entre 4 e 8°C. Após isso, procedeu-se à lavagem com 1 mL de PBS e nova centrifugação por 5 minutos a 400 x g. Os tubos foram novamente vertidos e o *pellet* de células, ressuspensas em 300 µL de PBS.

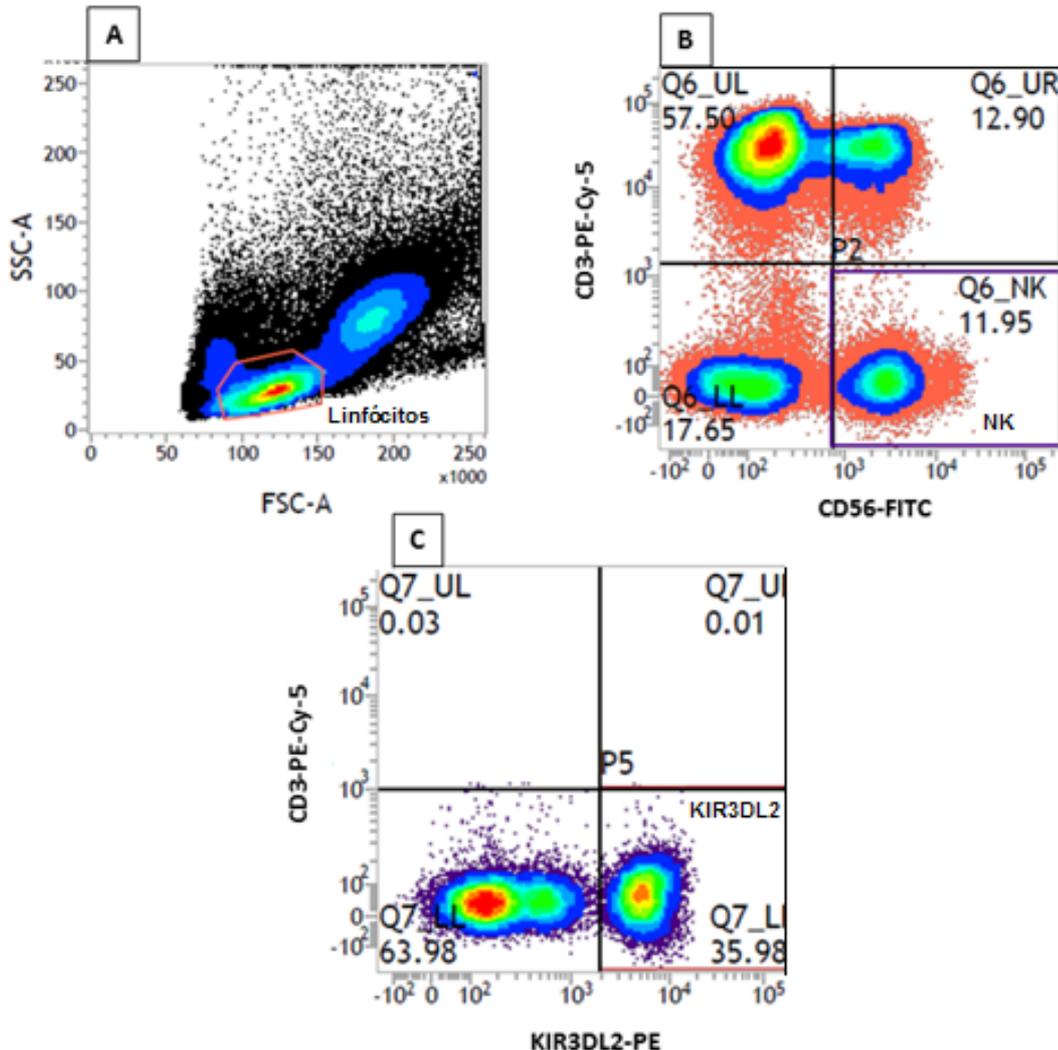
TABELA 4 - PAINEL DE ANTICORPOS UTILIZADO

Laser (nm)	Fluorocromo	Painel utilizado	Clone
488	FITC	CD56	HCD56
488	PE	CD158k	5.133
488	PE-Cy-5	CD3	HIT3a

4.14 AQUISIÇÃO E ANÁLISE NO CITÔMETRO DE FLUXO

As amostras (n = 40) foram analisadas em citômetro de fluxo após as devidas compensações do aparelho. Como estratégia de *gate*, primeiramente a população de linfócitos foi selecionada a partir dos parâmetros de tamanho (*forward scatter* - FSC) e granulosidade (*side scatter* - SSC) (FIGURA 18A). Células NK foram identificadas através da marcação do anticorpo anti-CD56 (clone HCD56, *Biolegend*) e anti-CD3 (clone HIT3a, *Biolegend*). Células NK devem ser negativas para CD3 e positivas para CD56 (FIGURA 18B). Dentro dessa população foi analisada a porcentagem de células NK que apresentavam KIR3DL2 na superfície e intensidade de fluorescência de KIR3DL2, através do emprego do anticorpo anti-KIR3DL2 (clone 5.133, *Miltenyi Biotec*) (FIGURA 18C).

FIGURA 18 - ESTRATÉGIA DE GATE UTILIZADA PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS ALELOS DE *KIR3DL2* POR CITOMETRIA DE FLUXO



(A) Seleção da população de linfócitos entre as células mononucleadas através do seu tamanho e granulosidade. (B) Identificação das células NK através da utilização dos anticorpos anti-CD3 e anti-CD56. Células NK positivas são caracterizadas como CD56⁺ e CD3⁻ (Q6_NK). (C) Expressão diferencial de *KIR3DL2*.

FONTE: O autor (2016).

4.15 ANÁLISE DA PRESENÇA DOS LIGANTES HLA CLASSE I ESPECÍFICOS E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE *KIR3DL2*

Com intuito de analisar se a presença de pelo menos um dos ligantes HLA específicos para *KIR3DL2* (HLA-A3, HLA-A11 e HLA-B27) está associada a níveis diferenciais de expressão de *KIR3DL2* e a diferentes quantidades de células NK *KIR3DL2* positivas, 123 indivíduos foram analisados. A média da intensidade de fluorescência (MFI) e a média da porcentagem de células NK *3DL2* positivas dos dois alelos de *KIR3DL2* de cada indivíduo foi utilizada para comparar os indivíduos que possuíam pelo menos um dos

ligantes específicos (n = 44), com aqueles que não possuíam nenhum dos ligantes específicos (n = 79). A genotipagem alélica de *HLA-A* e *HLA-B* dos indivíduos averiguados foi realizada previamente pela equipe do LGMH.

4.16 CORRELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS ALELOS DE *KIR3DL2* E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS ALELOS DE *HLA-A*

A fim de verificar se havia correlação entre a expressão diferencial dos alelos de *KIR3DL2* e os níveis de expressão diferencial dos alelos de *HLA-A*, foram selecionados, no banco de dados do LGMH, indivíduos genotipados a nível alélico para *KIR3DL2* e para *HLA-A* (n = 115). Destes 115 indivíduos, 37 eram portadores de pelo menos um dos dois alelos que codificam para receptores específicos de *KIR3DL2* (*HLA-A*03* e *HLA-A*11*), os quais também foram analisados em separado. A quantificação dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) dos alelos de *HLA-A* foram obtidos no trabalho de Ramsuran e colaboradores (2015) e extrapolados para os 115 indivíduos genotipados a nível alélico para *KIR3DL2* do presente estudo. A média da expressão de cada um dos dois alelos de *HLA-A* (média dos níveis de RNAm de cada alelo) e de *KIR3DL2* (média dos valores de MFI de cada alelo) foi calculada. Posteriormente, esses valores foram plotados em gráficos de dispersão e foram avaliados os coeficientes de correlação e os valores de *p*, indicativos de presença ou ausência de correlação entre as variáveis.

Apesar de não ter sido testado para alelos do gene *HLA-A*, a extrapolação dos dados de expressão diferencial justifica-se pelo encontro de níveis de expressão semelhantes dos alelos *HLA-C* entre africanos e europeus. Isso sugere que provavelmente a expressão diferencial dos alelos de *HLA* não varia entre diferentes grupos étnicos (RAMSURAN *et al.*, 2015).

4.17 ANÁLISE DOS DADOS

Para caracterizar a diversidade alélica da população, as sequências obtidas foram inicialmente inferidas com base nas sequências nucleotídicas do banco de dados IPD-KIR. Para confirmação, também foram inferidas com a utilização do algoritmo ELB (Excoffier-Laval-Balding), um método pseudo-bayesiano para a inferência de haplótipos pelo programa Arlequin v3.5.2. A fase gamética dos alelos de cada indivíduo foi reconstruída sendo considerado um haplótipo como a combinação de alelos em cada cromossomo.

As frequências alélicas foram obtidas por contagem direta e confirmadas utilizando o programa Genalex v6.502 (PEAKALL; SMOUSE, 2006), o qual também foi utilizado para gerar os arquivos de entrada para o programa Arlequin. As frequências genotípicas foram comparadas com as esperadas, segundo o Teorema de Hardy-Weinberg, utilizando o método de GUO & THOMPSON (1992) através do programa Arlequin v3.5.2.

Com intuito de estimar a medida de similaridade genética entre populações, 10 SNPs do gene *KIR3DL2* foram comparados entre a população desse estudo com outras 12 populações, empregando dados do projeto *1000 Genomes* (disponível em <http://www.internationalgenome.org/>). Para isso, utilizou-se a estatística F (FST) (REYNOLDS *et al.*, 1983) através do programa Arlequin (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

Além disso, utilizou-se os softwares *BD FACSuite™* (BD Bioscience), *STATISTICA* versão 10 (StatSoft) e *GraphPad Prism* versão 6 (GraphPad Prism Inc) para as análises de expressão diferencial dos alelos de *KIR3DL2*. A partir dos dados gerados de MFI e porcentagem de células NK *KIR3DL2* positivas, foram calculadas as médias simples, medianas e desvio padrão dos resultados. Também foram realizados os testes de Kruskal Wallis e de Mann-Whitney para comparação da expressão diferencial global e entre os pares de alelos, respectivamente. Os mesmos testes foram realizados para comparação da porcentagem de células NK *KIR3DL2* positivas.

Para analisar se a presença de pelo menos um ligante HLA específico de *KIR3DL2* estava associada a níveis de expressão diferencial desse receptor e quantidades distintas de células NK *KIR3DL2* positivas, comparou-se a média dos valores de MFI dos alelos de *KIR3DL2* e a média dos valores de porcentagem de células NK entre os indivíduos que possuíam pelo menos um dos ligantes e aqueles que não possuíam. Para comparação entre esses dois grupos, também realizou-se o teste de Mann-Whitney pelo software GraphPad Prism. A correlação de Pearson foi utilizada para análise de expressão diferencial dos alelos de *KIR3DL2* e expressão diferencial dos alelos de *HLA-A*. Foi considerado estatisticamente significativo quando o valor de *p* foi inferior a 0,05.

As ferramentas computacionais miRmap (VEJNAR; ZDOBNOV, 2012) e PolymiRTS (BHATTACHARYA *et al.*, 2014) foram utilizadas a fim de predizer quais miRNAs poderiam estar influenciando na expressão diferencial de *KIR3DL2*.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Sequenciamos os éxons 3, 4, 5 e 7-9 do gene *KIR3DL2* em 235 indivíduos residentes na cidade de Curitiba e região metropolitana com dois principais objetivos: caracterizar a diversidade alélica de *KIR3DL2* nessa população e, a partir desses dados, selecionar indivíduos com os genótipos mais frequentes para a análise dos níveis diferenciais de expressão de *KIR3DL2* em células NK.

Os sítios variáveis no gene *KIR3DL2* encontrados na totalidade da amostra estudada podem ser visualizados na TABELA 5.

A partir da sequência, utilizamos o banco de dados IPD-KIR (ROBINSON *et al.*, 2013) como referência para identificação dos alelos presentes em cada indivíduo. A sequência nucleotídica de todos os alelos de *KIR3DL2* encontrados nesse estudo pode ser visualizada na TABELA 6, juntamente com a alteração de aminoácido no caso de variação não sinônima. Quando o sequenciamento demonstrava padrões não compatíveis com os alelos previamente descritos, inferimos um provável alelo novo. Portanto, chamamos de alelos novos aqueles ainda não descritos na base de dados IPD-KIR. A TABELA 7 mostra os sítios variantes dos 11 alelos novos encontrados nesse estudo e a alteração de aminoácido gerada no caso de variação não sinônima.

Para confirmação de novos alelos o sequenciamento foi realizado duas vezes, nas duas direções e com produtos de diferentes reações de amplificação. Quando possível, foi realizada clonagem para a confirmação de fase e validação dos novos alelos. O alelo denominado *N3* foi confirmado por sequenciamento, uma vez que não gerou ambiguidade em relação à sua fase. O alelo denominado *N5* foi confirmado através da análise de segregação em família. Os genótipos inferidos com base em segregação familiar podem ser observados no APÊNDICE 1. A sequência das amostras dos indivíduos possuindo os alelos *N1*, *N4* e *N11*, foram confirmados por clonagem seguida de sequenciamento do alelo isoladamente. A clonagem dos demais alelos está prevista como etapa posterior.

TABELA 5 - SÍTIOS VARIÁVEIS ENCONTRADOS NO GENE *KIR3DL2*

Éxons	rs	Localização ¹	Posição (sequência codificadora) ²	Nucleotídeo substituído	Aminoácido substituído ³	D de Grantham ⁴	SIFT ⁵
3	<i>rs200521542</i>	55363482	100	C>T	Arg>Trp	101	Tolerada
	<i>rs201009466</i>	55363504	122	G>A	Arg>Gln	43	Tolerada
	<i>rs763089445</i>	55363540	158	G>A	Arg>His	29	Tolerada
	<i>rs113077195</i>	55363590	208	A>T	Ile>Phe	21	Tolerada
	<i>rs149778550</i>	55363599	217	G>A	Gly>Ser	56	Tolerada
	<i>rs146500655</i>	55363685	303	C>T			
	<i>rs772102990</i> ⁶	55363700	318	G>T	Trp>Cys	215	-
	<i>rs654686</i>	55363704	322	G>A	Ala>Thr	58	Tolerada
	<i>rs3188286</i>	55363719	337	C>G	Leu>Val	32	Tolerada
4	<i>rs201239422</i>	55365240	394	C>A	Pro>Thr	38	Deletéria
	<i>rs112285378</i>	55365302	456	C>T			
	<i>rs1048270</i>	55365320	474	G>T	Glu>Asp	45	Tolerada
	<i>rs1048271</i>	55365343	497	G>A	Arg>His	29	Tolerada
	<i>rs549170504</i>	55365393	547	G>A	Gly>Ser	56	Tolerada
5	<i>rs776217262</i>	55367191	773	A>G	Glu>Gly	98	Deletéria
	<i>rs113800142</i>	55367311	893	G>A	Arg>His	29	Tolerada
9	<i>rs3745902</i>	55378008	1190	C>T	Thr>Met	81	Deletéria
	<i>rs58413124</i>	55378083	1265	C>T	Leu>Pro	98	Tolerada
	<i>rs141052127</i>	55378104	1286	C>T	Thr>Met	81	Tolerada

1 Localização no cromossomo 19 descrito no *GRCh37.p13 primary assembly*.

2 Posição a partir do primeiro nucleotídeo do éxon 1.

3 Quando não indicada a substituição de aminoácidos, a substituição nucleotídica gera uma mudança sinônima.

4 Distância evolutiva entre os aminoácidos envolvidos na substituição de acordo com GRANTHAM, 1974. Esta escala pode ter valores de 5 até 215 de acordo com as diferenças químico-físicas entre aminoácidos. Quanto maior o valor, maior a diferença entre os aminoácidos.

5 Predição da consequência da substituição de aminoácido. SIFT (*sorting tolerant from intolerant*) baseia-se na homologia entre as sequências e as propriedades físico-químicas dos aminoácidos (KUMAR *et al.*, 2009). Para avaliar o efeito de uma substituição, a ferramenta SIFT assume que posições importantes em uma sequência de proteínas tem sido conservadas ao longo da evolução e, portanto, substituições nessas posições poderiam afetar diretamente a função da proteína formada, tratando-se de efeitos deletérios. Quando as substituições ocorrem em outras posições, o efeito é dito como tolerado.

6 Até o momento só havia sido encontrada a substituição 318G>A.

– indica que não foi encontrada predição da consequência da substituição de aminoácido.

FONTE: O autor (2016).

TABELA 6 - SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DOS ALELOS DE *KIR3DL2* IDENTIFICADOS NA POPULAÇÃO DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA E ALTERAÇÕES DE AMINOÁCIDOS GERADAS

Ref.	C	G	A	G	G	C	C	C	G	G	G	C	T	3' UTR	A
Posição	100	122	208	217	322	337	394	456	474	497	893	1190	1265		16545
Alelo															
*001
*002	T ^(Glu>Asp)
*003	G ^(Leu>Val)
*005	G ^(Leu>Val)	.	.	.	A ^(Arg>His)	G
*006	A ^(Ala>Thr)
*007	A ^(Ala>Thr)	T ^(Thr>Met)	.	G
*008	.	A ^(Arg>Gln)	A ^(Pro>Thr)	C ^(Leu>Pro)	G
*009	T ^(NA)	.	.	A ^(Arg>His)
*010	T ^(Thr>Met)	.	.
*011	G ^(Leu>Val)	T ^(Thr>Met)	.	.
*013	T ^(Arg>Trp)
*015	A ^(Ala>Thr)	.	.	.	T ^(Glu>Asp)
*019	A ^(Ala>Thr)	.	.	T ^(NA)	.	.	A ^(Arg>His)
*020	.	.	.	A ^(Gly>Ser)	.	G ^(Leu>Val)	A ^(Arg>His)
*023	A ^(Arg>His)	.	.	.	G
*028	.	.	T ^(Ile>Phe)

Ref. – Sequência nucleotídica consenso e sua posição na sequência codificadora (IPD-KIR).

. Indica igualdade com a sequência referência

NA – Não houve alteração de aminoácido

Na última coluna pode-se observar a posição 16545, na região 3' UTR.

FONTE: O autor (2017).

TABELA 7 - ALELOS NOVOS IDENTIFICADOS EM *KIR3DL2* E ALTERAÇÕES DE AMINOÁCIDOS GERADAS

Ref.	G	G	G	G	C	C	C	G	G	G	A	G	C	C
Posição	122	158	318	322	337	394	456	474	497	547	773	893	1190	1286
Alelo														
N1***	G ^(Leu>Val)	.	T ^(NA)	.	.	A ^(Gly>Ser)	.	A ^(Arg>His)	.	.
N2*	G ^(Leu>Val)	A ^(Arg>His)	.	.
N3**	T ^(Thr>Met)
N4***	A ^(Pro>Thr)
N5****	A ^(Arg>Gln)	A ^(Pro>Thr)	T ^(Thr>Met)	.
N6*	.	.	T ^(Trp>Cys)	.	G ^(Leu>Val)	.	.	.	A ^(Arg>His)
N7*	.	.	.	A ^(Ala>Thr)	.	A ^(Pro>Thr)	T ^(Thr>Met)	.
N8*	.	A ^(Arg>His)
N9*	G ^(Leu>Val)	A ^(Pro>Thr)
N10*	.	.	.	A ^(Ala>Thr)	G ^(Glu>Gly)	.	T ^(Thr>Met)	.
N11***	A ^(Arg>Gln)	T ^(Glu>Asp)

Ref. – Sequência nucleotídica consenso e sua posição na sequência codificadora (IPD-KIR).

. Indica igualdade com a sequência referência

* Alelos com fase inferida através do algoritmo ELB (Excoffier *et al.*, 2010). Esses alelos não foram confirmados por clonagem/sequenciamento de uma única fita.

** Alelo confirmado por sequenciamento

*** Alelo confirmado através de clonagem seguida de sequenciamento.

**** Alelo confirmado através de segregação familiar.

NA – Não houve alteração de aminoácido

FONTE: O autor (2016).

A sequência nucleotídica do alelo *N3*, o primeiro alelo novo confirmado nesse estudo, já foi submetida aos bancos de dados *GenBank* e IPD-KIR (Submissão *GenBank*: KX702336; IPD-KIR: IWS40002238). As demais sequências estão em processo de submissão.

Com o objetivo de confirmar a inferência de alelos, que foi inicialmente realizada de forma manual, inserimos todos os sítios variáveis de cada indivíduo para inferência de fase utilizando o algoritmo ELB (Excoffier-Laval-Balding) (EXCOFFIER *et al.*, 2010). A inferência de todos os alelos feita com o algoritmo teve concordância com a leitura das sequências realizada manualmente, o que demonstra robustez na inferência de todos os alelos.

As frequências alélicas e genotípicas são mostradas na TABELA 8 e 9. Foram encontrados, no total, 27 alelos de *KIR3DL2* na amostra populacional estudada. As frequências genotípicas não desviaram do esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p = 0,22478$). Os alelos mais frequentes foram *KIR3DL2*007* (21,7%), *KIR3DL2*001* (21,3%) e *KIR3DL2*002* (20%).

TABELA 8 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *KIR3DL2* E COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DOS ALELOS ENTRE A POPULAÇÃO DE CURITIBA E A POPULAÇÃO DE BELO HORIZONTE

Alelos <i>KIR3DL2</i>	Frequências alélicas	Frequência de portadores (%) Curitiba	Frequência de portadores (%) Belo Horizonte ¹
n=235			
*001	0,213	38,3	33,3
*002	0,200	34,9	38,9
*003	0,111	20,4	11,1
*005	0,062	11,9	14,4
*006	0,011	2,4	6,7
*007	0,217	37,0	22,2
*008	0,015	3,00	8,9
*009	0,060	11,1	8,9
*010	0,045	8,9	3,3
*011	0,019	3,8	3,3
*013	0,004	0,85	-
*015	0,002	0,43	-
*019	0,002	0,43	-
*020	0,002	0,43	-
*023	0,002	0,43	-
*028	0,002	0,43	-
*N1	0,002	0,43	-
*N2	0,002	0,43	-
*N3	0,002	0,43	-
*N4	0,009	0,43	-
*N5	0,004	0,85	-

Alelos <i>KIR3DL2</i>	Frequências alélicas	Frequência de portadores (%) Curitiba	Frequência de portadores (%) Belo Horizonte ¹
*N6	0,002	0,43	-
*N7	0,002	0,43	-
*N8	0,002	0,43	-
*N9	0,004	0,85	-
*N10	0,002	0,43	-
*N11	0,002	0,43	-

n: Número de indivíduos analisados

Os alelos N, dispostos no final da tabela, representam alelos novos, ainda não descritos na base de dados IPD-KIR.

- Informações não disponíveis/alelos não encontrados na população de Belo Horizonte

¹ Frequências disponíveis em Middleton *et al.*, 2008. Não foram encontradas diferenças significativas entre as frequências de portadores na amostra de Curitiba e Belo Horizonte ($p = 0,370$).

FONTE: O autor, (2017).

TABELA 9 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DE *KIR3DL2* E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (p)

Genótipos	Frequências genotípicas
n=235	
001/007	0,115 (27)
001/002	0,068 (16)
002/007	0,068 (16)
007/007	0,064 (15)
001/003	0,055 (13)
002/002	0,050 (11)
001/001	0,043 (10)
001/005	0,038 (9)
002/003	0,035 (8)
002/009	0,035 (8)
007/009	0,030 (7)
003/010	0,030 (7)
001/009	0,026 (6)
003/005	0,021 (5)
005/007	0,021 (5)
002/010	0,021 (5)
003/003	0,017 (4)
002/005	0,017 (4)
003/007	0,017 (4)
001/010	0,013 (3)
006/010	0,013 (3)
002/011	0,013 (3)
003/011	0,013 (3)
002/008	0,013 (3)
002/N4	0,009 (2)
005/009	0,009 (2)
009/009	0,009 (2)
007/010	0,009 (2)
007/011	0,009 (2)
003/008	0,009 (2)
007/N5	0,009 (2)
005/005	0,004 (1)
001/006	0,004 (1)
006/007	0,004 (1)
005/010	0,004 (1)
005/011	0,004 (1)
002/013	0,004 (1)
007/013	0,004 (1)
002/015	0,004 (1)
007/019	0,004 (1)
002/020	0,004 (1)

Genótipos	Frequências genotípicas
002/023	0,004 (1)
009/028	0,004 (1)
007/008	0,004 (1)
001/008	0,004 (1)
003/N1	0,004 (1)
001/N2	0,004 (1)
001/N3	0,004 (1)
001/N4	0,009 (2)
007/N6	0,004 (1)
002/N7	0,004 (1)
007/N8	0,004 (1)
002/N9	0,004 (1)
003/N9	0,004 (1)
007/N10	0,004 (1)
002/N11	0,004 (1)
Equilíbrio de Hardy-Weinberg (p)	0,22478

FONTE: O autor (2017).

Realizamos o teste de diferenciação populacional devido a estrutura genética entre a população de Curitiba e região metropolitana e doze outras populações mundiais através do cálculo de FST. A estatística FST compara a variância da frequência alélica entre populações e pode tomar valores de 0 a 1. Os *loci* que apresentam frequências semelhantes em diferentes populações apresentam baixos valores de FST, enquanto que aqueles com frequências muito distintas entre populações apresentam valores altos. Wright (1978) sugeriu que valores de FST entre 0 e 0,05, indicam baixa diferenciação genética, enquanto que valores entre 0,05 e 0,15 e superiores a 0,15 indicam média e alta diferenciação, respectivamente. Os dados utilizados para esta comparação foram provenientes do banco de dados *1000 Genomes* (disponível em <http://www.internationalgenome.org/>). Nesse teste, foram comparados 10 SNPs, pois apesar de descrevermos um total de 18 sítios variáveis no presente estudo, para apenas 10 deles havia informações populacionais do projeto *1000 Genomes*. Os valores de FST entre as populações são mostrados na TABELA 10.

TABELA 10 - DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE AS POPULAÇÕES PARA O GENE *KIR3DL2*

Populações		Curitiba
Grã-Bretanha	EUR	0.00061 ^{ns}
Finlândia	EUR	0.00295 ^{ns}
Centro da Europa	EUR	-0.00121 ^{ns}
Espanha	EUR	0.00329 ^{ns}
Itália	EUR	0.00718 ^{ns}
Japão	EAS	0.04673 ^{***}
China	EAS	0.04443 ^{***}
Colômbia	AMR	-0.00003 ^{ns}
Peru	AMR	0.02263 ^{***}
América do Norte (com descendência africana)	AFR	0.06265 ^{***}
Nigéria	AFR	0.09191 ^{***}
Quênia	AFR	0.06736 ^{***}

Valores de FST entre diferentes populações. ns $p > 0,05$ *** $p < 0,001$. Valores entre 0 e 0,05, entre 0,05 e 0,15 e superiores a 0,15 indicam baixa, média e alta diferenciação genética, respectivamente.

Legenda populações:

EUR - Europeus

AMR – Americanos miscigenados

EAS – Leste Asiáticos

AFR – Africanos

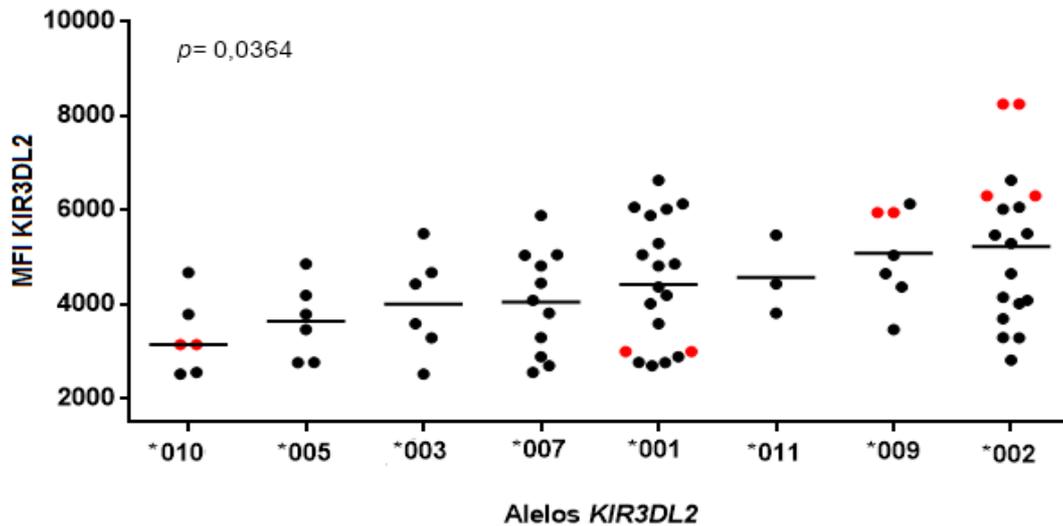
FONTE: O autor (2017).

5.2 NÍVEIS DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PORTADORES DOS ALELOS DE *KIR3DL2*

A análise dos níveis de expressão diferencial dos portadores de alelos de *KIR3DL2* foi realizada a partir de citometria de fluxo ($n = 40$). Os genótipos de todos os indivíduos averiguados, juntamente aos valores de MFI e a porcentagem de células NK 3DL2 positivas encontrados, podem ser visualizados no APÊNDICE 2.

A partir disso, foram plotados os níveis de mediana de intensidade de fluorescência (MFI) para cada alelo (FIGURA 19). Observamos uma variação global significativa nos níveis de expressão de *KIR3DL2* entre os portadores de diferentes alelos ($p = 0,0364$). Os portadores do alelo *3DL2*002* (mediana 5.386) apresentam maior nível de expressão em superfície, nível este 1,7 vez maior do que os apresentados pelos portadores do alelo *3DL2*010* (mediana 3.149), que representou o menor nível de expressão de *KIR3DL2*. Diferenças significativas também foram encontradas quando comparados os portadores dos alelos *3DL2*002* com os portadores do alelo *3DL2*010* ($p = 0,0053$), *3DL2*002* com *3DL2*005* ($p = 0,0321$) e *3DL2*002* com *3DL2*007* ($p = 0,0479$). Também foram encontradas diferenças significativas ao comparar portadores do alelo *3DL2*009* com portadores de *3DL2*005* ($p = 0,0251$) e *3DL2*009* com *3DL2*010* ($p = 0,0122$).

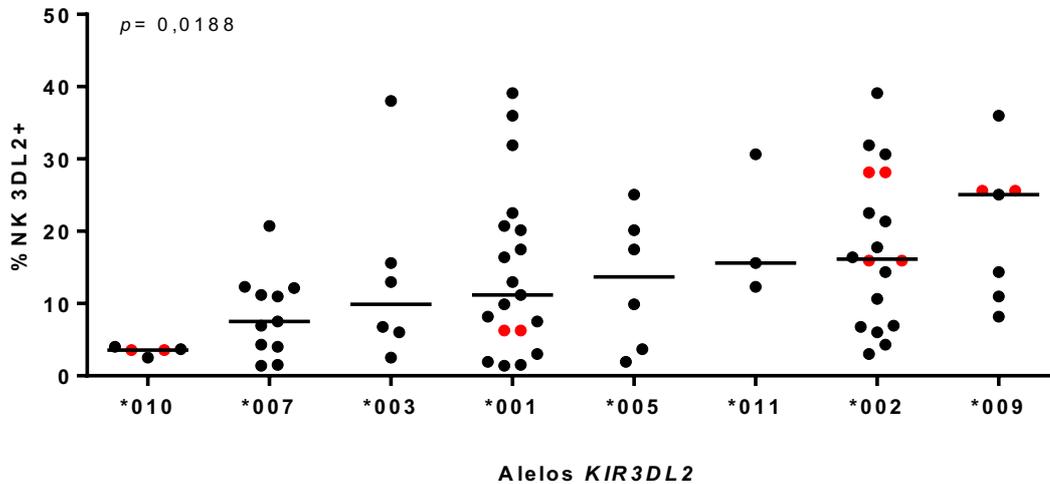
FIGURA 19 - PORTADORES DE DIFERENTES ALELOS DE *KIR3DL2* APRESENTAM NÍVEIS DIFERENCIAIS DE EXPRESSÃO NA SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS NK.



Cada ponto representa um indivíduo e as barras representam a mediana. A mediana da intensidade de fluorescência (MFI) da marcação de KIR3DL2 foi plotada duas vezes para cada indivíduo (uma vez para cada alelo de *KIR3DL2*) e os indivíduos homocigotos foram marcados em vermelho. O teste de Kruskal Wallis foi utilizado para comparação global da expressão diferencial entre os grupos ($p = 0,0364$). Os alelos presentes em menos de 3 indivíduos foram excluídos da análise.
 FONTE: O autor (2017).

Verificamos ainda que a variação alélica de *KIR3DL2* impacta na quantidade de células NK que apresenta o receptor na superfície (FIGURA 20). Foi observada uma variação global significativa na porcentagem de células NK que apresentam o receptor KIR3DL2 na sua superfície entre os portadores de diferentes alelos de *KIR3DL2* ($p = 0,0188$).

FIGURA 20 - A VARIAÇÃO ALÉLICA DE *KIR3DL2* IMPACTA NA QUANTIDADE DE CÉLULAS NK QUE APRESENTAM O RECEPTOR NA SUPERFÍCIE CELULAR



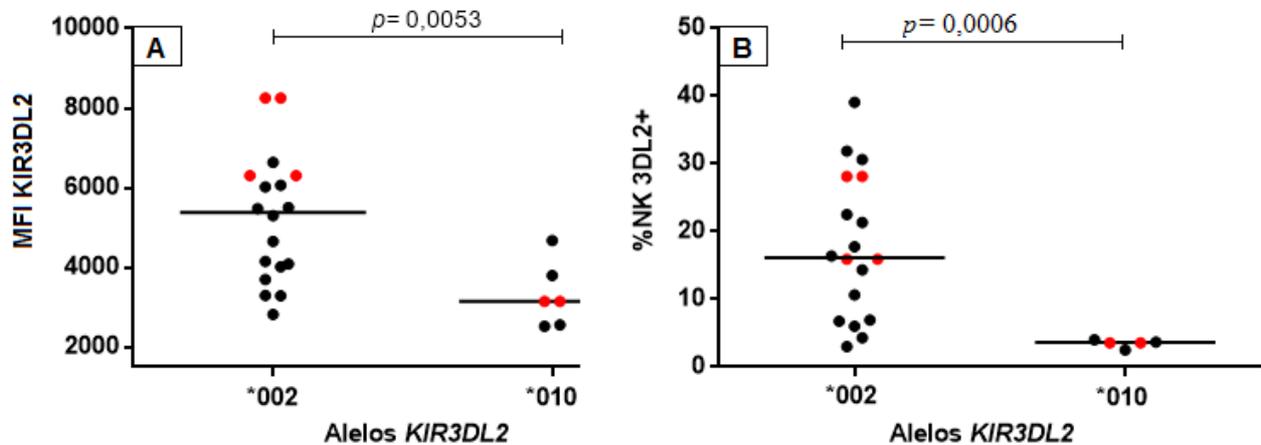
Cada ponto representa um indivíduo e as barras representam a mediana. A porcentagem de células NK 3DL2 positivas foi plotada duas vezes para cada indivíduo (uma vez para cada alelo de *KIR3DL2*) e os indivíduos homocigotos foram marcados em vermelho. Os alelos presentes em menos de 3 indivíduos foram excluídos da análise. Um *outlier* foi removido, encontrado em indivíduo portador do alelo *3DL2*010*.
 FONTE: O autor (2017).

Os indivíduos portadores do alelo *3DL2*002* possuem maior porcentagem de células NK 3DL2 positivas quando comparados àqueles com os alelos *3DL2*007* ($p = 0,0181$) e *3DL2*010* ($p = 0,0006$) (FIGURA 20). Além disso, observa-se diferença estatística significativa entre a porcentagem de células NK 3DL2 positivas entre indivíduos com os alelos *3DL2*001* e *3DL2*010* ($p = 0,0420$), *3DL2*007* e *3DL2*009* ($p = 0,0090$), *3DL2*007* e *3DL2*011* ($p = 0,0247$), *3DL2*009* e *3DL2*010* ($p = 0,0025$) e, por fim, *3DL2*010* e *3DL2*011* ($p = 0,0357$).

Dentre todos os alelos, observou-se que *3DL2*010* (mediana 3,58%) possui a menor porcentagem de células NK 3DL2 positivas e os alelos *3DL2*011* (mediana 15,61%), *3DL2*002* (mediana 16,16%) e *3DL2*009* (mediana 25,07%) associam-se à maior porcentagem de células NK 3DL2 positivas.

Para melhor visualização, na FIGURA 21, encontra-se uma comparação dos níveis de expressão diferencial e da porcentagem de células NK 3DL2 positivas dos indivíduos portadores dos alelos *3DL2*002* e *3DL2*010*. Estes alelos foram os que diferiram mais drasticamente tanto nos níveis de expressão de *KIR3DL2* na superfície das células NK quanto na quantidade de células NK que apresentam o receptor na sua superfície.

FIGURA 21 - PORTADORES DOS ALELOS *3DL2*002* E *3DL2*010* APRESENTAM NÍVEIS DIFERENCIAIS DE EXPRESSÃO DE KIR3DL2 NA SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS NK E TAMBÉM DIFERENTES QUANTIDADES DE CÉLULAS NK 3DL2 POSITIVAS

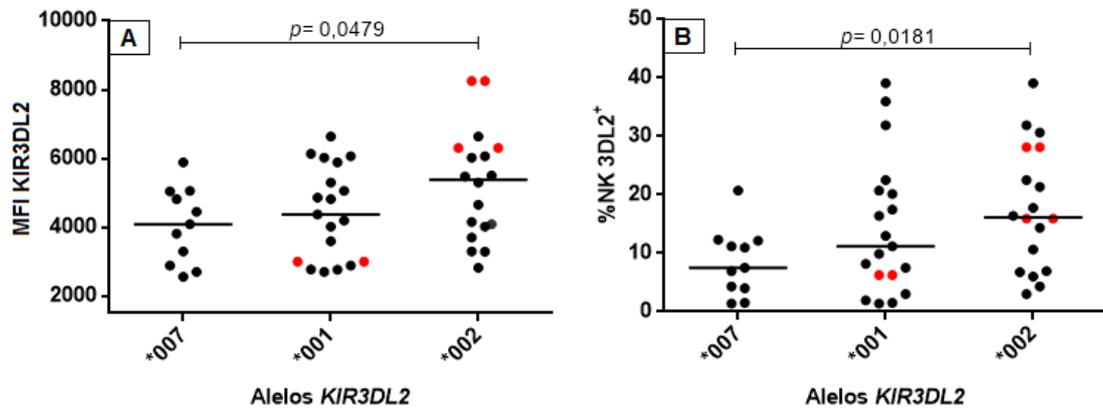


(A) Comparação entre os níveis de expressão diferencial dos alelos *3DL2*002* e *3DL2*010*. (B) Quantidade de células NK 3DL2 positivas dos alelos *3DL2*002* e *3DL2*010*. Cada ponto representa um indivíduo e as barras representam a mediana. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os dois grupos. A mediana da intensidade de fluorescência da marcação de KIR3DL2 e a porcentagem de células NK 3DL2 positivas foram plotadas duas vezes para cada indivíduo (uma vez para cada alelo de *KIR3DL2*) e os indivíduos homocigotos foram marcados em vermelho. Um *outlier* foi removido, encontrado na porcentagem de células NK 3DL2 positivas de um indivíduo portador do alelo *3DL2*010*.

FONTE: O autor (2017).

Dentre os alelos mais frequentes encontrados na população de Curitiba e região metropolitana, *3DL2*001*, *3DL2*002* e *3DL2*007*, portadores do alelo *3DL2*007* apresentam menor nível de expressão diferencial e estão associados a uma menor porcentagem de células NK 3DL2 positivas (FIGURA 22). Entre os portadores dos alelos *3DL2*001* e *3DL2*002* não houve diferença significativa.

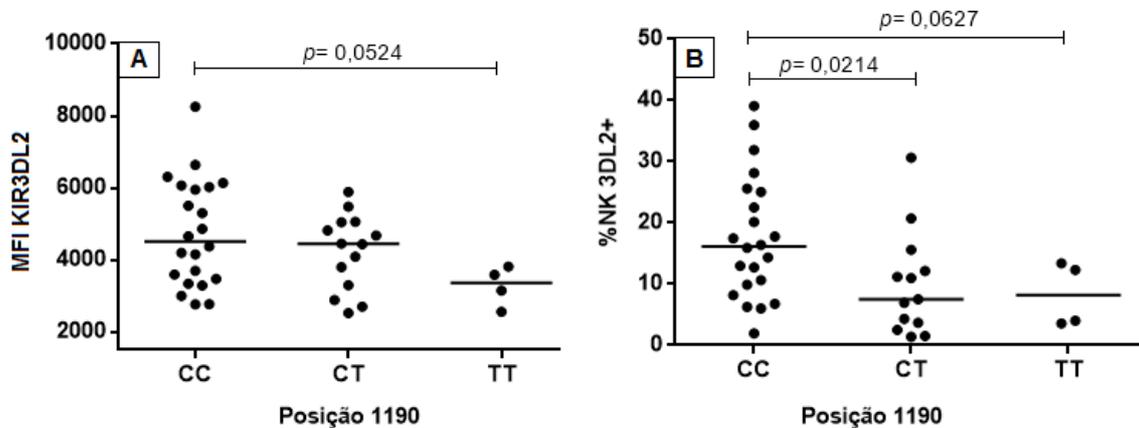
FIGURA 22 - EXPRESSÃO DIFERENCIAL E QUANTIDADE DE CÉLULAS NK 3DL2 POSITIVAS ENTRE OS PORTADORES DOS ALELOS *3DL2*001*, *3DL2*002* E *3DL2*007*



Cada ponto representa um indivíduo e as barras representam a mediana. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os grupos. A mediana da intensidade de fluorescência da marcação de *KIR3DL2* e a porcentagem de células NK 3DL2 positivas foram plotadas duas vezes para cada indivíduo (uma vez para cada alelo de *KIR3DL2*) e os indivíduos homocigotos foram marcados em vermelho.
 FONTE: O autor (2017).

Augusto e colaboradores (2015) encontraram que o polimorfismo 1190C>T (*rs3745902*; Thr376Met), na cauda citoplasmática de *KIR3DL2*, marca sua expressão diferencial. Os autores observaram que indivíduos com o genótipo *TT* possuíam menores níveis de expressão de *KIR3DL2* na superfície das células NK, além de menor porcentagem de células NK 3DL2 positivas quando comparados aos indivíduos *CC* ($p = 0,002$ e $p = 0,001$, respectivamente). No presente estudo foi observado uma menor porcentagem de células NK 3DL2 positivas quando o genótipo era *CT* (mediana 7,52%) comparado a *CC* (mediana 16,16%) (FIGURA 23B). Além disso, valores de p próximo a significância foram encontrados ao se comparar os níveis de expressão de indivíduos com genótipo *TT* (mediana 3.367) aos indivíduos com genótipo *CC* (mediana 4.513) (FIGURA 23A). Os valores de p são mostrados na FIGURA 23.

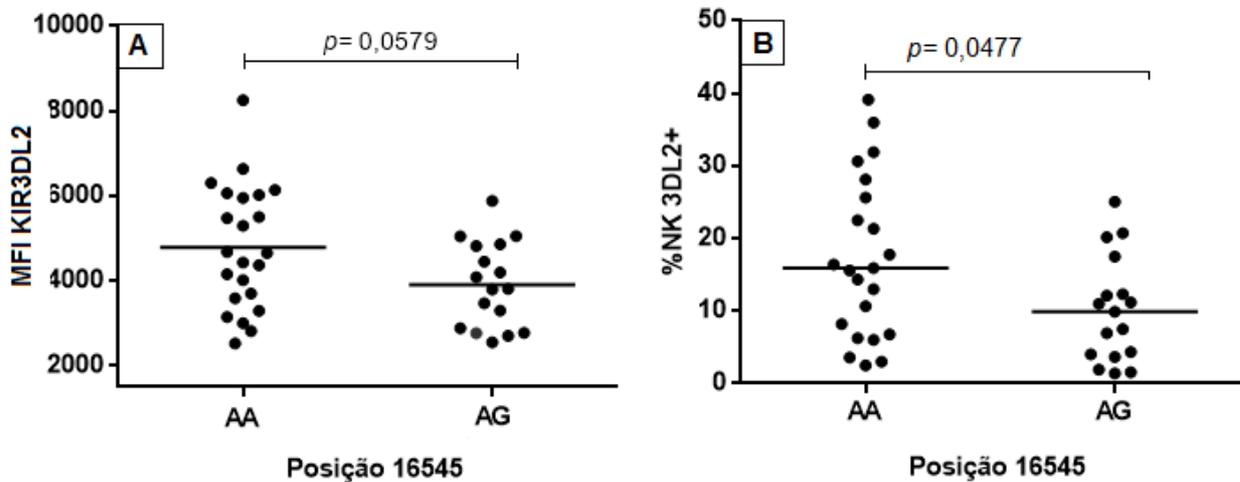
FIGURA 23 - EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE KIR3DL2 E QUANTIDADE DE CÉLULAS NK APRESENTANDO KIR3DL2 NA SUA SUPERFÍCIE ENTRE OS INDIVÍDUOS COM GENÓTIPOS CC, CT E TT NA POSIÇÃO 1190



(A) MFI de KIR3DL2 entre os genótipos CC (n = 22), CT (n = 14) e TT (n = 4). (B) Porcentagem de células NK 3DL2 positivas entre os genótipos CC (n = 22), CT (n = 13) e TT (n = 4). Cada ponto representa um indivíduo e as barras representam a mediana. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os pares de genótipos. Um *outlier* foi removido, encontrado na porcentagem de células NK 3DL2 positivas de um indivíduo heterozigoto CT. FONTE: O autor (2017).

Analizamos ainda se os níveis de expressão diferencial de KIR3DL2 estão associados ao SNP 16545A>G (*rs1865095*) localizado na região 3' não traduzida (3'UTR) de *KIR3DL2* (FIGURA 24). Observou-se que indivíduos com o genótipo AA possuem quantidade de células NK 3DL2 positivas significativamente maior (15,77% versus 9,89%) e uma tendência a maior expressão diferencial de KIR3DL2 quando comparados a indivíduos com genótipo AG (MFI 4.655 versus 3.814). Os valores de *p* são mostrados na FIGURA 24.

FIGURA 24 - EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE KIR3DL2 E QUANTIDADE DE CÉLULAS NK APRESENTANDO KIR3DL2 NA SUA SUPERFÍCIE ENTRE OS INDIVÍDUOS COM GENÓTIPOS AA E AG NA POSIÇÃO 16545



(A) MFI de KIR3DL2 *versus* os genótipos AA (n = 23) e AG (n = 17). (B) Porcentagem de células NK 3DL2 positivas *versus* os genótipos AA (n= 22) e AG (n= 17). Cada ponto representa um indivíduo e as barras representam a mediana. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os grupos AA *versus* AG. O genótipo homocigoto GG não foi encontrado. Um *outlier* foi removido, encontrado na porcentagem de células NK 3DL2 positivas de um indivíduo homocigoto AA.
 FONTE: O autor (2017).

Por se tratar de uma região reguladora, analisamos todos os possíveis miRNAs preditos para se ligarem nessa região e que poderiam regular os níveis de expressão desse gene. Através da complementariedade de bases com o RNAm, encontrou-se um miRNA candidato de alterar os níveis de expressão: miR-2114-3p (FIGURA 25). Na presença do alelo G, uma ligação mais forte com o miR-2114-3p poderia ser gerada, devido ao pareamento entre G no RNA mensageiro e C no miRNA em questão. Conseqüentemente, poderia ser observado um efeito maior do silenciamento da expressão gênica, levando a menores níveis de expressão de KIR3DL2.

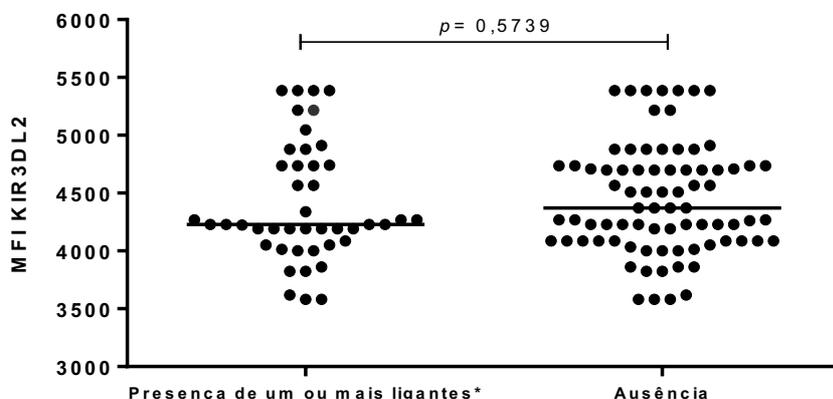
FIGURA 25 - DEMONSTRAÇÃO DA POSSÍVEL LIGAÇÃO ENTRE MIIR-2114-3P E MRNA DE *KIR3DL2*

Importante notar que na presença do alelo G, uma complementariedade maior é gerada entre as sequências. Isso pode estar associado ao menor nível de expressão e menor porcentagem de células NK 3DL2 positivas observados quando o genótipo AG está presente.

FONTE: Adaptado de VEJNAR; ZDOBNOV (2012).

Verificamos ainda se a presença ou ausência de ligantes específicos de KIR3DL2 (HLA-A3, -A11 e -B27) influenciava seus níveis de expressão e porcentagem de células NK 3DL2 positivas. Para isso, utilizamos os dados de genotipagem alélica de *HLA-A* e *HLA-B* que foi realizada previamente pela equipe do LGMH. Não encontramos associação entre a presença ou ausência de ligantes HLA específicos e níveis de expressão diferencial de KIR3DL2 ($p = 0,5739$; FIGURA 26) nem entre a presença ou ausência de ligantes HLA específicos e porcentagem de células NK 3DL2 positivas ($p = 0,7772$; FIGURA 27).

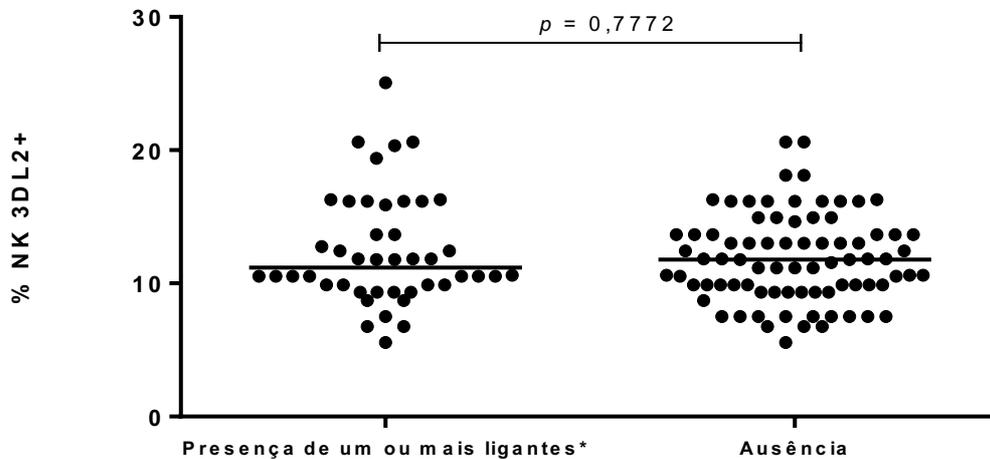
FIGURA 26. A PRESENÇA DE LIGANTES HLA-A3, HLA-A11 E HLA-B27 NÃO ESTÁ ASSOCIADA A NÍVEIS DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE KIR3DL2



* HLA-A3, HLA-A11 e/ou HLA-B27.

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 27 - A PRESENÇA DE LIGANTES HLA-A3, HLA-A11 E HLA-B27 NÃO ESTÁ ASSOCIADA A DIFERENTES PORCENTAGENS DE CÉLULAS NK 3DL2 POSITIVAS

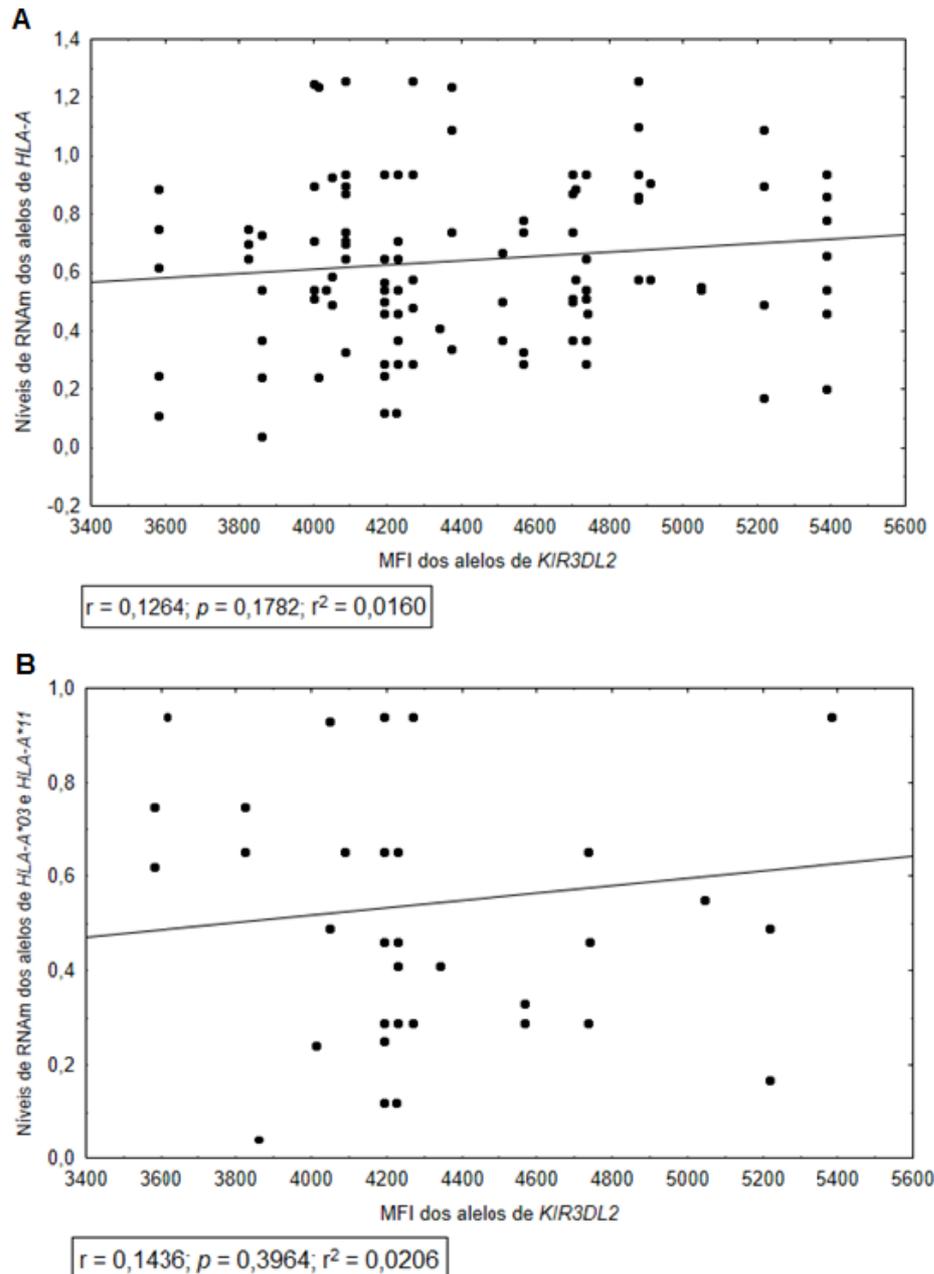


* HLA-A3, HLA-A11 e/ou HLA-B27.

FONTE: O autor (2017).

Além disso, utilizando dados dos níveis de expressão diferencial de alelos de *HLA-A* obtidos no trabalho de Ramsuran e colaboradores (2015), foi avaliada se havia correlação entre os níveis de expressão diferencial dos alelos de *KIR3DL2* e os níveis de expressão diferencial dos alelos de *HLA-A*. Primeiramente, analisamos se havia correlação entre a média de MFI dos alelos de *KIR3DL2* e a média dos níveis de RNAm de todos os alelos de *HLA-A* ($n = 115$). Posteriormente analisamos 37 indivíduos com pelo menos um alelo codificando para os ligantes específicos de *KIR3DL2* (*HLA-A*03* e/ou *HLA-A*11*). Não observamos correlação entre os níveis de expressão dos alelos de *KIR3DL2* e dos alelos de *HLA-A* em nenhuma das duas situações (FIGURA 28). Os valores de r (coeficiente de correlação) e p são mostrados na FIGURA 28.

FIGURA 28 - ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS ALELOS DE *KIR3DL2* E DOS ALELOS DE *HLA-A*



A) Ausência de correlação entre os níveis de expressão diferencial dos alelos de *KIR3DL2* e dos alelos de *HLA-A* ($n = 115$). B) Ausência de correlação entre os níveis de expressão diferencial dos alelos de *KIR3DL2* e dos alelos *HLA-A*03* e *HLA-A*11* ($n = 37$). Os valores de expressão diferencial foram obtidos através de 1) Níveis de RNAm para os alelos de *HLA-A* e 2) Mediana da intensidade de fluorescência para os alelos de *KIR3DL2*. Os valores de MFI do presente estudo e os níveis de RNAm do trabalho de Ramsuram (2015) foram extrapolados para os indivíduos do painel do LGMH genotipados a nível alélico tanto para *KIR3DL2* quanto para *HLA-A*. A média dos valores para cada alelo foi obtida e plotada no gráfico, sendo que cada ponto representa um indivíduo. FONTE: O autor (2017).

6 DISCUSSÃO

Os genes que codificam os receptores KIR possuem um papel importante na resposta imune e seu polimorfismo foi implicado na patogênese de muitas doenças. Um número considerável de estudos demonstraram associação do polimorfismo de ausência e presença de *KIR* e combinações com seus ligantes com doenças. Em termos gerais, os genes *KIR* presentes em um indivíduo contribuem com a função das células NK por alterarem sua ativação ou inibição. Apesar do polimorfismo de ausência e presença de *KIR* ter sido estudado em muitas populações, pouco se conhece sobre a diversidade alélica de *KIR*, menos ainda, sobre o impacto funcional da variação alélica. A análise dos níveis de expressão diferencial de alelos de *KIR3DL2* pode trazer informações valiosas para a genética de populações, suscetibilidade a doenças e a compreensão dos mecanismos que regulam esse gene.

Apesar de o gene *KIR3DL2* ser um dos genes mais polimórficos e polialélicos da família *KIR*, com mais de 80 alelos já descritos até o momento, o sequenciamento da região codificadora deste gene em uma população de Curitiba e região metropolitana permitiu observar sítios variáveis ainda não descritos no banco de dados IPD-KIR, o que demonstra que a diversidade desse gene não é completamente conhecida e ainda maior do que se presume.

Os valores de frequência alélica e de portadores dos alelos encontrados nesse trabalho foram comparados com as frequências encontradas no banco de dados *allele frequencies.net* (APÊNDICE 3) (GONZALEZ-GALARZA, F F TAKESHITA *et al.*, 2015) importante banco de dados que contém informações dos principais genes do sistema imune, como genes *HLA* e *KIR*, em diferentes populações em todo o mundo. Das dezesseis populações com valores de frequência para o gene *KIR3DL2* listadas no banco de dados, apenas uma é brasileira, de Belo Horizonte, Minas Gerais (n = 90), e foi genotipada por PCR sonda específica (PCR-SSOP), um método com menor sensibilidade e que limita a descoberta de novos alelos.

O nosso estudo observou uma maior frequência dos alelos *KIR3DL2*007* (21,7%), *KIR3DL2*001* (21,3%) e *KIR3DL2*002* (20,0%). Além disso, com uma amostra significativamente maior (n = 235) que aquela de Belo Horizonte, constatamos uma maior frequência de indivíduos portadores dos alelos *KIR3DL2*001* e *KIR3DL2*007* (38,3% e 37,0%, respectivamente) em relação ao observado na população mineira (33,3% e 22,2%,

respectivamente). Na população de Belo Horizonte foi observado maior quantidade de indivíduos portadores do alelo *KIR3DL2*002* (38,9%) enquanto que neste estudo esse alelo é apenas o terceiro alelo mais comum (34,9%) (TABELA 8). Apesar dessa aparente discrepância, não foi encontrada diferença significativa na frequência de portadores entre as duas populações ($p = 0,370$).

Na TABELA 10, quando comparamos a diversidade alélica de *KIR3DL2* na população de Curitiba e região metropolitana com outras doze populações notamos que a diversidade alélica de *KIR3DL2* encontrada na população de Curitiba e região metropolitana, assemelha-se às encontradas em populações europeias. Resultado esse já esperado, tendo em vista a predominância europeia na ancestralidade dos indivíduos da população em estudo.

A metodologia baseada em sequenciamento utilizada no presente trabalho, otimizada por Augusto (2012), não permitiu a distinção de alguns genótipos, devido a ambiguidades de fase de alguns sítios variáveis. Para resolver essas ambiguidades, Augusto (2012) desenhou oligonucleotídeos iniciadores para PCR-SSP (*primers* de sequência específica, do inglês *sequence-specific primers*). Meenagh e colaboradores, (2004) recomendaram em seu estudo com uma população da Irlanda, escolher o genótipo de maior frequência se combinações ambíguas ocorressem. Essas ambiguidades também ocorreram no presente estudo, mas foram, na maioria das vezes, resolvidas através de segregação em famílias (APÊNDICE 1). A resolução das ambiguidades por análise de segregação familiar normalmente resultou no genótipo de maior frequência, como sugerido por Meenagh. Entretanto, apesar do método de Meenagh ter sido aplicável na população irlandesa e na população de Curitiba e região metropolitana, nem sempre esse método pode ser aplicável. Como exemplo, citam-se populações indígenas estudadas por Augusto (2012), em que as frequências dos alelos envolvidos nas ambiguidades são semelhantes.

O genótipo mais comum encontrado na amostra da população de Curitiba foi *KIR3DL2*001*007* (11,5%). Além dessa combinação genotípica, outras foram observadas em menores frequências como, *KIR3DL2*001*002*, *KIR3DL2*002*007* e *KIR3DL2*007*007* (6,8%, 6,8% e 6,4%, respectivamente). Menos frequentemente foram encontrados genótipos constituídos por alelos novos descritos no presente estudo. Foram encontrados 11 novos alelos, sendo que 5 desses novos alelos foram confirmados por

sequenciamento, por análise de segregação familiar ou ainda por clonagem seguida de sequenciamento.

Com a análise de sequenciamento foram encontrados 18 sítios variáveis do gene *KIR3DL2*, que quando avaliados pelo algoritmo SIFT (*sorting tolerant from intolerant*) resultaram em três alterações de aminoácidos que foram consideradas deletérias, sendo elas, 394, localizada no éxon 4; 773 no éxon 5 e 1190 presente no éxon 9. A ferramenta SIFT assume que posições importantes em uma sequência de proteína foram conservadas ao longo da evolução e, portanto, substituições nessas posições podem afetar diretamente a função da proteína formada, devido a alterações nas propriedades físico-químicas dos aminoácidos que a compõe (KUMAR *et al.*, 2009). Entre essas três substituições consideradas deletérias pela ferramenta SIFT, a posição 773, localizada no éxon 5 que codifica o domínio extracelular semelhante a imunoglobulina D2, foi encontrada entre os alelos novos aqui descritos (*N10*). Nessa posição há a substituição de aminoácidos com cargas distintas (Glu237Gly). Essa alteração pode influenciar a interação entre o receptor e seu ligante HLA classe I. Isto poderia interferir no sinal gerado pelo receptor e, conseqüentemente, o modo com que a célula NK interpreta e responde a esse sinal. A condição deletéria aliada ao maior valor de D observado entre as substituições deletérias (98), poderia explicar a sua baixa frequência, estando presente em apenas um indivíduo. Interessante destacar que o alelo *N10* além dessa substituição na posição 773, apresenta também uma substituição na posição 1190, presente também nos alelos novos aqui denominados de *N5* e de *N7*. A posição 1190 está localizada no éxon 9, o qual codifica para a cauda citoplasmática do receptor. A alteração de aminoácido nessa região (Thr376Met) possivelmente influencia a função do receptor, tendo em vista que a cauda citoplasmática está associada com ITIMs. Esses ITIMs, por sua vez, exercem a função inibidora do receptor permitindo a ligação das tirosinas fosfatases SHP-1 e SHP-2 que são capazes de desfosforilar muitos alvos da via ativadora e mediar o sinal inibidor do receptor.

Os alelos *N5* e *N7* apresentam também substituição de nucleotídeos na posição 394 do éxon 4, juntamente com os alelos *N4* e *N9*, descritos nesse estudo. Nessa posição, a substituição nucleotídica altera o aminoácido da posição 111 (Pro111Thr), que apesar de possuir um valor D de Grantham relativamente baixo (38), foi aliada a uma condição deletéria pelo algoritmo SIFT. Essa modificação pode promover a alteração no domínio

extracelular semelhante a imunoglobulina D1, interferindo na resposta das células NK e alterando dessa forma a resposta imunológica.

Entretanto, pode-se destacar que a maioria dos sítios variáveis descritos para esse gene leva a alterações de aminoácidos toleradas e que provavelmente não levam a alterações muito drásticas na proteína final formada.

Não foram encontradas informações na ferramenta SIFT para o polimorfismo da posição 318 (318G>T; *rs772102990*), no éxon 3, encontrada no alelo *N6*. O éxon 3 codifica para o domínio extracelular semelhante a imunoglobulina D0 e pode ter implicação direta no reconhecimento dos ligantes HLA pelo receptor KIR3DL2. Até o momento só foi descrita a substituição G>A, sendo que dados do ExAC (*Exome Aggregation Consortium*), importante banco de dados que agrega dados de sequência codificadora de cerca de 60.000 pessoas, demonstraram que a frequência de G é 0,99999. Podemos verificar que esse sítio é bastante conservado, sugerindo que alterações poderiam levar a consequências deletérias na proteína madura formada. Isso pode ser corroborado pelo elevado valor de D de Grantham. A alteração de nucleotídeo 318G>T leva a mudança de um triptofano para uma cisteína (Trp85Cys), alteração que confere um valor de D de 215, o maior valor observado na escala de D de Grantham. De acordo com essa escala, quanto maior o valor, maior a diferença químico-física entre os aminoácidos. Levando isso em consideração, podemos concluir que a presença da cisteína nessa posição pode levar a alterações drásticas na proteína madura formada, com a possibilidade de até mesmo levar a formação de uma proteína pouco funcional ou sem função.

Após a caracterização da diversidade de *KIR3DL2* na população de Curitiba e região metropolitana, iniciamos o estudo dos níveis de expressão diferencial dos alelos desse gene. Uma das motivações para estudar os níveis diferenciais de expressão de *KIR3DL2* se deve a estudos anteriores do nosso grupo, que analisaram a doença pênfigo foliáceo. Diferente do que ocorre em outras doenças autoimunes, no PF, a presença de genes *KIR* ativadores é um fator de proteção ao desenvolvimento da patologia (AUGUSTO *et al.*, 2012). Indivíduos com mais de três genes *KIR* ativadores se mostraram mais protegidos ao pênfigo foliáceo (OR = 0,49, $p = 0,003$). Augusto e colaboradores (2015) também demonstraram que o polimorfismo 1190C>T (Thr376Met; *rs3745902*) na cauda citoplasmática de *KIR3DL2* está associado a níveis de expressão diferencial desse receptor na superfície das células NK. Indivíduos que possuem metionina nessa posição

(1190T) apresentam menores quantidades de células NK 3DL2 positivas e as células 3DL2 positivas apresentaram menor expressão de KIR3DL2 na superfície. Os autores sugeriram que esse panorama leva a menor geração de sinais inibidores, conferindo proteção à patologia. Augusto *et al.* (2015) também demonstraram que, ao serem comparados com indivíduos controle, os pacientes de PF tem frequência aumentada do alelo *KIR3DL2*001* ($p = 0,007$). Quando analisado o alelo *KIR3DL2*002*, que assim como *KIR3DL2*001* não possui o SNP 1190T e é frequente na maioria das populações, nenhuma associação ao PF foi encontrada ($OR = 1,21$; $p = 0,507$). Esses achados sugerem que dois fatores distintos contribuem para a suscetibilidade ao PF: 1) inibição diferencial conferida pelo alelo *KIR3DL2*001* e 2) níveis de expressão diferencial de KIR3DL2 associada ao SNP 1190T. No que se refere à posição 1190 marcando níveis diferenciais de expressão, resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo. Uma tendência a menor expressão de KIR3DL2 foi observada nos indivíduos com genótipo *TT* ao se comparar com indivíduos *CC* ($p = 0,0524$). Além disso, menor quantidade de células NK 3DL2 positivas foi observada quando analisados indivíduos com genótipo *CT*. Estes indivíduos possuem 2,1 vezes menos células NK 3DL2 positivas do que indivíduos *CC* ($p = 0,0214$).

Estes resultados, além de explicarem a suscetibilidade diferencial ao PF, também podem explicar as associações encontradas por Wang e colaboradores (2011) na pré-eclâmpsia (PE). Assim como no PF, sabe-se que na PE um excesso de sinais inibidores aumenta o seu risco de ocorrência. Uma vez que uma menor geração de sinais inibidores pode proteger contra a PE, esperaria-se que a presença do alelo *T* conferisse proteção a doença. Wang *et al.* (2011) constataram, de fato, que o alelo *1190T* é mais frequente no grupo controle do que no grupo de mulheres que desenvolveram pré-eclâmpsia, indicando uma tendência à proteção desse alelo ($p = 0,064$, $OR = 0,694$). Encontrou-se também que o genótipo *CC* leva a um risco 5 vezes maior no desenvolvimento da patologia ($p = 0,000$) (WANG *et al.*, 2011). Portanto, esses resultados são condizentes com o esperado e estão de acordo com os nossos achados

O fato de que, dentre os alelos mais frequentes encontrados na população estudada (*KIR3DL2*001*, *KIR3DL2*002* e *KIR3DL2*007*) o alelo *KIR3DL2*007* possui tanto menores níveis de expressão de KIR3DL2 quanto menores quantidades de células NK 3DL2 positivas, também está de acordo com o esperado. Isso porquê, dos três alelos,

o único que apresenta o polimorfismo 1190T é o *KIR3DL2*007*, influenciando diretamente nos níveis de expressão de *KIR3DL2* na superfície das células NK.

No presente estudo, não encontramos diferença significativa entre os níveis de expressão diferencial e quantidade de células NK 3DL2 positivas quando eram comparados os portadores dos alelos *KIR3DL2*001* e *KIR3DL2*002*. Isso corrobora a hipótese de Augusto e colaboradores (2015): a associação de *KIR3DL2*001* ao maior risco de desenvolver PF não está relacionada aos níveis diferenciais de expressão desse alelo, mas provavelmente é resultado de diferença no reconhecimento do ligante. As moléculas codificadas por esses dois alelos diferenciam-se apenas pela mudança conservativa de um aminoácido (Glu137Asp) no domínio extracelular semelhante a imunoglobulina D1. Khakoo (2010) demonstrou que resíduos no domínio D1 de *KIR3DL2* são provavelmente críticos para o reconhecimento de moléculas HLA-A11 e HLA-A3. Além disso, outro estudo demonstrou que resíduos próximos a essa região, como o 138 e 140, foram demonstrados serem resíduos de contato do receptor *KIR3DL1* com moléculas HLA de classe I (VIVIAN *et al.*, 2011). Considerando a semelhança estrutural entre as moléculas *KIR3DL1* e *KIR3DL2* e assumindo que esses receptores ligam-se semelhantemente aos seus respectivos ligantes, pode-se esperar que essa alteração de aminoácido influencie na habilidade de ligação a moléculas HLA (VIVIAN, *et al.*, 2011; AUGUSTO *et al.*, 2015). Uma vez que não há diferença dos níveis de expressão entre esses alelos, é necessário realizar ensaios de citotoxicidade para avaliar as diferenças funcionais *in vitro* desses receptores. Esse ensaio é um dos objetivos posteriores a esse estudo. A hipótese é que células NK de indivíduos portadores do alelo *KIR3DL2*001* sejam mais fortemente inibidas, provavelmente por uma ligação mais forte aos ligantes HLA e, conseqüentemente, levando a uma menor citotoxicidade.

Levando em consideração a semelhança estrutural entre *KIR3DL1* e *KIR3DL2*, uma limitação da nossa metodologia foi a utilização de um anticorpo com reação cruzada entre essas duas moléculas. Apesar disso, os resultados encontrados no presente estudo se assemelham aos encontrados por Dunphy *et al.* (2015), não só em relação à ausência de diferenças significativas entre os níveis de expressão diferencial e porcentagem de células NK 3DL2 positivas dos portadores dos alelos *KIR3DL2*001* e *KIR3DL2*002*, mas também quanto aos níveis de expressão e porcentagem de células NK 3DL2 dos demais alelos, à exceção de *KIR3DL2*009*. Para os portadores deste alelo encontramos valores superiores de intensidade de fluorescência e porcentagem de células NK 3DL2 positivas

do que o esperado. Isso pode ser explicado devido ao forte desequilíbrio de ligação encontrado entre os alelos *KIR3DL2*009* e *KIR3DL1*008* (GOURRAUD *et al.*, 2010). Este último leva a maiores níveis de expressão de *KIR3DL1* na superfície das células NK e, portanto, poderia estar influenciando nos resultados obtidos de *KIR3DL2*009*. Por outro lado, sabe-se que os alelos *KIR3DL2*003* e *KIR3DL2*005* estão em forte desequilíbrio de ligação com o alelo *KIR3DL1*004*, alelo que é retido intracelularmente e, portanto, não é expresso e não interfere na intensidade de fluorescência observada dos alelos de *KIR3DL2* (GARDINER *et al.*, 2001; GOURRAUD *et al.*, 2010). Ainda, o alelo *KIR3DL2*001* se encontra em desequilíbrio de ligação com *KIR3DL1*005* (GOURRAUD *et al.*, 2010), alelo que expressa baixos níveis de *KIR3DL1* na superfície das células NK, atribuindo pouca interferência nos dados obtidos para esse alelo. Outra informação importante é o desequilíbrio de ligação entre os alelos *KIR3DL1*01502* e *KIR3DL2*002* (GOURRAUD *et al.*, 2010). O alelo *KIR3DL1*01502* foi encontrado conferindo maior nível de expressão de *KIR3DL1* na superfície das células NK (DUNPHY *et al.*, 2015). Este fato poderia estar influenciando nos dados obtidos no presente trabalho, em que o alelo *KIR3DL2*002* possui a maior expressão de *KIR3DL2*. Entretanto, Dunphy e colaboradores (2015), os quais utilizaram anticorpo específico para *KIR3DL1* (clone DX9) e anticorpo específico para *KIR3DL2* (clone Q66), concluíram que portadores do alelo *KIR3DL2*002*, de fato, possuem o maior nível de expressão de *KIR3DL2* e maior porcentagem de células NK *3DL2* positivas quando comparados aos portadores dos demais alelos, assim como os dados obtidos no presente estudo. É fundamental lembrar que *KIR3DL2* é o receptor que apresenta um nível de expressão bastante superior não só a *KIR3DL1*, mas também quando comparado aos demais *KIR* (BJORKSTROM *et al.*, 2010; MCERLEAN *et al.*, 2010). Portanto, apesar da reação cruzada, o ruído gerado por *KIR3DL1* é relativamente baixo e os dados de expressão diferencial de *KIR3DL2* são confiáveis, o que pode ser corroborado pela replicação de outros resultados de nosso grupo de pesquisa e a semelhança com resultados na literatura.

Portadores do alelo *KIR3DL2*002*, o qual apresentou os maiores níveis de expressão na superfície, apresentaram diferenças significativas quando comparados aos portadores dos alelos *3DL2*010*, *3DL2*007* e *3DL2*005*. O alelo *3DL2*010* foi associado ao menor nível de expressão e a menor porcentagem de células NK *3DL2* positivas. Dunphy e colaboradores (2015), relatam resultados semelhantes para ambos os alelos. O trabalho de Dunphy e colaboradores (2015) e o presente estudo são os primeiros a serem

realizados com objetivo de analisar os níveis de expressão gênica diferencial de alelos de *KIR3DL2*. O presente trabalho avaliou 8 alelos, em 40 indivíduos, enquanto aquele analisou 7 alelos em 32 indivíduos.

Nenhum estudo associou expressão diferencial de KIR com variantes nucleotídicas na região 3' UTR. Conforme demonstrado na FIGURA 24, um polimorfismo na posição 16545A>G (*rs1865095*) pode estar relacionado a níveis diferenciais de expressão de *KIR3DL2*. Observamos que o genótipo AG está possivelmente associado a menores níveis de expressão de *KIR3DL2* quando comparado ao genótipo AA. Também constatamos que o genótipo AG confere uma menor quantidade de células NK 3DL2 positivas quando comparado ao genótipo AA. Devido a baixa frequência do alelo G, não encontramos indivíduos homozigotos GG para medir o nível de intensidade de fluorescência de *KIR3DL2*, mas acreditamos que esse genótipo esteja associado a níveis inferiores ao genótipo AG. Para verificar essa hipótese, seria necessário encontrar vários indivíduos de cada um dos três genótipos, o que foi inviável devido a baixa frequência do alelo G.

Por se tratar de uma região reguladora, analisamos todos os possíveis miRNAs preditos para se ligarem nessa região e que poderiam regular os níveis de expressão desse gene. Utilizamos duas ferramentas de predição de alvos de miRNA: miRmap (VEJNAR; ZDOBNOV, 2012) e PolymiRTS (BHATTACHARYA *et al.*, 2014). Os miRNAs são pequenos RNAs não codificadores de proteínas presentes na maioria dos eucariotos. Esses RNAs regulam a expressão gênica em nível pós-transcricional através do silenciamento de RNAs mensageiros alvo (mRNAs) que possuem sítios complementares às suas sequências (FRIEDMAN *et al.*, 2009). Os miRNAs maduros possuem uma região definida como *seed*, que se estende do segundo ao oitavo nucleotídeo da sequência, sendo determinante e necessária para o reconhecimento dos alvos. Embora o pareamento de bases entre o miRNA e o RNAm alvo não seja perfeito, a sequência *seed* deve ser perfeitamente complementar (GUO *et al.*, 2010). Estima-se que os miRNAs controlam a atividade de pelo menos 30 a 60% dos genes codificadores de proteínas em mamíferos (FRIEDMAN *et al.*, 2009). Portanto, através da complementariedade de bases com o RNAm, um total de 9 miRNAs foram encontrados como possivelmente impactados pela variação 16545A>G (*rs1865095*). São eles: miR-4666b, miR5011-3p e miR-2114-3p (complementares ao RNAm gerado pelo alelo G) e miR-297, miR-3149, miR-4307, miR-567, miR-643 e miR-675-3p (complementares ao RNAm gerado pelo alelo A). Dessa

forma, se algum desses miRNAs forem reguladores da transcrição de *KIR3DL2*, a variação 16545A>G poderia afetar diretamente a ligação entre o RNAm e o miRNA e controlar a expressão desse gene.

De todos, o único que apresenta um pareamento extra, além da região *seed*, ou seja, encontra-se pareando perfeitamente em todas as posições entre o segundo e o oitavo nucleotídeo do miRNA e ainda possui um pareamento adicional, é o miR-2114-3p. O fato de o polimorfismo estar conferindo um pareamento extra entre a sequência do RNAm e do miRNA pode ser uma possível explicação para a tendência encontrada para níveis diferenciais de expressão na presença do alelo G. Na presença deste, uma ligação mais forte com o miR-2114-3p poderia ser gerada, devido ao pareamento entre G no RNA mensageiro e C no miRNA em questão. Consequentemente, poderia ser observado um efeito maior do silenciamento da expressão gênica, levando a menores níveis de expressão de *KIR3DL2*. Entretanto, é necessário que mais experimentos, como luciferase reporter, sejam realizados para testar essa hipótese.

Outra análise que realizamos foi verificar se a presença de ligantes HLA específicos para *KIR3DL2* estava associada a níveis de expressão diferencial do receptor na superfície das células NK. Sabe-se que certas combinações KIR-HLA são importantes para placentação e suprimento de sangue materno ao feto e, consequentemente, para o sucesso da reprodução. Mães homozigotas para o haplogrupo A tem maior chance de ter pré-eclâmpsia quando o feto possui HLA-C2 (HIBY *et al.*, 2004). O sucesso reprodutivo parece ser maior quando a mãe possui *KIR2DS1* e o feto HLA-C2 (XIONG *et al.*, 2013). Além disso, possuem papel imprescindível na regulação da resposta das células NK na resposta imune. Portanto, algumas combinações podem estar sobre pressão seletiva não somente por sua função na imunidade, mas também por sua influência direta na reprodução. Apesar de indícios de que a seleção natural favorece certas combinações, nós não encontramos associação entre a presença ou ausência de ligantes HLA específicos (HLA-A3, -A11 e B27) e níveis de expressão diferencial de *KIR3DL2*, nem correlação entre os níveis de expressão diferencial dos alelos de *KIR3DL2* e alelos de *HLA-A*.

Com o objetivo de completar o entendimento a respeito da função das diferentes variantes alélicas de *KIR3DL2* na resposta gerada pelas células NK, pretendemos ainda futuramente separar células NK de indivíduos com diferentes genótipos *KIR*, como *KIR3DL2*001/KIR3DL2*001*, *KIR3DL2*002/KIR3DL2*002* e *KIR3DL2*007/KIR3DL2*007*,

alelos mais comuns encontrados na população estudada e que podem estar influenciando diretamente a função das células NK. Em seguida, essas células serão cultivadas juntamente com células da linhagem K562 transformadas que expressem apenas um dos ligantes específicos de KIR3DL2. As células K562 não expressam moléculas HLA e são frequentemente chamadas de HLA-*null*. Entretanto, quando transformadas, podem expressar somente o ligante específico de KIR3DL2. Através da medição da citotoxicidade e da liberação de citocinas pró-inflamatórias no meio de cultivo das diferentes combinações de células NK e K562, seria possível verificar o potencial citotóxico de cada alelo de *KIR3DL2* no contexto dos seus níveis de expressão gênica diferencial. Os resultados desse experimento poderão esclarecer a respeito dos mecanismos pelos quais alguns alelos levam a suscetibilidade diferencial à diversas patologias e melhorar o entendimento dessa complexa família de receptores.

7 CONCLUSÕES

Os alelos mais frequentes encontrados na população de Curitiba e região metropolitana foram os alelos *KIR3DL2*007*, seguido de *KIR3DL2*001* e *KIR3DL2*002* e os genótipos mais comuns foram: *3DL2*001/007*, *3DL2*001/002* e *3DL2*002/007*. A população estudada encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p = 0,22478$).

Onze novos alelos foram encontrados, dos quais cinco foram confirmados por sequenciamento, clonagem ou segregação familiar.

Dentre os diferentes sítios variáveis encontrados no estudo, três polimorfismos de nucleotídeo único fornecem substituições de aminoácidos consideradas possivelmente deletérias pelo algoritmo SIFT, sendo elas, 394C>A, 773A>G e 1190C>T. Essas alterações podem interferir na interação entre *KIR3DL2* e seus ligantes específicos ou alterar a função das células NK pela modificação da função da cauda citoplasmática do receptor. Além dessas, a troca de nucleotídeos na posição 318G>T leva a uma troca de aminoácidos com características completamente diferentes, levando ao maior valor de D da escala D de Grantham (215). Entre essas variações, a alteração de aminoácido na posição 1190 parece ser a única associada à regulação da expressão do gene *KIR3DL2*. Fora essas, a posição 16545, na região 3' UTR, também marca a expressão de *KIR3DL2*. Encontramos um SNP (16545A>G; *rs1865095*), na região 3' UTR, que está associado a expressão diferencial de *KIR3DL2* na superfície das células NK. Indivíduos com o genótipo AA possuem tendência a uma maior expressão de *KIR3DL2* e maior porcentagem de células NK *3DL2* positivas quando comparados a indivíduos com genótipo AG. Sugerimos que o alelo G esteja associado a menor expressão de *KIR3DL2* devido a presença de um miRNA, miR-2114-3p, que pode parear fortemente com o RNA mensageiro de *KIR3DL2*, silenciando a expressão desse gene por mecanismo de repressão gênica pós transcricional.

A presença de pelo menos um ligante específico de *KIR3DL2* (HLA-A3, HLA-A11 ou HLA-B27) não está associada a diferentes níveis de expressão do receptor e não foi encontrada correlação entre os níveis de expressão diferencial dos alelos de *KIR3DL2* e dos alelos de *HLA-A*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-OLIVEIRA, A.; DIAMOND, H. R. Receptores KIR no transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH); p. 320–329, 2008.
- ANDERSON, S. K. Probabilistic bidirectional promoter switches: noncoding RNA takes control. **Molecular therapy. Nucleic acids**, v. 3, n. 9, p. e191, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25181276>\n<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4222648>>.
- ANFOSSI, N.; ANDRÉ, P.; GUIA, S.; *et al.* Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I. **Immunity**, v. 25, n. 2, p. 331–342, 2006.
- AOKI, V.; MILLIKAN, R. C.; RIVITTI, E. A.; *et al.* Environmental Risk Factors in Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem). **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 9, n. 1, p. 34–40, 2004.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; ELEME, K.; KARINA, L.; *et al.* Activation of a Subset of Human NK Cells upon Contact with Plasmodium falciparum -Infected Erythrocytes. , 2003.
- AUGUSTO, D. G. **O POLIMORFISMO DOS GENES KIR EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS E NA DOENÇA AUTOIMUNE PÊNFIGO FOLIÁCEO**, 2012. Universidade Federal do Paraná.
- AUGUSTO, D. G. The impact of KIR polymorphism on the risk of developing cancer: Not as strong as imagined? **Frontiers in Genetics**, v. 7, n. JUN, p. 1–9, 2016.
- AUGUSTO, D. G.; LOBO-ALVES, S. C.; MELO, M. F.; PEREIRA, N. F.; PETZL-ERLER, M. L. Activating KIR and HLA Bw4 ligands are associated to decreased susceptibility to pemphigus foliaceus, an autoimmune blistering skin disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.
- AUGUSTO, D. G.; O'CONNOR, G. M.; LOBO-ALVES, S. C.; *et al.* Pemphigus is associated with *KIR3DL2* expression levels and provides evidence that *KIR3DL2* may bind HLA-A3 and A11 in vivo. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 7, p. 2052–2060, 2015A. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201445324>>.
- AUGUSTO, D. G.; PETZL-ERLER, M. L. KIR and HLA under pressure: evidences of coevolution across worldwide populations. **Human Genetics**, v. 134, n. 9, p. 929–940, 2015B. Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00439-015-1579-9>>.
- BABOR, F.; MANSER, A.; SCHONBERG, K.; ENCZMANN, J. Lack of association between KIR genes and acute lymphoblastic leukemia in children. , v. 128, n. 3, p. 453–457, 2012.
- BALDWIN, W. M.; LARSEN, C. P.; FAIRCHILD, R. L. Innate immune responses to transplants: A significant variable with cadaver donors. **Immunity**, v. 14, n. 4, p. 369–376, 2001.
- BHATTACHARYA, A.; ZIEBARTH, J. D.; CUI, Y. PolymiRTS Database 3.0: Linking

polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 86–91, 2014.

BIRON, C. A. Interferons alpha and beta as immune regulators - A new look. **Immunity**, v. 14, n. 6, p. 661–664, 2001. Disponível em: <ISI:000169495100002>.

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, 1999.

BJORKSTROM, N. K.; FAURIAT, C.; BRYCESON, Y. T.; SANDBERG, J. K. H.-L. G.; MALMBERG, K.-J. **Analysis of the KIR Repertoire in Human NK Cells by Flow Cytometry**. 2010.

BOYINGTON, J. C.; MOTYKA, S. A.; SCHUCK, P.; BROOKS, A. G.; SUN, P. D. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. **Nature**, v. 405, n. 6786, p. 537–543, 2000.

BROWN, M. A.; PILE, K. D.; KENNEDY, L. G.; *et al.* HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 55, n. 4, p. 268–70, 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1010149&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CARRINGTON, M.; WANG, S.; MARTIN, M. P.; *et al.* Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 7, p. 1069–75, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2213116&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>\n<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15809352>\n<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2213116>>.

CAULI, A.; SHAW, J.; GILES, J.; *et al.* Original article more cell surface B27 dimer and free heavy chain ligands for KIR3DL2 than HLA-B * 27 : 09. , , n. June, p. 1952–1962, 2013.

CHEENT, K.; KHAKOO, S. I. Natural killer cells: Integrating diversity with function. **Immunology**, v. 126, n. 4, p. 449–457, 2009.

CHIDGEY, M. Desmosomes and disease: an update. **HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY**, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12371146>>.

CICHOCKI, F.; HANSON, R. J.; LENVIK, T.; *et al.* The transcription factor c-Myc enhances KIR gene transcription through direct binding to an upstream distal promoter element. , v. 113, n. 14, p. 3245–3254, 2009.

COOKSEY, G.; ROBINST, R. A.; BLARNEY, W. Natural killer cells in renal allograft rejection. , v. 71, p. 874–877, 1984.

COOPER, M. A.; FEHNIGER, T. A.; CALIGIURI, M. A. The biology of human natural killer-

cell subsets. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 11, p. 633–640, 2001.

DAVIES, G. E.; LOCKE, S. M.; WRIGHT, P. W.; *et al.* Identification of bidirectional promoters in the human KIR genes. **Genes and immunity**, v. 8, n. 3, p. 245–53, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.gene.6364381>>.

DJEU, J. Y.; JIANG, K.; WEI, S. A view to a kill: Signals triggering cytotoxicity. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 3, p. 636–640, 2002.

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.

DU, Z.; GJERTSON, D. W.; REED, E. F.; RAJALINGAM, R. Receptor-ligand analyses define minimal killer cell Ig-like receptor (KIR) in humans. **Immunogenetics**, v. 59, n. 1, p. 1–15, 2007.

DUNPHY, S. E.; GUINAN, K. J.; CHORCORA, C. N.; *et al.* 2DL1, 2DL2 and 2DL3 all contribute to KIR phenotype variability on human NK cells. **Genes and immunity**, , n. March, p. 1–10, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25950617>>.

EWERTON, P. D.; LEITE, M. D. M.; MAGALHÃES, M.; SENA, L.; SANTOS, E. J. M. D. Amazonian Amerindians exhibit high variability of KIR profiles. **Immunogenetics**, v. 59, n. 8, p. 625–630, 2007.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

FARAG, S. S.; CALIGIURI, M. A. Human natural killer cell development and biology. **Blood Reviews**, v. 20, n. 3, p. 123–137, 2006.

FARAG, S. S.; FEHNIGER, T. A; RUGGERI, L.; VELARDI, A.; CALIGIURI, M. A. Review article Natural killer cell receptors : new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. , v. 100, n. 6, p. 1935–1947, 2002.

FELICIANO, P. R. Clonagem, expressão heteróloga e caracterização do gene LmjF24.0320 que codifica a enzima fumarato hidratase em *Leishmania major*. , 2009. Disponível em: <[file:///C:/Users/User/Downloads/PatriciaRosaFeliciano \(3\).pdf](file:///C:/Users/User/Downloads/PatriciaRosaFeliciano%20(3).pdf)>.

FLODSTROM, M.; SHI, F. D.; SARVETNICK, N.; LJUNGGREN, H. G. The natural killer cell -- friend or foe in autoimmune disease? **Scand J Immunol**, v. 55, n. 5, p. 432–441, 2002.

FREUD, A. G.; CALIGIURI, M. A. Human natural killer cell development. **Immunological Reviews**, v. 214, n. 1, p. 56–72, 2006.

FRIEDMAN, R. C.; FARH, K. K. H.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**, v. 19, n. 1, p. 92–105, 2009.

GARDINER, C. M.; GUETHLEIN, L. A.; SHILLING, H. G.; *et al.* Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, n. 5, p. 2992–3001, 2001.

GENDZEKHADZE, K.; NORMAN, P. J.; ABI-RACHED, L.; LAYRISSE, Z.; PARHAM, P. High KIR diversity in Amerindians is maintained using few gene-content haplotypes. **Immunogenetics**, v. 58, n. 5-6, p. 474–480, 2006.

GONZALEZ-GALARZA, F F TAKESHITA, L.; SANTOS, E. J.; KEMPSON, F.; *et al.* Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. .

GOODRIDGE, J. P.; BURIAN, A.; LEE, N.; GERAGHTY, D. E. HLA-F and MHC class I open conformers are ligands for NK cell Ig-like receptors. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 191, n. 7, p. 3553–62, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3780715&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

GOURRAUD, P. A.; MEENAGH, A.; CAMBON-THOMSEN, A.; MIDDLETON, D. Linkage disequilibrium organization of the human KIR superlocus: Implications for KIR data analyses. **Immunogenetics**, v. 62, n. 11-12, p. 729–740, 2010.

GRANTHAM, R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. **Science (New York, N.Y.)**, v. 185, n. 4154, p. 862–864, 1974.

GUO, S.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics** 48, 361–372, 1992.

GUO, H.; INGOLIA, N. T.; WEISSMAN, J. S.; BARTEL, D. P. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 835–840, 2010. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20703300>>.

HANSASUTA, P.; DONG, T.; THANANCHAI, H.; *et al.* Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 6, p. 1673–1679, 2004.

HARVEY, D.; POINTON, J. J.; SLEATOR, C.; *et al.* Analysis of killer immunoglobulin-like receptor genes in ankylosing spondylitis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 68, n. 4, p. 595–8, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019897>>.

HERBERMAN, R. B.; ORTALDO, J. R. Natural killer cells: their roles in defenses against disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 214, n. 4516, p. 24–30, 1981.

HIBY, S. E.; WALKER, J. J.; O'SHAUGHNESSY, K. M.; *et al.* Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. **The Journal of experimental medicine**, v. 200, n. 8, p. 957–65, 2004. Disponível em: <<http://jem.rupress.org/cgi/content/long/200/8/957>>.

HSU, K. C.; LIU, X.-R.; SELVAKUMAR, A.; *et al.* 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. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 169, n. 9, p. 5118–5129, 2002.

JANEWAY, C. J.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. The major histocompatibility complex and its functions. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.**, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27156/>>.

JOBIM, M. R.; JOBIM, M.; SALIM, P. H.; *et al.* Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in breast cancer and control group. **Human Immunology**, v. 74, n. 9, p. 1130–1133, 2013. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2013.06.021>>.

KHAKOO, S. I. The role of KIR in disease. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, p. 275–298, 2010.

KHAKOO, S. I.; GELLER, R.; SHIN, S.; JENKINS, J. A.; PARHAM, P. The D0 domain of KIR3D acts as a major histocompatibility complex class I binding enhancer. **The Journal of experimental medicine**, v. 196, n. 7, p. 911–921, 2002.

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. 687–698, 2000.

KIESSLING, R.; KLEIN, E.; WIGZELL, H. “Natural” killer cells in the mouse. **European journal of immunology**, , n. 5, p. 112–117, 1975.

KIKUCHI-MAKI, A.; YUSA, S.; 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 (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 7, p. 3415–3425, 2003.

KIM, S.; POURSIENE-LAURENT, J.; TRUSCOTT, S. M.; *et al.* Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 709–13, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16079848>>.

KULKARNI, S.; MARTIN, M. P.; CARRINGTON, M. The Ying and Yang of HLA and KIR in Human Disease. **Semin Immunol**, v. 162, n. 3, p. 214–220, 2008.

KUMAR, P.; HENIKOFF, S.; NG, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. **Nature protocols**, v. 4, n. 7, p. 1073–1081, 2009.

LANIER, L. L. NK cell receptors. **Annual review of immunology**, v. 16, p. 359–393, 1998.

LONG, B. R.; NDHLOVU, L. C.; OKSENBERG, J. R.; *et al.* Conferral of enhanced natural killer cell function by KIR3DS1 in early human immunodeficiency virus type 1 infection.

Journal of Virology, v. 82, n. 10, p. 4785–4792, 2008. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/content/82/10/4785.abstract>>.

MARAGON, A. V.; GUESLIN, G. A. S.; RUDNICK, C. C. C.; *et al.* Receptores kir de células natural killer. **Revista Ciência, Cuidade e Saúde**, v. 7, n. 1, p. 153–160, 2008. Disponível em: <<http://www.periodicos.uem.br/ojs/index.php/CiencCuidSaude/article/view/6588/3900>>. .

MARTIN, M. P.; BASHIROVA, A.; TRACHERNE, J.; TROWSDALE, J.; CARRINGTON, M. Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 5, p. 2192–2195, 2003.

MARTIN, M. P.; GAO, X.; LEE, J.-H.; *et al.* Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. **Nature genetics**, v. 31, n. 4, p. 429–34, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12134147>>. .

MARTIN, M. P.; QI, Y.; GAO, X.; *et al.* Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. **Clinical Lymphoma**, v. 9, n. 1, p. 19–22, 2007.

MAXWELL, L. D.; WALLACE, A.; MIDDLETON, D.; CURRAN, M. D. A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. **Tissue antigens**, v. 60, n. 3, p. 254–8, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12445308>>.

MCERLEAN, C.; GONZALEZ, A. A.; CUNNINGHAM, R.; *et al.* Differential RNA expression of KIR alleles. **Immunogenetics**, v. 62, n. 7, p. 431–440, 2010.

MEENAGH, A.; WILLIAMS, F.; SLEATOR, C.; HALFPENNY, I. A.; MIDDLETON, D. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity V. KIR3DL2. **Tissue Antigens**, v. 64, n. 3, p. 226–234, 2004.

MIDDLETON, D.; DILER, A. S.; MEENAGH, A.; SLEATOR, C.; GOURRAUD, P. A. Killer immunoglobulin-like receptors (KIR2DL2 and/or KIR2DS2) in presence of their ligand (HLA-C1 group) protect against chronic myeloid leukaemia. **Tissue Antigens**, v. 73, n. 6, p. 553–560, 2009.

MIDDLETON, D.; MEENAGH, A.; MOSCOSO, J.; ARNAIZ-VILLENA, A. Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents. **Tissue Antigens**, v. 71, n. 2, p. 105–113, 2008.

MORETTA, A.; MARCENARO, E.; PAROLINI, S.; FERLAZZO, G.; MORETTA, L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. **Cell death and differentiation**, v. 15, p. 226–233, 2008.

MORETTA, A.; BOTTINO, C.; MINGARI, M. C.; BIASSONI, R.; MORETTA, L. What is a natural killer cell? **Nature immunology**, v. 3, n. 1, p. 6–8, 2002.

MORETTA, L.; MORETTA, A. Killer immunoglobulin-like receptors. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, n. 5, p. 626–633, 2004.

NELSON, G. W.; MARTIN, M. P.; GLADMAN, D.; *et al.* Cutting Edge: Heterozygote Advantage in Autoimmune Disease: Hierarchy of Protection/Susceptibility Conferred by HLA and Killer Ig-Like Receptor Combinations in Psoriatic Arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 7, p. 4273–4276, 2004. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/173/7/4273.full>>.

NEMLANDER, A.; SAKSELA, E.; HAYRY, P. Are natural killer cells involved in allograft rejection? **European Journal of Immunology**, v. 13, n. 4, p. 348–350, 1983.

OEVERMANN, L.; FIRNKORN, M.; MICHAELIS, S.; *et al.* No association between the presence of killer-cell immunoglobulin-like receptor genes and susceptibility to childhood ALL. , v. 120, n. 13, p. 2769–2770, 2015.

ORTONNE, N.; GOVELLO, S. LE; MANSOUR, H.; *et al.* CD158K/KIR3DL2 transcript detection in lesional skin of patients with erythroderma is a tool for the diagnosis of Sézary syndrome. **The Journal of investigative dermatology**, v. 128, p. 465–472, 2008.

OZTURK, O. G.; GUN, F. D.; POLAT, G. Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in patients with breast cancer. **Medical Oncology**, v. 29, n. 2, p. 511–515, 2012.

PARHAM, P. MHC class I molecules and kirs in human history, health and survival. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 3, p. 201–214, 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri1570>>.

PEAKALL R, SMOUSE PE. GenAIEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Mol. Ecol. Notes**. 2006;6:288–295.

PETERSSON, E.; OOSTRAAT, O.; EKBERG, H.; *et al.* Allogeneic heart transplantation activates alloreactive NK cells. **Cellular immunology**, v. 175, n. 1, p. 25–32, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9015185>>.

PUNT, J.; OWEN, J.; CALIGIURI, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, v. 22, n. 11, p. 633–640, 2001.

QI, Y.; MARTIN, M. P.; GAO, X.; *et al.* KIR/HLA pleiotropism: Protection against both HIV and opportunistic infections. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 8, p. 0741–0745, 2006.

RAJALINGAM, R. **Overview of the Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor System**. Totowa, NJ: Humana Press, 2012.

RAJALINGAM, R.; DU, Z.; MEENAGH, A.; *et al.* Distinct diversity of KIR genes in three southern Indian populations : comparison with world populations revealed a link between KIR gene content and pre-historic human migrations. , , n. 1, p. 207–217, 2008.

RAMSURAN, V.; KULKARNI, S.; COLM, O.; *et al.* Epigenetic regulation of differential HLA-A allelic expression levels. , v. 24, n. 15, p. 4268–4275, 2015.

RAULET, D.; VANCE, R. Self-tolerance of natural killer cells. **Nature**, v. 6, n. July, p. 520–

531, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/nri/journal/v6/n7/full/nri1863.html>>.

REYNOLDS, J.; WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimation of the coancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance. **Genetics**, v. 105, n. 3, p. 767–779, 1983.

ROBINSON, J.; MISTRY, K.; MCWILLIAM, H.; LOPEZ, R.; MARSH, S. G. E. IPD-the Immuno Polymorphism Database. **Nucleic acids research**, v. 38, n. Database issue, p. D863-9, jan 2010.

ROBINSON, J.; HALLIWELL, J. A.; MCWILLIAM, H.; LOPEZ, R.; MARSH, S. G. E. IPD - The Immuno Polymorphism Database. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 1234–1240, 2013.

RUGGERI, L.; CAPANNI, M.; CASUCCI, M.; *et al.* Role of Natural Killer Cell Alloreactivity in HLA-Mismatched Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Blood**, v. 94, n. 1, p. 333–339, 1999. Disponível em: <<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/abstract/bloodjournal;94/1/333>\nhttp://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/abstract/94/1/333\nhttp://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/reprint/94/1/333.pdf>.

RYSNIK, O.; MCHUGH, K.; DUIVENVOORDE, L. VAN; *et al.* Non-conventional forms of HLA-B27 are expressed in spondyloarthritis joints and gut tissue. **Journal of Autoimmunity**, v. 70, p. 12–21, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2016.03.009>>.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**. 1989.

SANTOURLIDIS, S.; TROMPETER, H.-I.; WEINHOLD, S.; *et al.* Crucial Role of DNA Methylation in Determination of Clonally Distributed Killer Cell Ig-like Receptor Expression Patterns in NK Cells. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 8, p. 4253–4261, 2002. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/169/8/4253.full>>.

SHILLING, H. G.; GUETHLEIN, L. A.; CHENG, N. W.; *et al.* Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 168, n. 5, p. 2307–2315, 2002.

SMITH, A. J. DE; WALSH, K. M.; LADNER, M. B.; *et al.* The role of KIR genes and their cognate HLA class I ligands in childhood acute lymphoblastic leukemia Running title : KIR , HLA ligands contribute to childhood ALL risk. , v. 123, n. 16, p. 2497–2504, 2014.

SMYTH, M. J.; CRETNEY, E.; KELLY, J. M.; *et al.* Activation of NK cell cytotoxicity. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 4 SPEC. ISS., p. 501–510, 2005.

SUN, J. C.; LANIER, L. L. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8⁺ T cells. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 10, p. 645–57, 2011. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3044>>.

TASSI, I.; KLESNEY-TAIT, J.; COLONNA, M. Dissecting natural killer cell activation

pathways through analysis of genetic mutations in human and mouse. **Immunol Rev**, v. 214, p. 92–105, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17100878>.

TOLEDO, V. P. C. P. DE T.; AVELAR, R. S.; AVELAR, D. M. V.; *et al.* **Natural Killer Cells: Deciphering their role, diversity and functions**. 2010.

TRAPANI, J. A; SMYTH, M. J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 10, p. 735–747, 2002.

TROWSDALE, J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. **Immunity**, v. 15, n. 3, p. 363–374, 2001.

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, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11513141>>.

TROWSDALE, J.; MOFFETT, A. NK receptor interactions with MHC class I molecules in pregnancy. **Seminars in Immunology**, v. 20, n. 6, p. 317–320, 2008.

UHRBERG, M. The CD107 mobilization assay: viable isolation and immunotherapeutic potential of tumor-cytolytic NK cells. **Leukemia**, v. 19, p. 707–709, 2005.

UHRBERG, M. Shaping the human NK cell repertoire: An epigenetic glance at KIR gene regulation. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 4 SPEC. ISS., p. 471–475, 2005.

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**, v. 54, n. 4, p. 221–229, 2002.

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, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9430221>>.

VALIANTE, N. M.; UHRBERG, M.; SHILLING, H. G.; *et al.* Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. **Immunity**, v. 7, n. 6, p. 739–751, 1997.

VAMPA, M. L.; NORMAN, P. J.; BURNAPP, L.; *et al.* Natural killer-cell activity after human renal transplantation in relation to killer immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigen mismatch. **Transplantation**, v. 76, n. 0041-1337, p. 1220–1228, 2003.

VEJNAR, C. E.; ZDOBNOV, E. M. MiRmap: Comprehensive prediction of microRNA target repression strength. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 22, p. 11673–11683, 2012.

VERHEYDEN, S.; BERNIER, M.; DEMANET, C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. **Leukemia**, v. 18, n. 12, p. 2002–2007, 2004.

VILCHES, C.; GARDINER, C. M.; PARHAM, P. Gene structure and promoter variation of expressed and nonexpressed variants of the KIR2DL5 gene. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 165, n. 11, p. 6416–6421, 2000.

VILCHES, C.; PARHAM, P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. **Annual review of immunology**, v. 20, p. 217–251, 2002.

VIVIAN, J. P.; DUNCAN, R. C.; BERRY, R.; O'CONNOR, G. M.; REID, H. H.; BEDDOE, T.; GRAS, S.; *et al.*, Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL1- mediated recognition of human leukocyte antigen B. **Nature**, v. 479, p. 401–405, 2011.

VIVIER, E.; NUNÈS, J. A; VÉLY, F. Natural killer cell signaling pathways. **Science (New York, N.Y.)**, v. 306, n. 5701, p. 1517–1519, 2004.

VIVIER, E.; RAULET, D.; MORETTA, A; CALIGIURI, M. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**, v. 331, n. 6013, p. 44–49, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/331/6013/44.short>>.

VIVIER, E.; UGOLINI, S.; BLAISE, D.; CHABANNON, C.; BROSSAY, L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. **Nat.Rev.Immunol.**, v. 12, n. 1474-1741 (Electronic), p. 239–252, 2012. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3174>>.

WALLACE, M. E.; SMYTH, M. J. The role of natural killer cells in tumor control-effectors and regulators of adaptive immunity. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 27, n. 1, p. 49–64, 2005.

WANG, X. L.; WANG, Q.; SUN, C. J.; ZHANG, W. Y. Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL2 in preeclampsia. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 39, n. 3, p. 273–278, 2011.

WESTERVELT, B. P.; LEY, T. J. Biology and Clinical Relevance of Human Natural Killer Cells. **The Journal of The American Society of Hematology**, v. 93, n. 7, p. 2143–2148, 1990.

WHANG, D. H.; PARK, H.; YOON, J. A.; PARK, M. H. Haplotype analysis of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in 77 Korean families. **Human Immunology**, v. 66, n. 2, p. 146–154, 2005.

WILSON, M. J.; TORKAR, M.; HAUDE, A; *et al.* Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 9, p. 4778–4783, 2000.

WONG-BAEZA, I.; RIDLEY, A.; SHAW, J.; *et al.* 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. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 190, n. 7, p. 3216–24, 2013. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/190/7/3216.full>>.

WRIGHT, S.; Evolution and Genetics of Populations: Variability within and among Natural

Populations. **University of Chicago Press**, Chicago, 465 pp, 1978.

XIONG, S.; SHARKEY, A. M.; KENNEDY, P. R.; *et al.* Maternal uterine NK cell-activating receptor KIR2DS1 enhances placentation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 10, p. 4264–4272, 2013.

YAWATA, M.; YAWATA, N.; MCQUEEN, K. L.; *et al.* Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression. **Immunogenetics**, v. 54, n. 8, p. 543–550, 2002.

YOKOYAMA, W. M.; KIM, S.; FRENCH, A. R. The dynamic life of natural killer cells. **Annual review of immunology**, v. 22, n. 11, p. 405–29, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032583>>.

ZAMAI, B. L.; AHMAD, M.; BENNETT, I. M.; *et al.* Natural Killer (NK) Cell – mediated Cytotoxicity : Differential Use of TRAIL and Fas Ligand by Immature and Mature Primary Human NK Cells. , v. 188, n. 12, p. 2375–2380, 1998.

ZHANG, Y.; WANG, B.; YE, S.; *et al.* Killer cell immunoglobulin-like receptor gene polymorphisms in patients with leukemia: Possible association with susceptibility to the disease. **Leukemia Research**, v. 34, n. 1, p. 55–58, 2010.

1000 GENOMES; The 1000 Genomes Project Consortium. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. **Nature**, 491, 56–65; 2012.

APÊNDICE 1

Análise de genótipos com ambiguidade através de segregação em família

Genótipo		
Indivíduo 1	<i>KIR3DL2*007</i>	<i>KIR3DL2*NEW</i>
Mãe	<i>KIR3DL2*002</i>	<i>KIR3DL2*007</i>
Irmã 1	<i>KIR3DL2*007</i>	<i>KIR3DL2*NEW</i>
Irmã 2	<i>KIR3DL2*005</i>	<i>KIR3DL2*007</i>
Indivíduo 2	<i>KIR3DL2*001</i>	<i>KIR3DL2*007</i>
Mãe	<i>KIR3DL2*001</i>	<i>KIR3DL2*007</i>
Pai	<i>KIR3DL2*001</i>	<i>KIR3DL2*008</i>
Indivíduo 3	<i>KIR3DL2*002</i>	<i>KIR3DL2*007</i>
Mãe	<i>KIR3DL2*001</i>	<i>KIR3DL2*007</i>
Irmã 1	<i>KIR3DL2*001</i>	<i>KIR3DL2*002</i>
Irmã 2	<i>KIR3DL2*001</i>	<i>KIR3DL2*002</i>
Indivíduo 4	<i>KIR3DL2*001</i>	<i>KIR3DL2*007</i>
Mãe	<i>KIR3DL2*002</i>	<i>KIR3DL2*007</i>
Pai	<i>KIR3DL2*001</i>	<i>KIR3DL2*005</i>
Irmã	<i>KIR3DL2*001</i>	<i>KIR3DL2*007</i>
Indivíduo 5	<i>KIR3DL2*001</i>	<i>KIR3DL2*007</i>
Mãe	<i>KIR3DL2*001</i>	<i>KIR3DL2*003</i>
Indivíduo 6	<i>KIR3DL2*001</i>	<i>KIR3DL2*007</i>
Mãe	<i>KIR3DL2*001</i>	<i>KIR3DL2*003</i>
Pai	<i>KIR3DL2*001</i>	<i>KIR3DL2*007</i>
Indivíduo 7	<i>KIR3DL2*001</i>	<i>KIR3DL2*007</i>
Mãe	<i>KIR3DL2*001</i>	<i>KIR3DL2*NEW</i>
Indivíduo 8	<i>KIR3DL2*010</i>	<i>KIR3DL2*010</i>
Mãe	<i>KIR3DL2*002</i>	<i>KIR3DL2*010</i>
Pai	<i>KIR3DL2*002</i>	<i>KIR3DL2*010</i>
Irmã	<i>KIR3DL2*001</i>	<i>KIR3DL2*010</i>

APÊNDICE 2

Genótipos dos indivíduos averiguados (n = 40) juntamente aos valores de MFI e
porcentagem de células NK 3DL2 positivas

Código indivíduo	Alelos <i>KIR3DL2</i>	Valores <i>MFI</i>	% de células NK 3DL2 positivas
1	<i>KIR3DL2*001 KIR3DL2*001</i>	3.001	6,26
2	<i>KIR3DL2*001 KIR3DL2*002</i>	4.020	3,01
3	<i>KIR3DL2*001 KIR3DL2*002</i>	6.025	22,51
4	<i>KIR3DL2*001 KIR3DL2*002</i>	5.297	31,90
5	<i>KIR3DL2*001 KIR3DL2*002</i>	6.064	16,39
6	<i>KIR3DL2*001 KIR3DL2*002</i>	6.637	39,10
7	<i>KIR3DL2*001 KIR3DL2*003</i>	3.591	12,99
8	<i>KIR3DL2*001 KIR3DL2*005</i>	4.196	20,15
9	<i>KIR3DL2*001 KIR3DL2*005</i>	4.863	17,48
10	<i>KIR3DL2*001 KIR3DL2*005</i>	2.767	1,92
11	<i>KIR3DL2*001 KIR3DL2*005</i>	2.773	9,89
12	<i>KIR3DL2*001 KIR3DL2*007</i>	2.704	1,54
13	<i>KIR3DL2*001 KIR3DL2*007</i>	2.888	1,39
14	<i>KIR3DL2*001 KIR3DL2*007</i>	4.819	7,52
15	<i>KIR3DL2*001 KIR3DL2*007</i>	5.887	11,17
16	<i>KIR3DL2*001 KIR3DL2*007</i>	5.058	20,72
17	<i>KIR3DL2*001 KIR3DL2*009</i>	6.137	35,98
18	<i>KIR3DL2*001 KIR3DL2*009</i>	4.371	8,18
19	<i>KIR3DL2*002 KIR3DL2*002</i>	8.254	15,93
20	<i>KIR3DL2*002 KIR3DL2*002</i>	6.306	28,15
21	<i>KIR3DL2*002 KIR3DL2*003</i>	5.506	6,78
22	<i>KIR3DL2*002 KIR3DL2*003</i>	3.290	6,00
23	<i>KIR3DL2*002 KIR3DL2*007</i>	4.087	6,92
24	<i>KIR3DL2*002 KIR3DL2*007</i>	3.298	4,33
25	<i>KIR3DL2*002 KIR3DL2*008</i>	2.818	21,34
26	<i>KIR3DL2*002 KIR3DL2*009</i>	4.655	14,34
27	<i>KIR3DL2*002 KIR3DL2*011</i>	5.474	30,63
28	<i>KIR3DL2*002 KIR3DL2*015</i>	3.699	10,64
29	<i>KIR3DL2*002 KIR3DL2*020</i>	4.156	17,76
30	<i>KIR3DL2*003 KIR3DL2*010</i>	4.680	38,01
31	<i>KIR3DL2*003 KIR3DL2*010</i>	2.527	2,50
32	<i>KIR3DL2*003 KIR3DL2*011</i>	4.435	15,61
33	<i>KIR3DL2*005 KIR3DL2*009</i>	3.470	25,07
34	<i>KIR3DL2*005 KIR3DL2*010</i>	3.795	3,68
35	<i>KIR3DL2*007 KIR3DL2*009</i>	5.046	10,98
36	<i>KIR3DL2*007 KIR3DL2*010</i>	2.557	4,02
37	<i>KIR3DL2*007 KIR3DL2*011</i>	3.814	12,33
38	<i>KIR3DL2*007 KIR3DL2*013</i>	4.453	12,13
39	<i>KIR3DL2*009 KIR3DL2*009</i>	5.955	25,61
40	<i>KIR3DL2*010 KIR3DL2*010</i>	3.149	3,58

APÊNDICE 3

Frequência dos alelos de *KIR3DL2* entre as populações

	Curitiba		Irlanda		Belo Horizonte	Inglaterra	Finlândia	Coréia do Sul	India	África do Sul	USA	Japão	China
n=	235		200		90	334	101	154	72	91	75	132	104
Alelo	Fa	%	fA	%	%	%	%	%	%	%	fA	fA	fA
001*	0,213	38,3	0,28	51	33,3	42,6	37,4	1,9	60,7	70	0,21	0,078	0,043
002*	0,2	34,9	0,195	36	38,9	41,3	33	56,8	23,2	15	0,261	0,461	0,058
003*	0,111	20,4	0,065	13	11,1	10,4	14,3	ND	5,4	25	0,036		0
004*	0	0	0	0	ND	0	0	ND	0	ND	0	ND	0
005*	0,062	11,9	0,08	16	14,4	14,8	20,9	ND	3,6	0	0,065	ND	0
006*	0,011	2,4	0,005	1	6,7	0,6	0	0,3	3,6	30	0	ND	0,005
007*	0,217	37,0	0,18	32	22,2	33,1	46,2	17,2	57,1	5	0,188	0,116	0,13
008*	0,015	3	0,035	7	8,9	5,7	5,5	6,5	3,6	15	0,022	0,108	0,087
009*	0,06	11,1	0,075	15	8,9	13,1	11	1,3	ND	10	0,109	0,069	0,034
010*	0,045	8,9	0,025	5	3,3	7,7	11	13	23,2	5	0,036	0,121	0,135
011*	0,019	3,8	0,06	12	3,3	6,3	4,4	0,3	0	0	0,029	ND	0
012*	0	0	0	0	0	0,3	0	ND	5,4	0	0	ND	0
013*	0,004	0,85	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND	0
014*	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0,013	0
015*	0,002	0,42	ND	ND	ND	ND	ND	2,6	ND	ND	0	0,026	0,01
016*	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0,004	0
019*	0,002	0,42	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
020*	0,002	0,42	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
023*	0,002	0,42	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
028*	0,002	0,42	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

fA= frequência alélica; %= frequência de portadores do alelo; ND= não detectado. Fonte: *allelefreqencies.net*

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este é um convite para você participar voluntariamente do projeto de pesquisa **GENES E SUAS VARIAÇÕES: ANÁLISE MOLECULAR, EVOLUTIVA E FUNCIONAL, EM POPULAÇÕES E EM DOENÇAS**. Por favor, leia com atenção as informações abaixo antes de dar ou não seu consentimento para participar deste estudo. Se houver qualquer dúvida sobre o estudo ou sobre este documento, pergunte ao pesquisador com quem você está conversando neste momento.

• OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo desse estudo é conhecer as variações normais de genes (formas alternativas de genes, denominadas *alelos*) e suas frequências, em populações humanas. Por exemplo, para grupos sanguíneos, há 3 variações (alelos) principais: A, B e O. As combinações dessas resultam no grupo sanguíneo do indivíduo (combinações A/A ou A/O = grupo A; B/B ou B/O = grupo B; A/B = grupo AB; O/O = grupo O). As frequências de A, B e O diferem, entre populações. Por exemplo, nas populações indígenas das Américas o grupo sanguíneo B praticamente inexistente (quase 100% das pessoas pertencem ao tipo O), enquanto na Europa 35% das pessoas são do tipo B e, na África, 20%. Enquanto a distribuição geográfica/étnica das variações do gene ABO são bem conhecidas, a diversidade populacional da maioria dos outros genes ainda é desconhecida. Nesse trabalho de pesquisa analisaremos vários outros genes, em grupos da população brasileira. O resultado será útil para conhecer as origens e as relações históricas das populações atuais e para compreender as causas da variabilidade humana normal. Por comparação das frequências em pessoas saudáveis e pessoas que sofrem da doença pênfigo, será possível identificar quais variações genéticas tornam as pessoas mais (ou menos) susceptíveis a essa doença.

• PROCEDIMENTOS

Se você participar deste estudo, será colhida uma amostra de seu sangue (50 ml, ou seja, correspondente ao volume de um copo de cafezinho) e você irá responder a algumas perguntas sobre a sua origem geográfica e a origem de seus ancestrais, assim como sobre a sua saúde. Você pode recusar-se a responder a qualquer das perguntas, se assim desejar.

• RISCOS

Os riscos envolvidos na execução do estudo são raros e transitórios. A coleta da amostra de sangue poderá causar desconforto e, raramente, sangramento, hematoma, infecção ou desmaio. Embora não seja esperado, caso você tenha algum problema e não possa ir ao trabalho, você receberá um atestado para justificar a sua falta. Se houverem danos decorrentes da pesquisa, você será devidamente indenizado.

- **BENEFÍCIOS**

Não há nenhum benefício direto desta pesquisa para você, mas o conhecimento adquirido com este estudo poderá auxiliar na compreensão das causas da variação genética normal da espécie humana e sua possível influência na susceptibilidade a doenças. Isso poderá contribuir para a compreensão das funções dos genes estudados, assim como para a análise das relações históricas/biológicas entre as populações humanas.

- **PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA**

A sua participação neste estudo é *voluntária*. Mesmo que você decida participar, terá plena e total liberdade para desistir do estudo a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer prejuízo para você.

- **ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO**

Caso você autorize, seu material biológico e informações associadas permanecerão armazenados em biorrepositório para utilização no projeto citado acima. Caso haja necessidade de utilizá-lo no futuro, você será contatado para consentir ou não sobre o novo uso de sua amostra. Nesse caso, seu consentimento será formalizado através de um novo TCLE específico. Quando isso não for possível, o fato será justificado perante o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). Toda nova pesquisa a ser feita com o seu material será submetida à apreciação do CEP e sempre que couber também da CONEP, em conformidade com as normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução CNS nº 441/2011). Seu material biológico será armazenado por 05 anos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Luiza Petzl Erler, sendo que, se necessário, serão solicitados mais 05 anos para o Comitê de Ética. Contudo, a qualquer momento você poderá solicitar que seu material biológico não seja mais utilizado, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ou constrangimento a você. Entretanto, o material biológico poderá ser descartado devido à inadequação por critérios de qualidade, seguindo normas definidas na legislação brasileira.

- **ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS**

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo.

- **IDENTIFICAÇÃO**

A sua identificação e todos seus dados pessoais, clínicos e de exames laboratoriais serão mantidos em sigilo. Os resultados do estudo serão publicados sem revelar a sua identidade.

• ACESSO AOS RESULTADOS

Você deseja ser informada(o) sobre os resultados obtidos com esse material biológico?

() *Não quero ser informada(o) sobre os resultados.*

() *Quero ser informada(o) sobre os resultados.*

Estaremos à disposição para informar e explicar sobre todos os resultados obtidos com sua amostra biológica e sobre os estudos nos quais ela foi utilizada. Você poderá nos contatar no Departamento de Genética da UFPR e nos telefones que se encontram neste documento.

• EQUIPE DE PESQUISADORES

- Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler - Departamento de Genética, UFPR.
- Colaboradores: Dra. Angélica B. Winter Boldt (UFPR); Dra. Danielle Malheiros Ferreira (UFPR); Dr Danillo Gardenal Augusto; Dr. Eduardo R. Amazonas de Almeida (UFPR); Dra. Ana Maria Roselino; Dr. Alfredo Marquardt Filho; Dra. Noemi F. Pereira; Dra. Luiza T. Tsuneto (UEM).

Número de telefones: (+41) 3361-1746 e 3361-1724

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Declaro também não possuir nenhum grau de dependência profissional ou educacional com os pesquisadores envolvidos nesse projeto (ou seja, os pesquisadores desse projeto não podem me prejudicar de modo algum no trabalho ou nos estudos), não me sentindo pressionado de nenhum modo a participar dessa pesquisa.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo, e autorizo a coleta, o armazenamento e guarda do meu material biológico sabendo que, se houver uma nova pesquisa, essa será avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa e sempre que couber também pela CONEP e que serei contatado novamente, para consentir ou não o uso de meu material, através de um TCLE específico.

_____, ____ de _____ de _____
local data

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador

Nome do Voluntário
RG

Nome do Pesquisador
RG

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é assinado em duas vias, uma para você e outra que será arquivada pela pesquisadora responsável.

Este Termo de Consentimento foi revisado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR. Esse Comitê é responsável pela análise das pesquisas e defesa dos interesses dos seus sujeitos, em sua integridade e dignidade. Dessa forma, contribui para o desenvolvimento da pesquisa respeitando os princípios éticos preconizados pela Resolução CNS 466/12 e suas complementares.

Endereço: Bloco Central, Térreo, Hall da Direção, HC-UFPR, Curitiba, PR.

Horário de atendimento: das 08:00 h às 17:00 h. Fone/Fax: (+41) 3360-1041