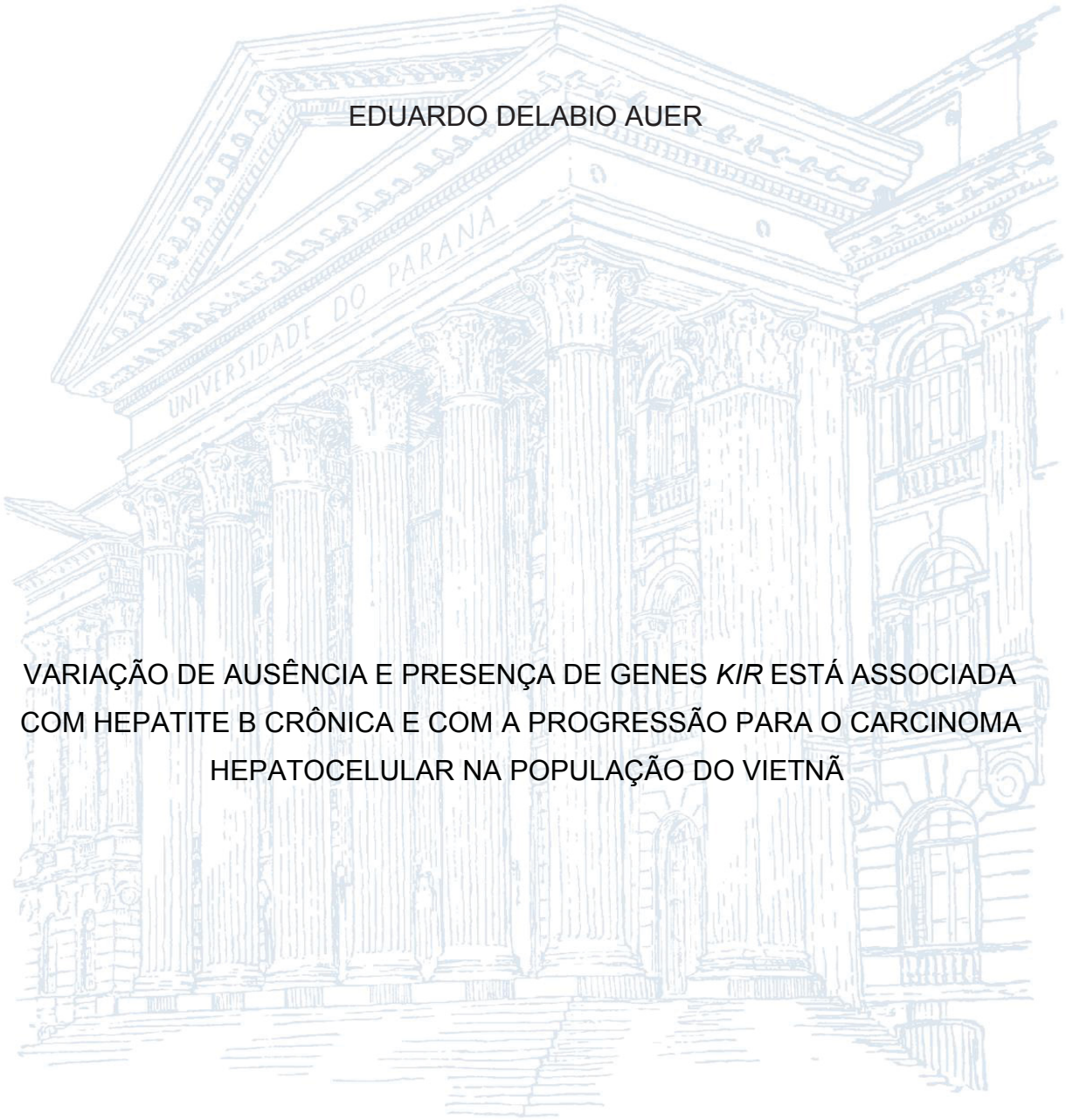
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDUARDO DELABIO AUER

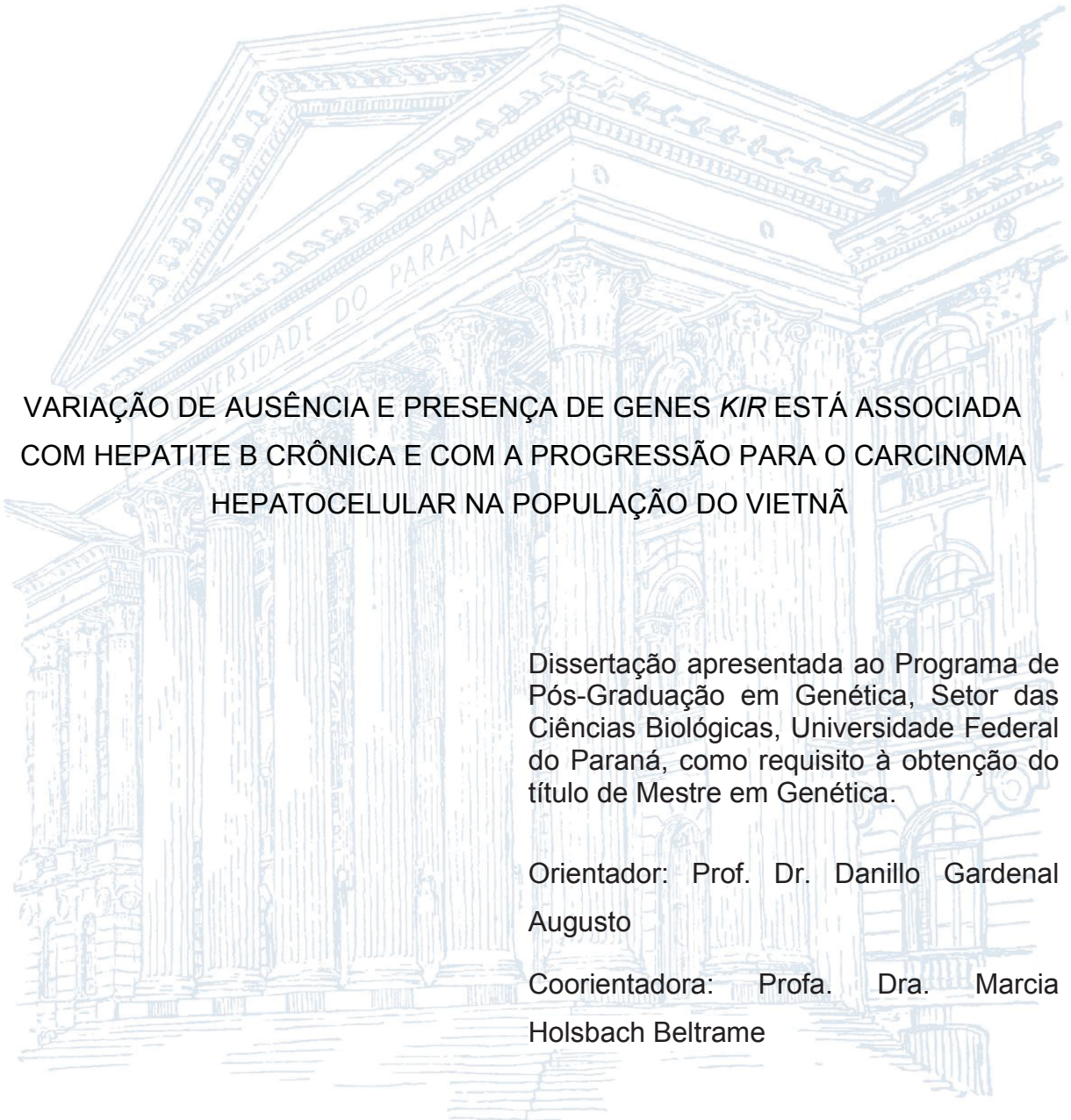


VARIAÇÃO DE AUSÊNCIA E PRESENÇA DE GENES *KIR* ESTÁ ASSOCIADA COM HEPATITE B CRÔNICA E COM A PROGRESSÃO PARA O CARCINOMA HEPATOCELULAR NA POPULAÇÃO DO VIETNÃ

CURITIBA

2019

EDUARDO DELABIO AUER



VARIAÇÃO DE AUSÊNCIA E PRESENÇA DE GENES *KIR* ESTÁ ASSOCIADA COM HEPATITE B CRÔNICA E COM A PROGRESSÃO PARA O CARCINOMA HEPATOCELULAR NA POPULAÇÃO DO VIETNÃ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor das Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Danillo Gardenal Augusto

Coorientadora: Profa. Dra. Marcia Holsbach Beltrame

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Auer, Eduardo Delabio
Variação de ausência e presença de genes *KIR* está associada com hepatite B crônica e com a progressão para o carcinoma hepatocelular na população do Vietnã. / Eduardo Delabio Auer. – Curitiba, 2019.
76 p.: il.

Orientador: Danilo Gardenal Augusto
Coorientador: Marcia Holsbach Beltrame
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Receptores de células matadoras naturais 2. Hepatite B crônica 3. Carcinoma hepatocelular 4. Estudo de associação genômica ampla 5. Vietnã I. Título II. Augusto, Danilo Gardenal III. Beltrame, Marcia Holsbach IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 616.3623

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIENCIAS BIOLOGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA - 40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

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 **EDUARDO DELABIO AUER** intitulada: **VARIAÇÃO DE AUSÊNCIA E PRESENÇA DE GENES *KIR* ESTÁ ASSOCIADA COM HEPATITE B CRÔNICA E COM A PROGRESSÃO PARA O CARCINOMA HEPATOCELULAR NA POPULAÇÃO DO VIETNÃ.**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Março de 2019.

DANILLO GARDENAL AUGUSTO
Presidente da Banca Examinadora

MARCIA REGINA PINCERATI
Avaliador Externo (UP)

KARIN BRAUN PRADO
Avaliador Interno (UFPR)

LIANA ALVES DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (UNIBRASIL)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus pela vida e pela oportunidade de realizar esta pesquisa. À minha família pelo apoio e incentivo para prosseguir.

Ao Danillo, meu orientador, que sempre me ensinou e aconselhou aquilo que deveria fazer com paciência. Também, gostaria de agradecer sobre as explicações das metodologias, dúvidas, correções, auxílio nas análises estatísticas, as quais me auxiliaram muito.

A minha coorientadora Márcia e a Professora Danielle, que também auxiliaram nas correções e me ajudavam quando eu tinha alguma dúvida.

A minha melhor amiga Fran, que sempre aguentou minhas reclamações e me incentivar a continuar.

Aos meus amigos Leonardo, Hellen e Luciana que sempre me ajudavam em conselhos, PCR e análises. Principalmente, ao Leonardo que me ensinou sobre as metodologias PCR, KIR, HLA e junto com a Hellen me auxiliaram nas genotipagens.

A Helen e a Maya por me ajudarem a fazer as PCR quando não conseguia genotipar quando meu pulso ficou doendo de tanto fazer.

Ao Dr. Thirumalaisamy P. Velavan, a Professora Angélica e ao Centro Vietnamita-Alemão de Pesquisa Médica (VG-CARE) pela gentileza de disponibilizar as amostras para este estudo. Aos indivíduos e pacientes que fizeram parte do estudo.

Ao responsável pelo Laboratório Multiusuário Roberto Hirochi Herai e a Irenice da PUC, pela disponibilização do aparelho QuantStudio 7 para as genotipagens quando houve falha do nosso.

A todos no LGMH, que em algum momento estiveram me incentivando ou me auxiliando em algo que precisava de ajuda e não foram poucas as vezes.

Ao CNPQ, CAPES e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento. Porque é melhor a sua mercadoria do que artigos de prata, e maior o seu lucro que o ouro mais fino. Mais preciosa é do que os rubis, e tudo o que mais possas desejar não se pode comparar a ela”.

Provérbios 3:13-15

RESUMO

Existem aproximadamente 257 milhões de pessoas (2018) no mundo infectadas pelo vírus da hepatite B (HBV). Em 2015, houve um total de 887.000 mortes decorrentes desta infecção e suas complicações. A prevalência de infecção pelo HBV no Vietnã é uma das mais altas do mundo, variando de 8,8% a 19%. A infecção crônica pode aumentar o risco de desenvolvimento do carcinoma hepatocelular na magnitude de 5 até 100 vezes. Parte da resposta imune contra a infecção por HBV é mediada por células *natural killer* (NK) e seus receptores ativadores e inibidores, que são cruciais no controle e resolução da infecção. Os genes *KIR* codificam receptores polimórficos das células NK que foram associados a diversas doenças. O polimorfismo desses genes influencia na habilidade das células NK em reconhecer seus alvos e consequentemente na resposta contra células infectadas e neoplásicas. O objetivo do presente estudo é verificar se a variação de ausência e presença de genes *KIR* altera a suscetibilidade à infecção crônica pelo HBV, assim como a progressão da doença para condições clínicas mais graves. Analisamos uma amostra de 497 pacientes com infecção crônica e 140 controles provenientes do Vietnã, que foram genotipadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (PCR-SSP) multiplex seguida de análise da curva de dissociação. As frequências de presença ou ausência de cada um dos 14 genes *KIR* e dois pseudogenes foram obtidas por contagem direta. A análise de associação foi realizada a partir de tabelas de contingência 2x2 utilizando o método de "*minlike*" que foi aplicado para calcular *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95%. Foram realizadas correções para múltiplos testes pelo método de *false discovery rate (*FDR). Ainda, foram realizados testes de regressão logística binária para verificar a independência das associações encontradas. A presença do grupo alélico funcional de *KIR2DS4* (OR = 1,95; p_c = 0,04) foi associada com maior uma sucetibilidade para infecção crônica. Isto que sugere que os de sinais ativadores destes receptores estão associados a um maior risco para a infecção crônica. O genótipo *B/x* ou haplótipo *B* foi associado com proteção contra o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (OR = 0,54; p_c = 0,04). A presença do haplótipo *B* provavelmente torna as células mais responsivas contra células neoplásicas e protege os indivíduos infectados por HBV de desenvolverem carcinoma hepatocelular pela ação ativadora dos seus receptores.

Palavras-chave: receptores semelhantes a imunoglobulinas das células NK. infecção crônica. vírus da hepatite B, carcinoma hepatocelular. Vietnã. estudo de associação.

ABSTRACT

Approximately 257 million people (2018) are infected with hepatitis B virus (HBV). In 2015, there were 887,000 deaths from this infection and its complications. HBV infection prevalence in Vietnam (8.8% to 19%) is one of the highest in the world. Chronic HBV infection may increase the risk of developing hepatocellular carcinoma in 5 to 100 times. Immune response against HBV infection is mediated in part by NK cells and their activators and inhibitors receptors, which are crucial in controlling and resolving the infection. KIR genes encode NK cell polymorphic receptors that have been associated with various diseases. The polymorphism of these genes influences the ability of NK cells to recognize their targets and consequently in their response against infected and neoplastic cells. The present study aims to verify if there is an association of presence and absence of these genes with differential susceptibility to HBV infection and progression in more severe clinical conditions. We analyzed a sample of 497 patients with chronic infection and 140 controls from Vietnam, which were genotyped by multiplex polymerase chain reaction using specific primers (PCR-SSP) followed by an analysis of melting curve. The frequency of presence or absence of each of the 14 *KIR* genes and two pseudogenes were obtained by direct counting. Association analysis was performed with 2x2 contingency tables using the "*minlike*" method, that was applied in order to calculate odds ratio (OR) and 95% confidence intervals. Corrections were performed for multiple tests using the false discovery rate (FDR) method. Furthermore, binary logistic regression tests were carried out to verify independence of the associations found. The presence of the functional allelic group of *KIR2DS4* (OR = 1.95; p_c = 0.04) was associated with higher susceptibility to chronic infection. It suggested that the activating signals of these receptors are associated with a greater risk for chronic infection. The *B/x* genotype or haplotype *B* was associated with protection against the development of hepatocellular carcinoma (OR = 0.54; p_c = 0.04). The presence of haplotype *B* probably makes cells more responsive against neoplastic cells and protects HBV-infected individuals from developing hepatocellular carcinoma through activating signals of their gene receptors.

Keywords: *Killer-cell immunoglobulin-like receptors*. Hepatitis B virus. Chronic infection. Hepatocellular carcinoma. Vietnam. Association study.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Desenvolvimento e diferenciação das células *Natural Killers* (NK), a partir de uma célula precursora comum do grupo células linfoides inatas. As células NK estão no subgrupo ILC1 à esquerda.....18
FIGURA 2 - Mecanismos utilizados pelos vírus para inibir o processamento e apresentação de seus antígenos para os CTL e as células NK via HLA de classe I.....20
FIGURA 3 - Estrutura e organização dos conjuntos gênicos de NKC e LRC.....21
FIGURA 4 - Haplótipos de conteúdo gênico (Haplogrupos) dos genes *KIR*.....24
FIGURA 5 - Exemplo de nomenclatura para genes *KIR*.....25
FIGURA 6 - Estrutura das moléculas do HLA de classe I e interações mais descritas com os receptores KIR nas células NK.....27
FIGURA 7 - Representação gráfica do genoma viral.....29
FIGURA 8 – Consequências clínicas da infecção adquirida na idade adulta.....34
FIGURA 9 – Fases da infecção crônica e momentos de indicação de tratamento.....35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Distribuição dos genótipos e subgenótipos do HBV segundo os países.....30
TABELA 2 - Principais Implicações Clínicas e Características conforme o Genótipo Viral do HBV.....31
TABELA 3 - Grupos de Análise de Indivíduos com HBV.....46
TABELA 4 - Frequências de genes, genótipos de *KIR* e número de genes ativadores entres os grupos controle e pacientes com infecção crônica.....51
TABELA 5 - Regressão logística binária para genes *KIR*, seus genótipos e número de genes ativadores entre os grupos controle e pacientes com infecção crônica.....52
TABELA 6 - Frequências de genes, genótipos de *KIR* e número de genes ativadores entres os grupos de pacientes.....53
TABELA 7 - Regressão logística binária para genes *KIR*, seus genótipos e número de genes ativadores entres os grupos de pacientes com infecção crônica e infecção crônica com carcinoma e carcinoma com cirrose.....54

LISTA DE SIGLAS

ALT - Alanina aminotransferase

Anti-HBc - Anticorpos produzidos contra antígenos do nucleocapsídeo (core) do HBV

Anti-HCV - Anticorpos produzidos contra as proteínas do vírus da hepatite C

Anti-IL10 – Anticorpo contra Interleucina 10

Anti-IL-10R - Anticorpo contra o receptor de Interleucina 10

AntiTGFβRII - Anticorpo contra o receptor de TGFβRII

AST - Aspartato aminotransferase

CD94 - *Cluster of Differentiation 94*

células αβT – células alfa beta T

células γδT - células gama delta T

CH - Cirrose hepática

CHC - Carcinoma hepatocelular

CHC+CH - Carcinoma hepatocelular e Cirrose hepática

CTL - Cytotoxic T lymphocyte

FAS – CD95 ou TNFRSF6 - *Necrosis factor receptor superfamily 6*

FDR – *False Discovery Rate*

f_G (%) - frequência gênica em porcentagem

f_P (%) - frequência de portador em porcentagem

GALC - *Galactocerebrosidase gene*

HBC - Pacientes com infecção crônica pelo HBV

HBcAg - *Hepatitis B virus nucleocapsid antigens*

HBeAg - *Hepatitis B e antigen*

HBsAg - *Hepatitis B s antigen*

HBV - *Hepatitis B virus*

HCV - *Hepatitis C virus*

HDV- *Hepatitis delta virus*

HepB_BD - *Hepatitis B vaccine birth dosis*

HepB3 - *Three doses of hepatitis B vaccine*

HIV - *Human immunodeficiency virus*

HLA - *Human leukocyte antigen* (Antígeno leucocitário humano)

IC - Indivíduos controle

IFN-γ - Interferon gama

ILC1 – *Innate lymphoid cells type 1*

IRF5 - *IFN regulatory factor 5*

ISG15 - *Interferon-stimulated gene 15*

ISG20 - *Interferon-stimulated gene 20 kDa protein*

ITAM - *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

ITIM - *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*

KIR - *Killer-cell immunoglobulin-like receptors*

LC - *Liver Cirrhosis* (Cirrose hepática)

LGMH - Laboratório de Genética Molecular Humana

LRC - *Leukocyte receptor complex*

NCTP - *Na+-taurocholate co-transporting polypeptide*

NK - *Natural killer cells*

NKC - *Natural killer complex*

NKG2D - *Natural Killer Group 2D receptor*

Nº - Número

OR - *Odds Ratio*

ORF – Quadro de leitura aberto

p_c – Valor de *p* corrigido pelo método de FDR

PCR - *Polymerase chain reaction*

PCR-SSP - *Polymerase chain reaction with sequence-specific primers*

PolyI:C - *Polyinosinic:polycytidylic acid*

qPCR - *Real-time quantitative polymerase chain reaction*

SNP - *Single nucleotide polymorphism*

SOCS3 - *Suppressor of cytokine signaling-3*

TGFβ - *Transforming growth factor beta*

Tm - *Melting temperature*

TNF - *Tumor necrosis factor*

TNF-α - *Tumor necrosis fator alpha*

TRAIL - *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 OBJETIVOS **16**
2.1 OBJETIVO GERAL 16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 16
3 JUSTIFICATIVA 16
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
4.1 CÉLULAS *NATURAL KILLER* (NK), VIGILÂNCIA TUMORAL E IMUNIDADE VIRAL 17
4.2 GENES DOS RECEPTORES KIR E SEUS LIGANTES 20
4.2.1 Localização cromossômica dos genes de receptores das células NK 20
4.2.2 Genes e haplótipos *KIR* 21
4.3 VÍRUS DA HEPATITE B 27
4.4 GENÓTIPOS DO VÍRUS DA HEPATITE B: EPIDEMIOLOGIA E IMPLICAÇÕES CLÍNICAS. 28
4.5 PROGRESSÃO E CURSO NATURAL NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE B 32
4.5.1 Infecção aguda 32
4.5.2 Infecção crônica 32
4.6 IMPORTÂNCIA DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER* NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE B 36
4.8 EPIDEMIOLOGIA GLOBAL DA HEPATITE B: INFECÇÃO AGUDA, CRÔNICA, COINFECÇÕES E CARCINOMA HEPATOCELULAR ASSOCIADO 37
4.9 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO, CARCINOMA HEPATOCELULAR E CIRROSE ASSOCIADOS AO HBV E COINFECÇÕES NO VIETNÃ 38
4.10 ESTUDOS POPULACIONAIS E DE ASSOCIAÇÃO REALIZADOS COM AS AMOSTRAS DO PRESENTE ESTUDO 39
4.11 ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO REVELAM A IMPORTÂNCIA DOS GENES *KIR* NA SUCETIBILIDADE À INFECÇÃO PELO HBV E OUTRAS INFECÇÕES VIRAIS 41
5 MATERIAIS E MÉTODOS 45
5.1 AMOSTRA POPULACIONAL 45
5.2 GENOTIPAGEM DOS GENES *KIR* 46
5.3 ANÁLISE DE DADOS 47
6 RESULTADOS 49
7 DISCUSSÃO 55

8 CONCLUSÕES 61

REFERÊNCIAS 62

ANEXO 2 - LAYOUT DA PLACA 384 E AS TEMPERATURAS DE MELTING DOS AMPLICONS DE CADA GENE *KIR* E *GALC* 76

1 INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite B (HBV) pertence a uma família de vírus de DNA chamada de Hepadnaviridae. O vírion inteiro é um vírus envelopado com 42 nm de tamanho (LEE, 1997). Na infecção pelo HBV, a resposta inicial do sistema imune inato, que inclui as células *natural killers* (NK, do inglês, exterminadoras naturais), tem papel importante no controle da infecção (REHERMANN; NASCIMBENI, 2005). Os mecanismos pelos quais as células NK exercem suas funções são a citoxicidade direta e a liberação de citocinas. Essas células são controladas pelos sinais de ativação ou inibição gerados por um conjunto de diferentes receptores de superfície. Um grupo destes receptores importantes na regulação das NK pertence à família dos receptores semelhantes a imunoglobulinas (KIR, do inglês, K*iller-cell Immunoglobulin-like Receptors*), que reconhecem como ligantes os antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês, *Human Leukocyte Antigen*) (AHLENSTIEL et al., 2008).

Os KIR possuem capacidade inibidora ou ativadora, são expressos em várias subpopulações de NKs, células γδT (gama delta T) e subpopulações de células αβT (alfa beta T) de memória (UHRBERG et al., 2001). Desta forma, nota-se que estes receptores apesar de terem atuação predominantemente no sistema imune inato, podem também atuar em respostas adaptativas (TROWSDALE, 2001). Os genes correspondentes a estes receptores apresentam um extensivo polimorfismo de ausência e presença, além de um pronunciado polimorfismo alélico (PARHAM, 2004).

A hipótese desse trabalho é que a variação de ausência e presença desses genes alteram a susceptibilidade à infecção ao HBV e a progressão para quadros mais graves da doença, por exemplo, ao desenvolvimento de cirrose hepática e/ou carcinoma hepatocelular. Foram analisados pacientes e controles bem caracterizados de uma amostra populacional do Vietnã, país em que as taxas de prevalência de infecção crônica do HBV estão entre as mais altas do mundo (LAVANCHY, 2008; NGUYEN, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do polimorfismo de presença e ausência de genes *KIR* na susceptibilidade à infecção crônica pelo vírus da Hepatite B (HBV) e as formas mais graves da infecção.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se o polimorfismo de presença e ausência de genes *KIR* está associado com infecção crônica pelo vírus da Hepatite B na população do Vietnã;
- Avaliar se o polimorfismo de presença e ausência dos genes *KIR* está associado ao desenvolvimento da cirrose hepática em indivíduos infectados por HBV;
- Avaliar se o polimorfismo de presença e ausência dos genes *KIR* aumenta o risco de desenvolver carcinoma hepatocelular em indivíduos infectados por HBV.

3 JUSTIFICATIVA

A infecção pelo vírus da hepatite B depende de fatores inerentes ao hospedeiro, como a efetividade da resposta imunológica, além de fatores relacionados ao próprio vírus, como a variação genotípica viral. Uma resposta menos eficiente contra o vírus favorece a progressão para cirrose hepática e/ou carcinoma hepatocelular, que podem levar o paciente a óbito (BERTOLETTI, 2006; CHISARI; FERRARI, 1995; REHERMANN; NASCIMBENI, 2005). As células exterminadoras naturais (NK) são células linfoides primariamente da resposta imunológica inata, com atividade antiviral e antitumoral. Ativação e inibição dessas células estão relacionadas ao balanço dos sinais ativadores e inibidores fornecidos por seus receptores de superfície que reconhecem, entre outras, as moléculas HLA. O polimorfismo dos genes que codificam esses receptores, pode, portanto, influenciar a capacidade da célula NK de reconhecer seu alvo e alterar a efetividade de ação contra células infectadas e neoplásicas. Existem trabalhos que apontam possíveis associações entre

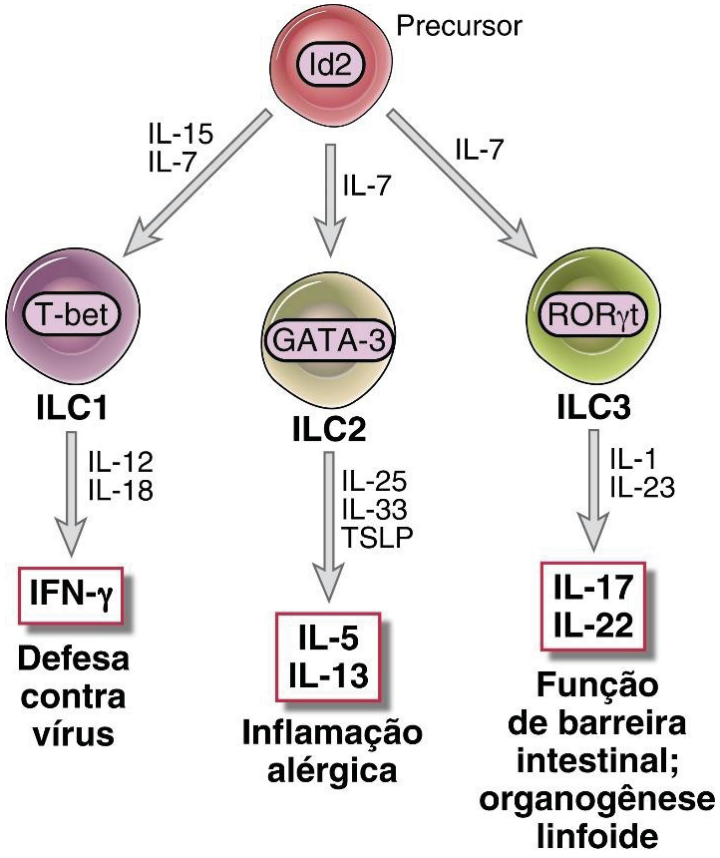
o polimorfismo de ausência e presença de genes *KIR* e a infecção crônica e progressão em pacientes infectados com HBV para a cirrose hepática e/ou carcinoma hepatocelular. No entanto, nosso trabalho é o primeiro a analisar amostras do Vietnã, país com uma das mais altas taxas de prevalência da infecção crônica de HBV (alta endemia) (LAVANCHY, 2008; NGUYEN, 2012). Dessa maneira, o presente estudo pretende contribuir de maneira significativa para a compreensão dos mecanismos genéticos que protegem contra os diferentes estágios da infecção pelo HBV. Especificamente, permite a compreensão do impacto do polimorfismo dos receptores KIR das células NK na infecção e progressão para cirrose hepática e/ou carcinoma hepatocelular em uma população de alta prevalência, nunca analisada para estes genes.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 CÉLULAS *NATURAL KILLER* (NK), VIGILÂNCIA TUMORAL E IMUNIDADE VIRAL

A classificação das células NK como células linfoides se deve à sua morfologia, marcadores e origem de um progenitor linfoide comum na medula óssea (FIGURA 1). Entretanto, são normalmente consideradas células do sistema imune inato, por não possuírem receptores de superfície celular para antígenos específicos (VIVIER et al., 2008, 2011). Apesar disso, já foi demonstrada a importância dessas células na resposta imune adaptativa, assim como na reprodução e placentação (HEDRICK, 1998; HIBY et al., 2014; HUGHES; YEAGER, 1998; MEYER; THOMSON, 2001; MOFFETT et al., 2016; NAKIMULI et al., 2015; TROWSDALE; MOFFETT, 2008; XIONG et al., 2013).

FIGURA 1 - Desenvolvimento e diferenciação das células *Natural Killers* (NK), a partir de uma célula precursora comum do grupo células linfoides inatas. As células NK estão no subgrupo ILC1 à esquerda.



FONTE: ABBAS et al. (2015)

NOTA: Três grupos das células linfoides inatas (ILCs) se desenvolvem de uma célula progenitora comum na medula óssea identificada pelo fator de transcrição Id2. Cada grupo é classificado conforme a expressão dos diferentes fatores de transcrição (T-bet, GATA-3, RORɣt) e pelas citocinas (IL-12, IL-18, IL-25, IL-33, TSLP, IL-1, IL-23) produzidas quando as células de cada grupo são ativadas. As citocinas que direcionam a diferenciação nos subgrupos e ativam as ILCs para gerar seus próprios subgrupos de citocinas são IL-15 e IL-7 (ABBAS et al., 2015).

LEGENDA: ILC1= células linfoides inatas do grupo 1, ILC2= células linfoides inatas do grupo 2, ILC3= células linfoides inatas do grupo 3, IL= interleucina

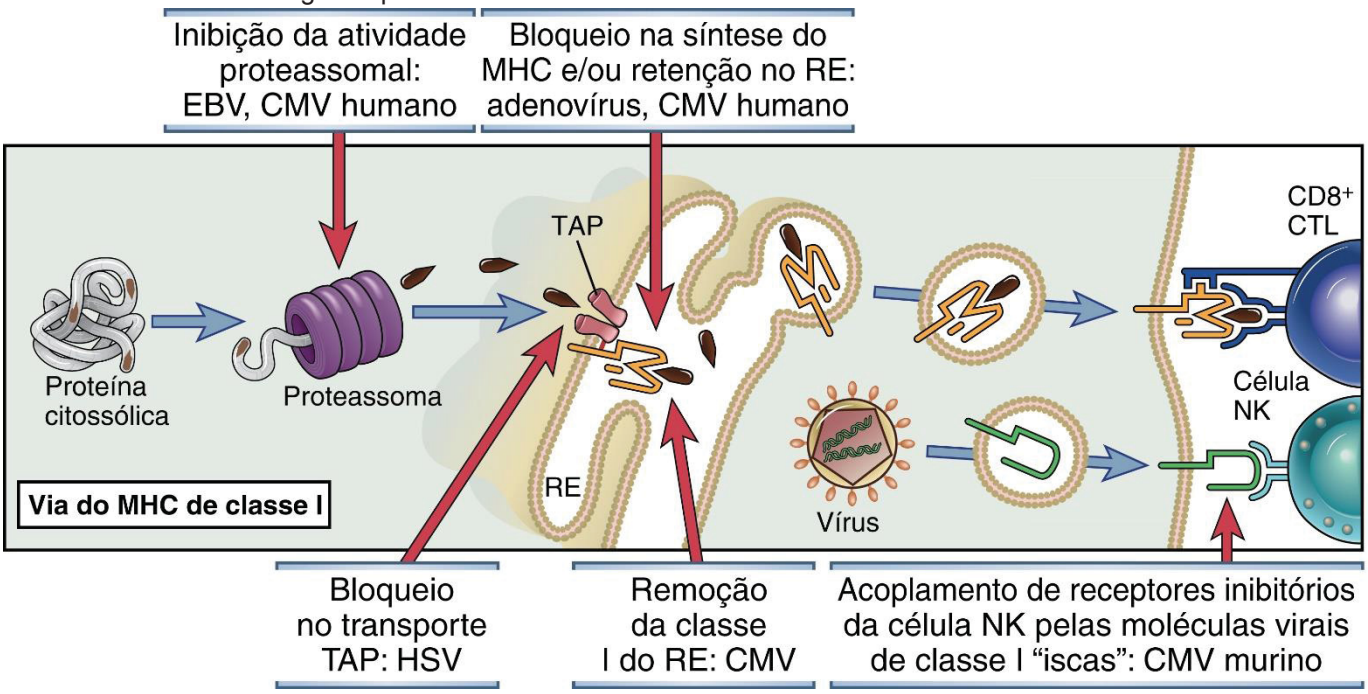
O mecanismo de citoxicidade das células NK pode ser por meio da exocitose dos grânulos citotóxicos (perforina e granzimas), pela via dos receptores de morte celular (ligantes FAS, TRAIL e TNF) e liberação de interferon gama ou óxido nítrico (SMYTH et al., 2002). Além disso, as células NK podem ser importantes no início da infecção viral, pela destruição precoce de células infectadas antes da ativação dos linfócitos T citotóxicos específicos. Também são importantes quando alguns vírus e

neoplasias escapam dos CTL (linfócitos T citotóxicos) pela diminuição da síntese, montagem e apresentação de antígenos virais pelo HLA de classe I ("*missing-self*"). O fenômeno do "*missing-self*" (falta da apresentação do antígeno próprio) pode causar o não reconhecimento das células infectadas pelos CTL e o vírus poderia escapar da resposta imune. Alguns vírus utilizam esse mecanismo através da redução de expressão das moléculas HLA, que são apresentadoras de antígenos, de forma a diminuir a resposta contra as células infectadas. No entanto, as NK se "especializaram" em reconhecer essas células com expressão anormal de HLA, atacando-as e lisando-as (LANIER, 2005; PARHAM, 2004; SUN; LANIER, 2011; VIVIER et al., 2008).

A ativação das NK, nesse caso, ocorre principalmente pela falta de ligação de moléculas HLA aos receptores inibidores das NK. Ao diminuir a inibição, há uma preponderância de sinais ativadores e a célula NK é ativada (LANIER, 2005; PARHAM, 2004; SUN; LANIER, 2011; VIVIER et al., 2008). Contudo, alguns vírus (inclusive o HBV) podem expressar proteínas capazes de afetar a expressão de NKG2D (receptor ativador heterodimérico semelhante a lectina do tipo C) ou atuar como ligantes para receptores inibidores nas células NK para suprimir sua ativação (FIGURA 2) (LANIER, 2008; ROUSE; SEHRAWAT, 2010; STEINLE et al., 2001; WENDE; VOLZ; ZIEGLER, 2000). Além disso, a superprodução e liberação das subpartículas de HBsAg (antígeno de superfície do vírion) são capazes de diminuir as repostas das células *natural killer* pelo aumento da secreção da citocina imunossupressora IL-10 (YOU, 2014).

As células NK possuem um papel importante no controle de células neoplásicas. Uma característica de células tumorais é a baixa expressão de moléculas HLA de classe I, que são ligantes de KIR, e levando a morte destas células pela falta da apresentação do antígeno próprio. Ou ainda, as células tumorais podem apresentar superexpressão de ligantes de NKG2D e sinais coestimuladores, cujo sinal é reconhecido pelas NK, que as ataca (VIVIER et al., 2011).

FIGURA 2 - Mecanismos utilizados pelos vírus para inibir o processamento e apresentação de seus antígenos para os CTL e as células NK via HLA de classe I.



FONTE: ABBAS et al. (2015)

NOTA: A figura demonstra a via da apresentação de antígenos pelo HLA de classe I e a interferência de vírus diferentes etapas do processamento. A interferência no reconhecimento pelas células T $CD8^+$ também pode ocorrer por moléculas virais "iscas" de HLA que se acoplam a receptores inibitórios de células natural killer (NK) (ABBAS et al., 2015).

LEGENDA: CMV= citomegalovírus, EBV= vírus de Epstein-Barr, RE= retículo endoplasmático, HSV= vírus do herpes simples, TAP= transportador associado a processamento de antígeno.

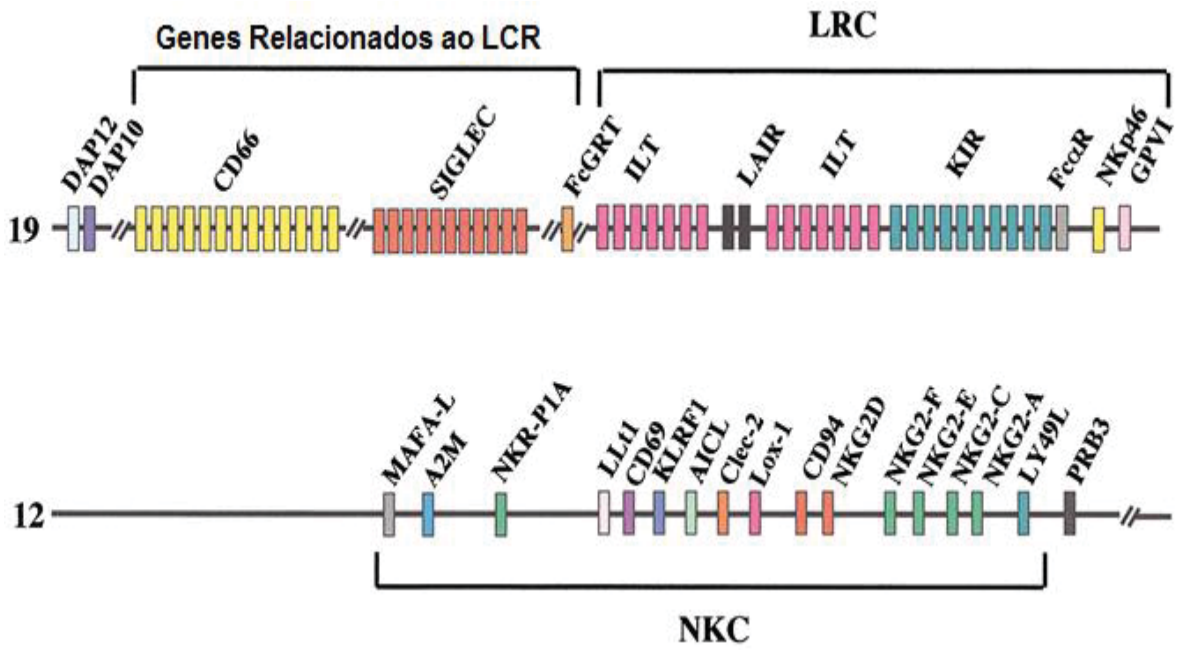
4.2 GENES DOS RECEPTORES KIR E SEUS LIGANTES

4.2.1 Localização cromossômica dos genes de receptores das células NK

Os receptores das NK são classificados em duas famílias: os receptores semelhantes a lectina do tipo C e os semelhantes às imunoglobulinas (TROWSDALE, 2001; WILSON et al., 2000). Os genes que codificam os receptores semelhantes a lectina do tipo C, que incluem o *CD94* e *NKG2*, estão no complexo dos receptores da NK (NKC, do inglês *natural killer complex*), na região genômica 12p13.1 (TROWSDALE et al., 2001). Os genes que codificam os receptores semelhantes a imunoglobulinas, que incluem os receptores KIR, estão localizados no complexo dos receptores leucocitários (LRC, do inglês *leukocyte receptor complex*), na região genômica 19q13 (FIGURA 3). Os locos dos genes *KIR* estão na região cromossômica

19q13.4. Todo o LRC possui cerca de 1 Mb (mega pares de base) de extensão (WILSON et al., 2000).

FIGURA 3 - Estrutura e organização dos conjuntos gênicos de NKC e LRC



FONTE: Adaptado de TROWSDALE (2001).
LEGENDA: LRC= complexo dos receptores leucocitários (LRC, do *inglês leukocyte receptor complex*), NKC= complexo dos receptores da NK (NKC, do *inglês natural killer complex*).

4.2.2 Genes e haplótipos *KIR*

Os genes *KIR* são: *KIR2DL1*, *KIR2DL2/3 (*anteriormente descrito como dois genes distintos: *KIR2DL2* e *KIR2DL3*)*, KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1, KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1/S1 (*anteriormente descrito como dois genes distintos: KIR3DL1 e KIR3DS1), *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, e dois pseudogenes *KIR2DP1* e *KIR3DP1* (TROWSDALE, 2001). Os genes *KIR* possuem aproximadamente 10-16 kb (quilo pares de base) de comprimento com uma sequência de aproximadamente 2 kb separando cada genes, exceto o *KIR2DL4* (trecho a montante com 14 kb) (SELVAKUMAR; STEFFENS; DUPONT, 1997; SHILLING et al., 2002; UHRBERG et al., 1997).

A nomenclatura é baseada na estrutura proteica. As proteínas podem ter dois ou três domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulinas (2D ou 3D, respectivamente). Além disso, podem possuir domínios citoplasmáticos curtos ou longos com as siglas S ou L, respectivamente, do inglês *short* (curto) e *long* (longo);

ou ainda pode ser utilizada a letra P para pseudogene. O final do dígito (número após letra do domínio citoplasmático) mostra o número do gene em ordem de descoberta (MIDDLETON; GONZELEZ, 2010).

Os KIR com domínios citoplasmáticos longos são normalmente inibidores, em virtude dos motivos de inibição baseados em imunoreceptor tirosina (ITIMs), presentes nos seus domínios citoplasmáticos. Os receptores KIR com domínios citoplasmáticos curtos são normalmente ativadores, por possuírem motivos de ativação baseados em imunoreceptor tirosina (ITAMs) (LANIER et al., 1998; OLCESE et al., 1997). A exceção é o receptor KIR2DL4, que possui um domínio ITIM na região citoplasmática e uma arginina posicionada na região transmembrana (característica de muitos receptores ativadores), portanto com função ativadora e inibidora, sendo que é predominantemente ativador (FAURE; LONG, 2002; KIKUCHI-MAKI et al., 2003; YUSA; CATINA; CAMPBELL, 2002).

Uma característica marcante de *KIR* é a variação de ausência e presença de cada gene, ou seja, o gene pode ou não estar presente no cromossomo. Esse tipo de variação estrutural não é comum em outros locos, apesar de não ser exclusivo a *KIR.* O extensivo polimorfismo de ausência e presença dos locos *KIR* gera uma grande variedade de haplótipos de conteúdo gênico, que diferem entre si em relação ao número e conteúdo de genes que cada um apresenta. Somado a esse polimorfismo de conteúdo gênico, cada gene pode apresentar diversos alelos, o que aumenta muito a complexidade e extensão do polimorfismo de *KIR* (PARHAM, 2004).

A estrutura básica de cada haplótipo de conteúdo gênico consiste em quatro genes estruturais, que estão presentes em praticamente todos os haplótipos: *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e *KIR3DP1* (MIDDLETON; GONZELEZ, 2010). Os haplótipos foram divididos em dois grupos ou conjuntos, sendo A ou B (MARTIN et al., 2002; UHRBERG; PARHAM; WERNET, 2002). Os haplótipos do haplogrupo *A* variam pouco em conteúdo gênico e incluem estes genes: *KIR3DL1*, *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DS4*, *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR3DP1, KIR2DP1*. Eventualmente, haplótipos *A* poderão ter ausência de algum desses genes. Apesar da pouca variação de conteúdo gênico deste haplogrupo, há grande variabilidade alélica em cada loco. O haplogrupo B contém um grupo muito diverso de haplótipos de ausência e presença. São classificados como haplótipos *B* aqueles que apresentem quaisquer um dos seguintes genes: *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*, *KIR2DL5* e *KIR2DL2* (MIDDLETON; GONZELEZ, 2010; UHRBERG et al., 1997; UHRBERG;

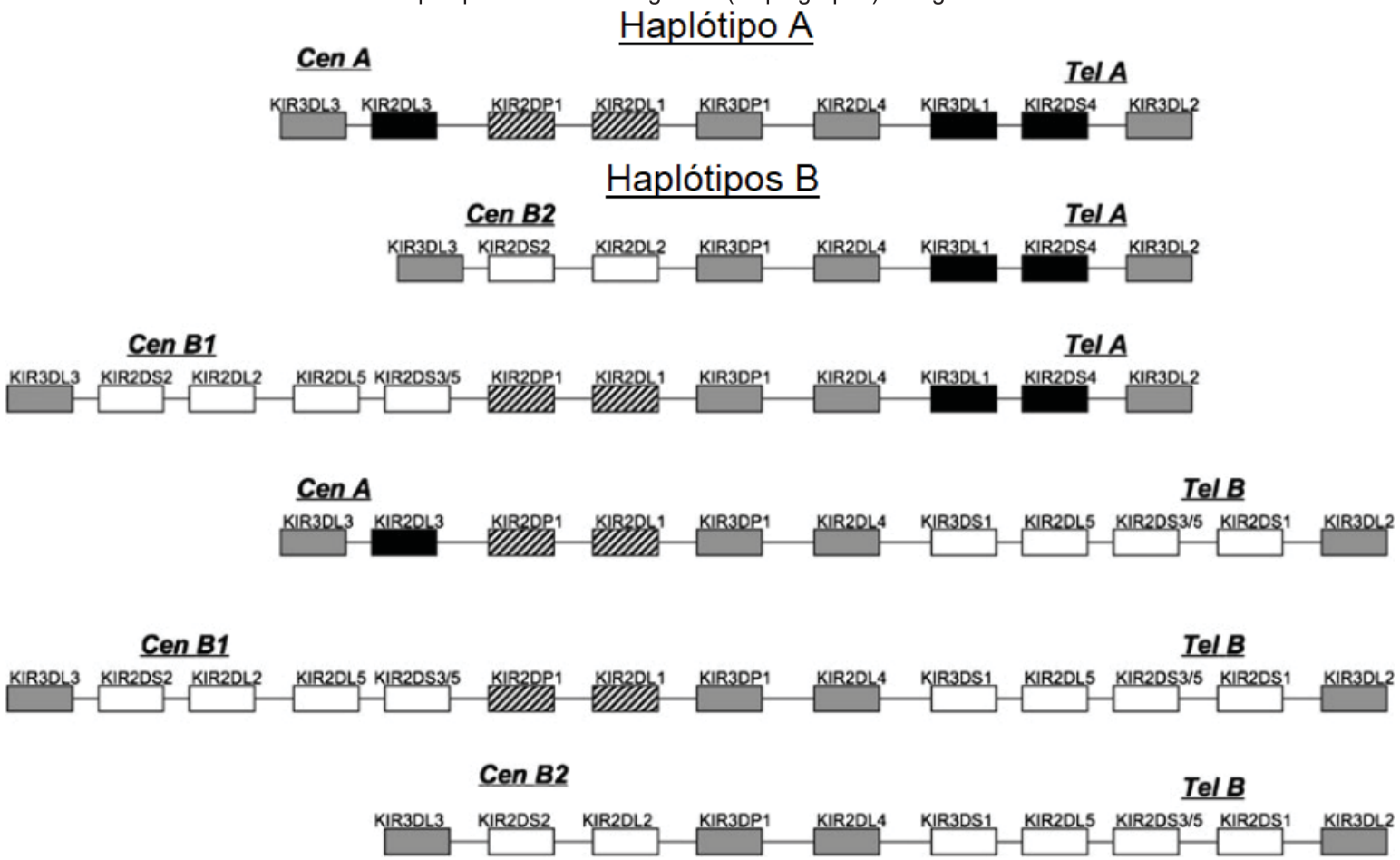
PARHAM; WERNET, 2002).

A principal diferença funcional entre os haplótipos está na quantidade de receptores ativadores. No haplótipo *A*, existem apenas dois genes ativadores (*KIR2DL4 e KIR2DS4*), sendo que no haplótipo *B* possui várias combinações destes receptores (KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5, KIR3DS1, KIR2DS4) (CAMPBELL; TROWSDALE, 1993; HSU et al., 2002a; MAXWELL et al., 2002). Há grande quantidade de haplótipos de *KIR* descritos, mas é importante notar que a maioria deles é uma variação de seis principais conjuntos gênicos, também chamados de motivos (FIGURA 4). A maioria dos haplótipos é composta por combinações de três motivos centroméricos (*Cen A*, *Cen B1* e *Cen B2*) e dois teloméricos (*Tel A* e *Tel B*). A região centromérica é margeada pelos genes *KIR3DL3* até o *KIR3DP1*, enquanto a região telomérica, pelos genes *KIR2DL4* até *KIR3DL2* (HOLLENBACH et al., 2012; PYO et al., 2010).

O gene *KIR2DS4* possui um grupo de alelos que codificam uma proteína não funcional (também chamada de KIR1D) devido a uma deleção de 22 bp no exon 5, que provoca mudança do quadro leitura e produz uma proteína sem domínios transmembrana e citoplasmáticos (domínio D2, ≈70% da sequência). Dessa forma, o produto gerado pelos alelos que apresentam essa deleção é incapaz de se ancorar na membrana plasmática, não funcionando como um receptor de membrada, mas com um possível e não demonstrado potencial de ser secretado (MAXWELL et al., 2002; MIDDLETON; GONZALEZ; GILMORE, 2007).

Os alelos de cada gene *KIR* são nomeados da seguinte forma: os três primeiros dígitos distinguem alelos diferentes nas sequências de exons que levam a alterações não-sinônimas. Os próximos dois dígitos indicam alelos que diferem em sequências de exons, os quais levam a alterações sinônimas e os dois últimos dígitos são utilizados para alelos que só diferem em um intron, promotor ou outra região não codificadora (FIGURA 5) (MIDDLETON; GONZELEZ, 2010).

FIGURA 4 - Haplótipos de conteúdo gênico (Haplogrupos) dos genes *KIR*

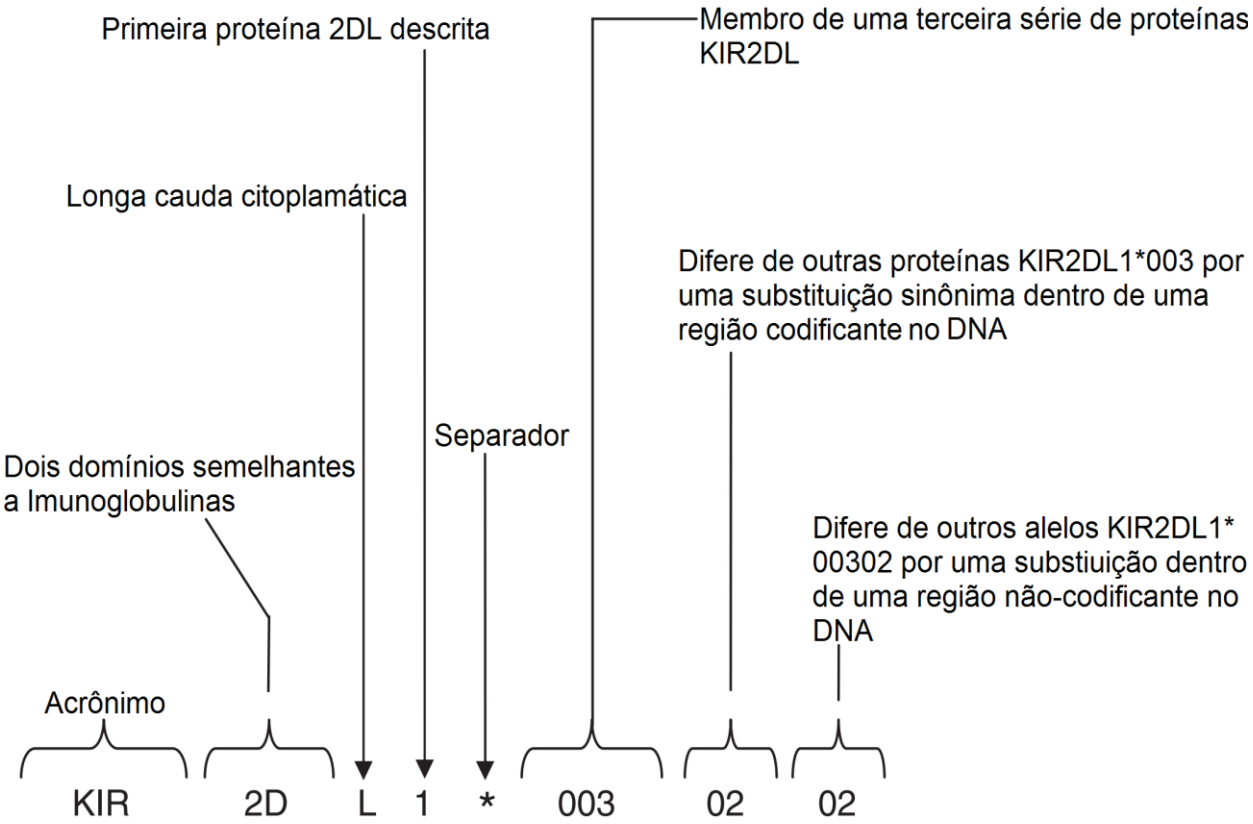


FONTE: Adaptado de HOLLENBACH et al., (2012)

NOTA: Estruturas dos principais haplótipos de conteúdo genético (haplogrupo) encontrados nas populações mundiais. O código de cores usado é para diferenciar os genes de acordo com o tipo do haplogrupo. Genes com preenchimento cinza são os genes "moldura"; genes com preenchimento e hachurados são genes presentes tanto no haplogrupo *A* e *B*; genes com preenchimento branco são característicos para o haplogrupo *B*; genes com o preenchimento de cor preta são característicos para o haplogrupo *A* (HOLLENBACH et al., 2012).

Legenda: *Cen A*=motivo centromérico A; *Cen B1*= motivo centromérico B1; *Cen B2*= motivo centromérico B2; *Tel A*= motivo telomérico A; *Tel B*= motivo telomérico B.

FIGURA 5 - Exemplo de nomenclatura para genes *KIR*



FONTE: Adaptado de MIDDLETON; GONZELEZ (2010)

4.2.3 Os antígenos leucocitários humanos (HLA) e sua interação com KIR

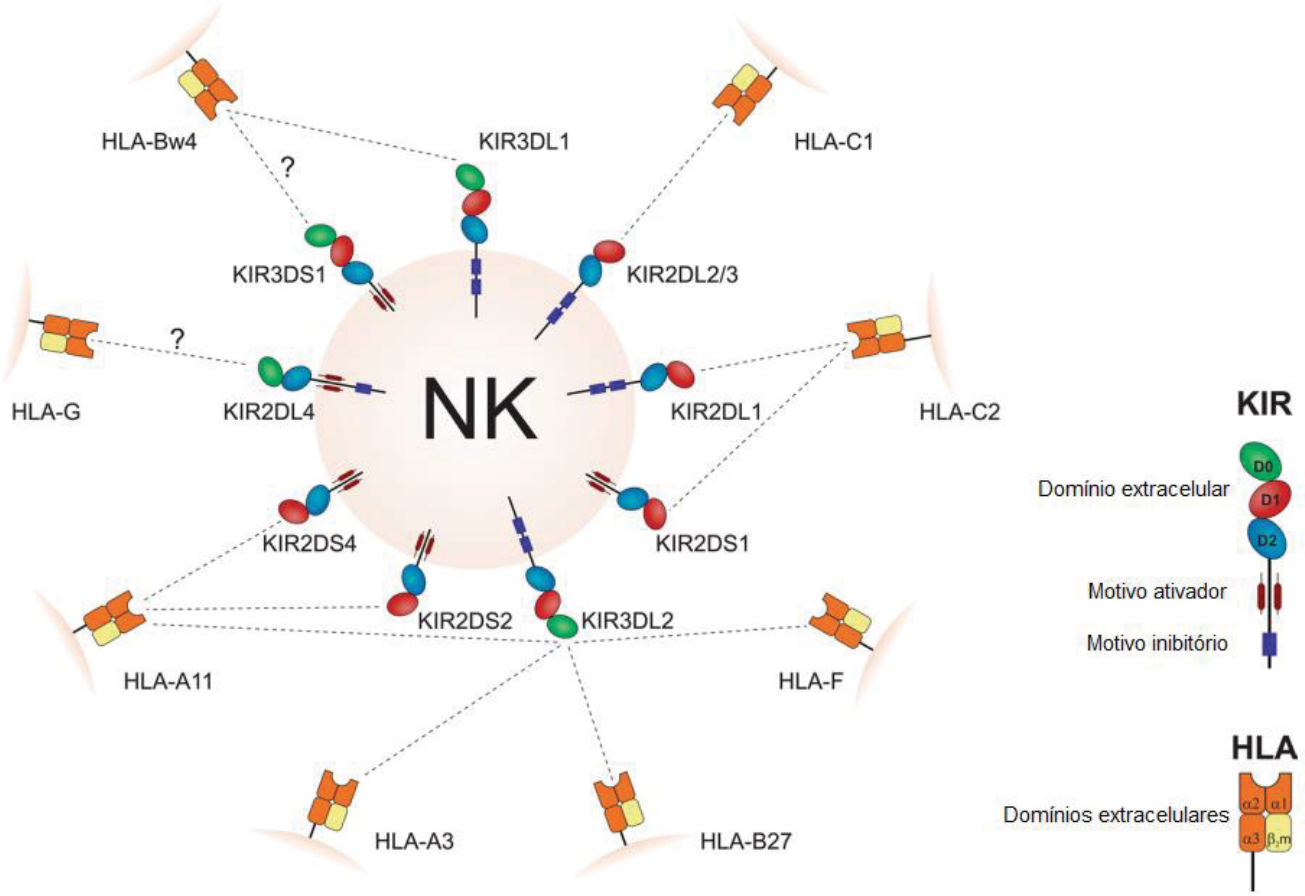
As células NK e suas funções são controladas pelas interações de seus receptores com os ligantes HLA (antígeno leucocitário humano) de classe I, codificados por genes localizados na região do HLA no cromossomo 6, na região 6p21.3. As moléculas HLA de classe I são expressas na superfície de todas as células nucleadas, são glicoproteínas que apresentam antígenos para os linfócitos T CD8 e funcionam como ligantes para os receptores KIR. As moléculas de classe I apresentam antígenos de microrganismos e peptídeos endógenos, são divididas em HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F e HLA-G. A presença e expressão de determinadas moléculas HLA de classe I na superfície celular é importante para reconhecimento de KIR inibidores ou ativadores. Os principais ligantes para os receptores KIR são moléculas de HLA-C, HLA-A e HLA-B, assim como HLA-F e, possivelmente, HLA-G (AUGUSTO; PETZL-ERLER, 2015).

As moléculas HLA de classe I são glicoproteínas cuja função principal é a apresentação de antígenos para os linfócitos T $CD8^{+}$. Os polipeptídios de HLA são

formados por heterodímeros ligados não covalentemente (cadeia leve e pesada), sendo que sua cadeia pesada codificada pelos genes *HLA*, atravessa a bicamada lipídica e sua porção N-terminal fica voltada para o lado extracelular. A porção extracelular (cadeia pesada α) é dividida em três partes α_1, α_2 e α_3. A parte da cadeia leve é uma proteína chamada β_2 microglobulina, codificada por um gene no cromossomo 15 na região 15q21.1. As cadeias pesadas de HLA-A, HLA-B e HLA-C são homólogas e suas diferenças estão no tamanho dos domínios citoplasmáticos e transmembrana. Os domínios α_1 e α_2 são responsáveis por acomodar os peptídeos antigênicos a serem apresentados. O domínio α_3 é responsável pela ligação ao linfócito T $CD8^+$, ademais, o domínio de microglobulina β_2 e α_2 auxiliam nesta ligação (BJORKMAN et al., 1987; BJORKMAN; PARHAM, 1990; HORTON et al., 2004; MARRACK et al., 2008; MARTÍNEZ-BORRA; LÓPEZ-LARREA, 2012; MAZZA; MALISSEN, 2007; REITH; LEIBUNDGUT-LANDMANN; WALDBURGER, 2005).

Os principais ligantes HLA para os receptores KIR2DL1, KIR2DL2 e KIR2DL3 são moléculas de HLA-C e para KIR3DL2 são HLA-A11 e HLA-A3, mas podem se ligar a HLA-B27 e HLA-F. KIR2DL2 e KIR2DL3 reconhecem os alótipos HLA-C do grupo 1 (C1), que possuem uma asparagina na posição 80 (C1: N80). KIR2DL1 se liga aos alótipos do grupo 2 HLA-C (C2) e possuem uma lisina na posição 80 (C2: K80). Para KIR3DL1 e KIR3DS1, seus ligantes são moléculas HLA-B com o epítopo Bw4, com cinco aminoácidos variáveis que se estendem às posições 77-83. As moléculas que não se conhece com qual receptor KIR têm capacidade para se ligar são o HLA-A que não possuem o epítopo Bw4 (não Bw4:T80) e HLA-B Bw6 (Bw6:N80). A FIGURA 6 mostra a estrutura de uma molécula HLA de Classe I e as principais interações KIR-HLA (AUGUSTO; PETZL-ERLER, 2015; CARR; PANDO; PARHAM, 2005; CELLA et al., 1994; GRAEF et al., 2009; GUMPERZ et al., 1995; KOSTYU; CRESSWELL; AMOS, 1980; MANDELBOIM et al., 1996; MÜLLER et al., 1989; O'CONNOR et al., 2007; WINTER; LONG, 1997)

FIGURA 6 - Estrutura das moléculas do HLA de classe I e interações mais descritas com os receptores KIR nas células NK



FONTE: Adaptado de AUGUSTO; PETZL-ERLER (2015)
LEGENDA: ? = Interações entre KIR e HLA ainda controversas nas células NK

4.3 VÍRUS DA HEPATITE B

O genoma viral de HBV é um DNA circular de fita parcialmente dupla com aproximadamente 3200 pares de bases, que codificam quatro quadros de leitura abertos sobrepostos (ORFs): gene *S*, para a superfície ou envelope; gene *C*, para o gene “core”, o qual é responsável pelo antígeno HBc (HBcAg); *X*, para o gene *X* e *P* para o gene da DNA polimerase. O vírion inteiro, partícula de Dane, é uma esfera de 42 nm que contém um nucleocapsídeo e um envelope. As proteínas do envelope viral são codificadas pelo gene *S* (BLUM; GEROK; VYAS, 1989; LEE, 1997).

O desenvolvimento da imunidade celular e humoral ao antígeno de superfície no envelope viral (HBsAg) é protetor contra a infecção. O HBcAg compõe o nucleocapsídeo, que contém o DNA viral. A entrada do vírion na célula hepática (hepatócito) ocorre por endocitose com perda de envoltório. O mecanismo de entrada do vírus envolve vários processos, dentre eles, a ligação inicial de baixa afinidade do

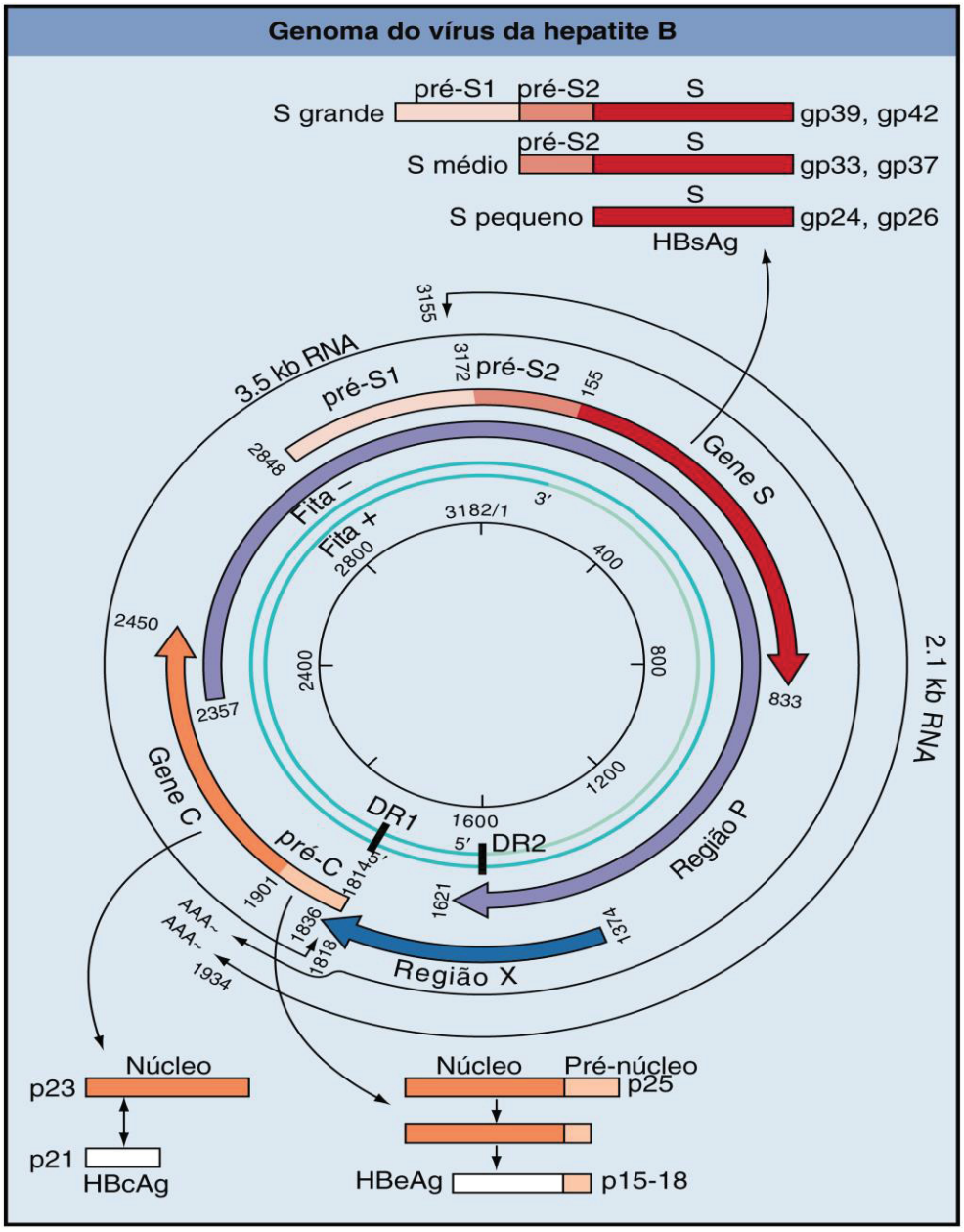
determinante antigênico (a) de uma glicoproteína do HbsAg com os proteoglicanos de heparan sulfato na membrana plasmática da célula; após esta ligação inicial; a proteína L do HBsAg interage com o polipeptídio Co-Transportador de Na^+/Taurocolato (NCTP) e desta interação com alta afinidade é desencadeada a endocitose do vírion (BLUM; GEROK; VYAS, 1989; LEE, 1997; NI et al., 2014; SUREAU; SALISSE, 2013; TREICHEL et al., 1997; YAN et al., 2012).

Quando os peptídeos derivados de HBcAg são expressos na superfície dos hepatócitos, eles induzem uma resposta imune celular. O antígeno “e” do vírus (HBeAg), é um peptídeo circulante codificado do gene *C*, que serve como um marcador de replicação viral ativa. O gene *P* longo codifica uma DNA polimerase que contém domínios de transcriptase reversa e ribonuclease H, dado que a replicação requer intermediários de RNA. O gene *X* codifica as proteínas que servem como ativadores de transcrição e proteínas quinases, auxiliando na replicação viral. As proteínas codificadas pelo gene *X* podem estar envolvidas no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (BLUM; GEROK; VYAS, 1989; LEE, 1997; RADZIWILL; TUCKER; SCHALLER, 1990). Os fluidos corporais que podem ter o HBV são sangue, saliva, sêmen, secreções vaginais e em menor extensão, suor, leite materno e lágrimas (LAVANCHY, 2008). A FIGURA 7 mostra a representação do genoma viral.

4.4 GENÓTIPOS DO VÍRUS DA HEPATITE B: EPIDEMIOLOGIA E IMPLICAÇÕES CLÍNICAS.

Genótipos e subgenótipos virais são genomas virais que divergiram nas sequências nucleotídicas, devido a uma taxa de substituição de nucleotídeos, pela transcriptase viral. A classificação para a existência de um genótipo viral consiste na variação nucleotídica do genoma acima de 8% e, para subgenótipos, entre 4% e 8%. Foram identificados inicialmente genótipos de A até H, e posteriormente mais dois novos: I e J (TABELA 1) (KAO, 2002; SUNBUL, 2014). A TABELA 1 mostra a distribuição dos principais genótipos e subgenótipos virais de acordo com os países. A TABELA 2 demonstra as principais implicações clínicas e características virais dos diferentes genótipos de HBV (SUNBUL, 2014).

FIGURA 7 - Representação gráfica do genoma viral.



Fonte: ROSENTHAL; PFALLER; MURRAY (2017)

NOTA: DNA, RNA e proteínas virais são representadas graficamente. Os círculos azuis no interior representam o genoma do DNA o número de nucleotídeos no centro. As sequências repetitivas DR1 e DR2 são importantes para a replicação e integração viral. O círculo no exterior é o RNA transcrito (3.500 nucleotídeos de tamanho) serve de molde para a replicação do genoma. Pode ser visto que várias proteínas virais são traduzidas por diferentes códons de iniciação do mesmo RNA mensageiro (ROSENTHAL; PFALLER; MURRAY, 2017).

LEGENDA: AAA= cauda poliA (poliadenilada) na extremidade 3’ do RNA mensageiro, HBcAg= antígeno do nucleocapsídeo do vírus da hepatite B, HBsAg= antígeno de superfície do envelope viral, S grande= glicoproteína do HBsAg grande, S média= glicoproteína do HBsAg média, S pequeno= glicoproteína do HBsAg pequeno.

TABELA 1 - Distribuição dos genótipos e subgenótipos do HBV segundo os países.

País	Genótipos	Subgenótipos	País	Genótipos	Subgenótipos
China	B, C	B2, C1, C2	Índia	A, C, D	-
Indonésia	C, B	C1, B3, B7, C10, B9 e C8	Canadá	C, B, A, D	
Tunísia	D, F	-	República Centro-Africana	A, D, E	A1,D4
Turquia	D	D2, D1, D3	Arábia Saudita	D, E	D1
Brasil	A, F	A1, F2a, A2, F4	Irã	D	D1
Vietnã	B, C, I	B2-5, C5-16	Mongólia	D	-
Taiwan	B	B2,B5	África do Sul	D	D3
Coreia do Sul	C	-	Tailândia	C, B	C1-5
Hong Kong	C,B	-	Itália	D	-
Gâmbia, Nigéria Haiti, Congo, Ruanda Camarões	A	A4, A5, A6, A7	Marrocos	D, A	D1, D7, A2
			Argentina	F	F1, F2, F4
			Marrocos	D	D1
			Pasquistão	D	-
Japão	A, C	C1, C2, C3	Austrália	C, D	C4, D4
Filipinas	A, B, C	A1, B5, C5	Espanha	A, D, F	-

FONTE: Adaptado e Modificado de SUNBUL (2014)

TABELA 2 - Principais Implicações Clínicas e Características conforme o Genótipo Viral do HBV

Genótipo	B	C	A	D	E-J
Características clínicas					
Modos de transmissão	Perinatal/vertical	Perinatal/vertical	Horizontal	Horizontal	Horizontal
Tendência à cronicidade	Baixa	Alta	Alta	Baixa	ND
Positividade para HBeAg	Menor	Maior	Maior	Menor	ND
Soroconversão de HBeAg	Precoce	Tardia	Precoce	Tardia	ND
Remoção sérica de HBsAg	Maior	Menor	Maior	Menor	ND
Atividade na histologia hepática	Pouca	Muita	Pouca	Muita	ND
Prognóstico Clínico (HCC, LC)	Melhor	Pior	Melhor	Pior	Pior no genótipo F
Resposta ao IFN-α	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Baixa no genótipo G
Resposta aos análogos de nucle(s)tídeos	Sem diferença significativa entre os genótipos de A a D				ND
Características virológicas					
Nível sérico de DNA viral	Baixo	Alto	ND	ND	ND
Frequência da mutação PC A1896	Alta	Baixa	Baixa	Alta	ND
Frequência da mutação BCP T1762/A1764	Baixa	Alta	Alta	Baixa	ND
Frequência da mutação de deleção do preS	Baixa	Alta	ND	ND	ND

FONTE: Adaptado e Modificado de SUNBUL (2014)
LEGENDA: HCC- Carcinoma Hepatocelular, LC- Cirrose Hepática, ND- Dados não disponíveis, HBsAg- Antígeno de superfície do HBV, HBeAg- Antígeno HBe do HBV.
NOTAS: A mutação PC A1896 abole a expressão de HBeAg. A mutação dupla T1762/A1764 aumenta a replicação e diminui a síntese de HBeAg. A mutação de deleção preS produz uma proteína truncada ou causa perda de epítopos no HBsAg.

4.5 PROGRESSÃO E CURSO NATURAL NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE B

4.5.1 Infecção aguda

A infecção aguda pode ser uma infecção assintomática, hepatite autolimitada (remoção viral e imunidade contra reinfecção) e até hepatite fulminante (coinfecção com o vírus da hepatite D ou uma resposta imune exagerada), dependendo de fatores virais e do hospedeiro (GANEM; PRINCE, 2004; LIAW; CHU, 2009). Aproximadamente 90% dos indivíduos adultos infectados terão resolução da infecção de forma espontânea. A FIGURA 8 revela os possíveis desfechos clínicos da infecção adquirida na idade adulta. Mas, indivíduos adultos que contraíram a infecção verticalmente (infecção intrauterina ou durante o parto) poderão apresentar um quadro crônico, em mais de 90% dos casos (SHIN; SUNG; PARK, 2016). A infecção aguda pode apresentar sintomas clínicos dentro de 45-180 dias. Algumas semanas depois da infecção, há a liberação viral por mecanismos não citopáticos. A maior parte da remoção viral é feita pela ação de citocinas antivirais das células do sistema imune adaptativo e inato como o fator de necrose tumoral α, interferon α ou interferon β (LIAW; CHU, 2009).

Conforme o declínio da quantidade viral, há o surgimento da resposta citotóxica, por meio da apoptose ou necrose dos hepatócitos. O principal mecanismo de controle viral e dano hepático é por meio da apresentação de antígenos virais na superfície celular dos hepatócitos, pelas moléculas HLA de classe I, aos linfócitos T $CD8^+$ citotóxicos. Uma resposta vigorosa e coordenada pelos linfócitos T $CD8^+$ e T $CD4^+$ (remoção de células infectadas) e células B (produção de anticorpos neutralizantes contra o HBsAg que bloqueiam a disseminação e a entrada dos vírions) são importantes para a remoção eficiente do vírus. Na infecção crônica, esta resposta é insuficiente e existe uma resposta inflamatória persistente (LIAW; CHU, 2009; SHIN; SUNG; PARK, 2016).

4.5.2 Infecção crônica

A infecção crônica adquirida na época perinatal ou durante a infância passa por três fases: imunotolerante, *imunoclerance* (imunorreativa) e portador inativo

(infecção oculta). As fases da infecção crônica no adulto consiste nas últimas duas (*imunoclerance* (imunorreativa) e portador inativo). Além disso, pode ocorrer a fase de reativação em pacientes na fase inativa. A fase imunotolerante é marcada pela resposta citotóxica ineficiente das células T; além disso, normalmente ocorre em pacientes pediátricos (recém-nascidos ou crianças com até 2 anos de vida). Isso decorre devido ao sistema imunológico ainda estar imaturo (LIAW; CHU, 2009; RAIMONDO et al., 2008; YUEN et al., 2018). Existe uma nova sugestão de terminologia das fases da infecção crônica. As fases de imunotolerância, *imunoclerance*, portador inativo e reativação serão substituídas por infecção crônica HBeAg positiva, hepatite crônica HBeAg positiva, infecção crônica HBeAg negativa e hepatite crônica HBeAg negativa, respectivamente (LAMPERTICO et al., 2017). A FIGURA 9 demonstra as fases da infecção crônica que possuem maior replicação viral (nível sérico de DNA do HBV), dano hepático (marcador bioquímico - enzima ALT) e indicações de tratamento.

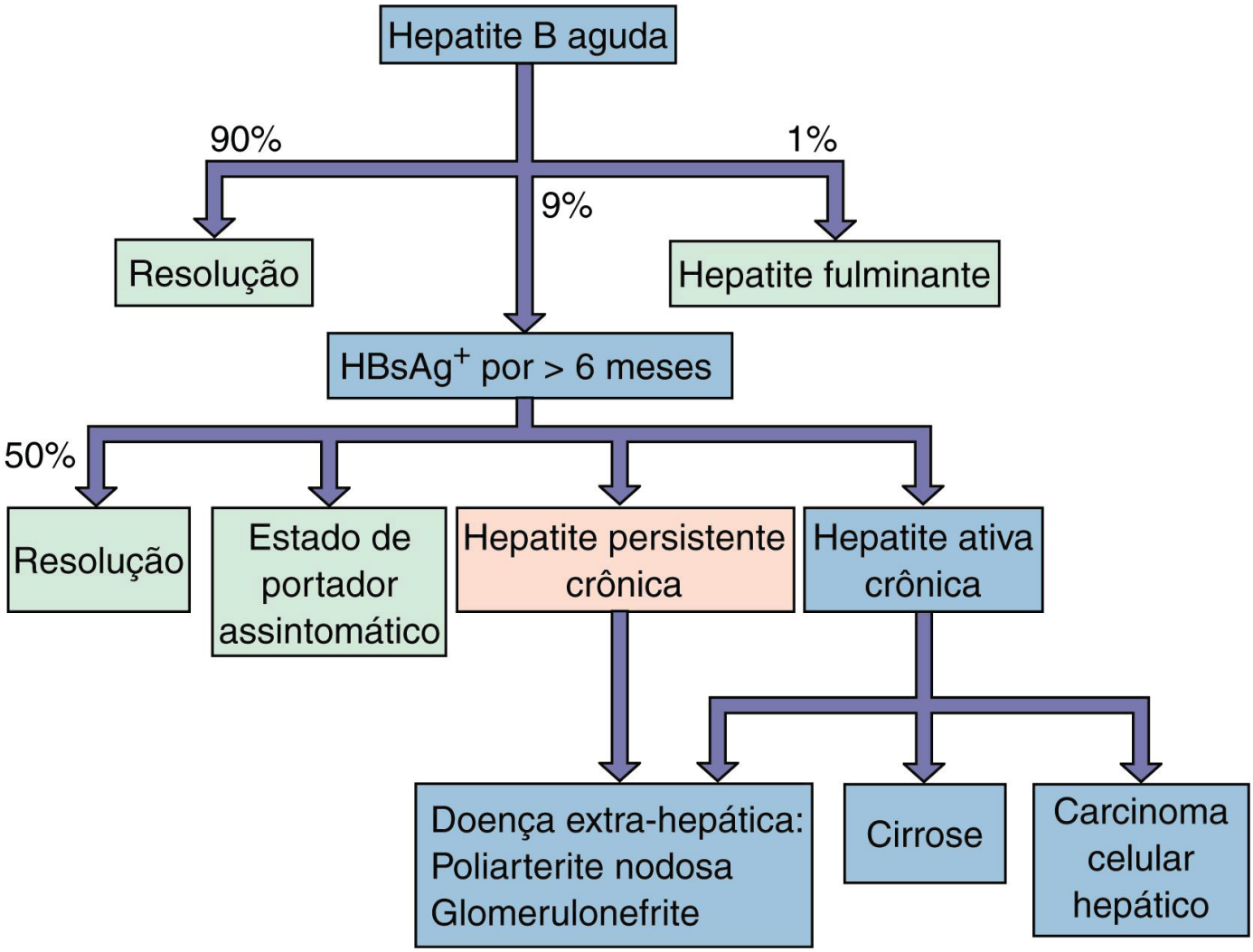
A fase imunotolerante (infecção crônica HBeAg positiva) pode ser dita como fase com alta replicação e com pouca inflamação, porque pode ocorrer uma forma branda de inflamação hepática. A morte dos hepatócitos nesta fase ocorre primariamente por apoptose ou necroptose. A principal preocupação em deixar pacientes nesta fase sem tratamento seria o possível surgimento de mutações oncogênicas, pelo aumento imunomediado de proliferação de hepatócitos, durante anos. Ademais, a integração viral no DNA da célula hospedeira pode ocorrer em uma frequência suficiente para causar mutação em qualquer um dos genes do hospedeiro. Além disso, o escape da morte pelos hepatócitos pré-neoplásicos das células T citotóxicas (resistência à infecção ou portadores de vírus mutantes para HBeAg negativo), pode servir como mecanismo seletivo vantajoso para as células neoplásicas (KENNEDY et al., 2017; MASON et al., 2016).

A fase imunorreativa (hepatite crônica HBeAg positiva) é marcada por lesão, apoptose e necrose, imunomediadas em células infectadas. Nesta fase, as células NK ativadas causam lesões hepáticas por meio da liberação de TNF-α (via da morte mediada pelo ligante TNF e receptor TRAIL) (YOU, 2014). Além disso, pode ocorrer falha hepática fulminante, cirrose e CHC (carcinoma hepatocelular). Todavia, uma pequena quantidade de DNA viral pode persistir no estado inativo, passando para a fase de portador inativo (LIAW; CHU, 2009).

A infecção oculta (portador inativo ou infecção crônica HBeAg negativa) é definida pela presença do DNA viral no fígado (com ou sem a detecção viral sérica) e com a ausência do antígeno HBs. Quando há detecção de DNA viral sérico, normalmente este é abaixo de 200 IU/mL (RAIMONDO et al., 2008).

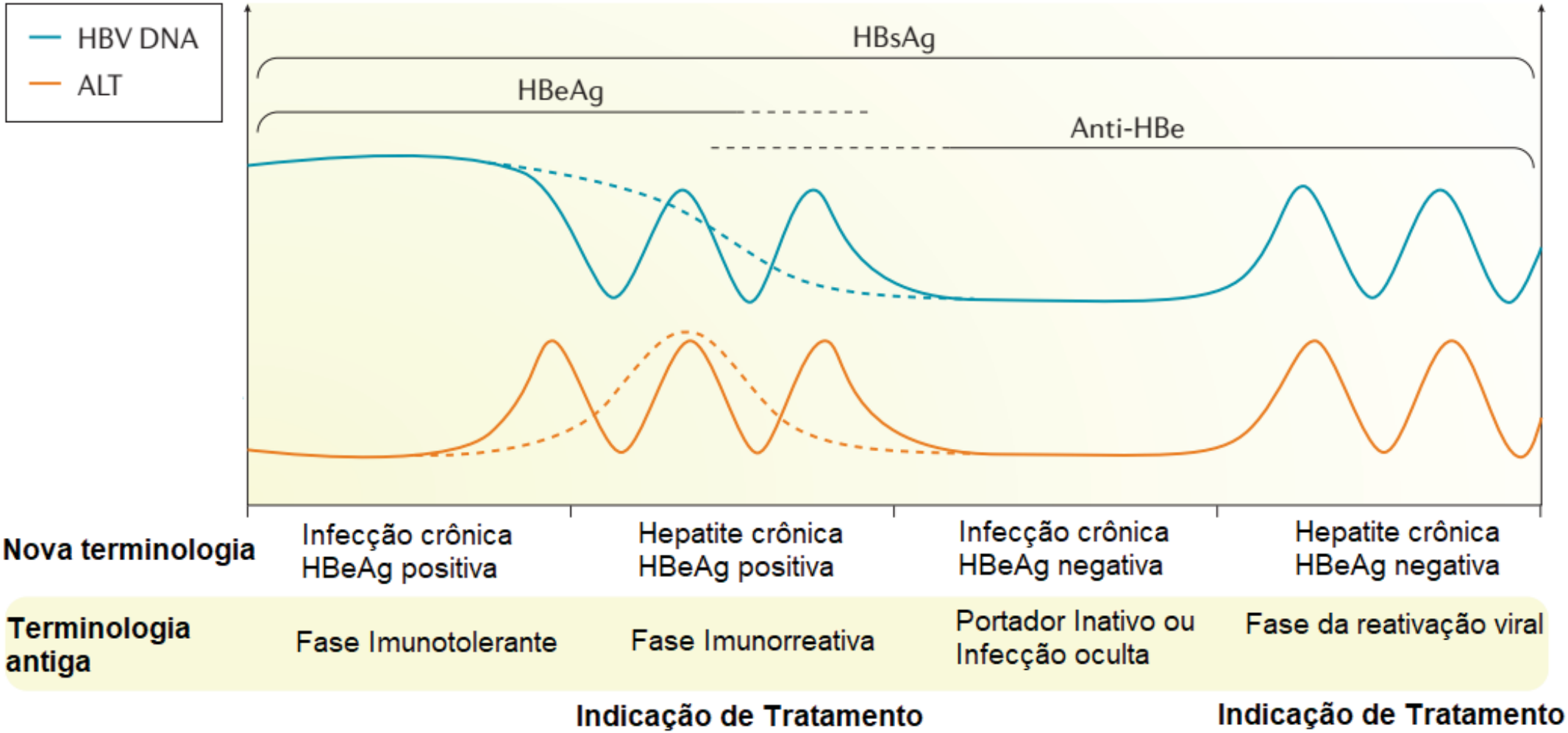
A reativação da replicação viral (hepatite crônica HBeAg negativa) ocorre em 1% a 4% de pacientes portadores crônicos, ademais, pode ocorrer a reativação em pacientes imunossuprimidos (quimioterapia para neoplasias, transplante de medula óssea, terapia com corticosteroides, coinfecção com o HIV) (LIAW; CHU, 2009; SHOUVAL; SHIBOLET, 2013).

FIGURA 8 – Consequências clínicas da infecção adquirida na idade adulta



Fonte: ROSENTHAL; PFALLER; MURRAY (2017)

FIGURA 9 – Fases da infecção crônica e momentos de indicação de tratamento



FONTE: Adaptado de YUEN et al. (2018)

NOTA: Imagem demonstrando a relação entre os níveis de DNA do vírus da hepatite B e alanina transaminase com as diferentes fases da infecção crônica usando a terminologia nova e antiga.

LEGENDA: HBV DNA= níveis séricos de DNA do vírus da hepatite B, ALT= níveis séricos de e alanina transaminase.

4.6 IMPORTÂNCIA DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER* NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE B

A importância da ativação das células NK foi revelada em um estudo conduzido por TONG et al. (2017). A resolução da infecção pelo HBV foi avaliada em camundongos transgênicos, os quais foram submetidos a inoculação de um plasmídeo pAAV/HBV1.2 para simular uma infecção. Segundo o estudo, em ratos que receberam o tratamento com PolyI:C (análogo sintético do RNA de dupla fita utilizado para mimetizar uma infecção viral) antes da infecção, houve uma maior ativação das NK com diminuição dos níveis séricos de HBV; além disso, quando houve outra administração do tratamento houve o acúmulo de células NK no fígado. Desta forma, os autores concluíram que o efeito contra o HBV pelo tratamento dependia das NK, sendo que sua depleção diminuía o efeito antiviral do PolyI:C. Por fim, os autores demonstraram em seus resultados com ratos transgênicos e imunotolerantes para o HBV que as Natural Killers ativadas por PolyI:C são capazes de suprimir a infecção natural, demonstrando-se a importância da ativação das NK na resolução pela infecção do HBV (TONG et al., 2017).

Um estudo conduzido por PEPPA et al. (2010) em pacientes com infecção crônica mostrou um defeito na produção e liberação da citocina antiviral Interferon Gama (IFN-γ), a qual é responsável pela eliminação de hepatócitos infectados pelo HBV por vias não citolíticas. Segundo os autores, esta tolerância parcial nas NKs era responsável pelo bloqueio na produção do IFN-γ e foi causada pela ação das citocinas imunossupressoras IL-10 e TGFβ, as quais eram induzidas em pacientes com Hepatite B crônica. Os autores do estudo conseguiram reverter este quadro de incapacidade de produção de IFN-γ nestes pacientes, pelo uso de anticorpos contra IL-10 e seu receptor (anti-IL10 e anti-IL-10R) e contra o receptor de TGFβ (antiTGFβRII). Por fim, os autores concluíram que TGF-β e IL-10 podem ser alvos imunoterapêuticos, porque nas infecções crônicas há níveis elevados destas citocinas, que podem atenuar as respostas imunes a um nível suficiente para atrapalhar a resolução da infecção. Entretanto, os autores alertaram o cuidado nesta possível terapia, pois os efeitos conjuntos de TGF-β e IL-10 podem ser importantes mecanismos de limitação para as respostas imunes exageradas e imunopatológicas no fígado.

4.8 EPIDEMIOLOGIA GLOBAL DA HEPATITE B: INFECÇÃO AGUDA, CRÔNICA, COINFECÇÕES E CARCINOMA HEPATOCELULAR ASSOCIADO

Aproximadamente 257 milhões de pessoas foram infectadas no mundo até o ano de 2018 e 887.000 mortes que ocorreram até o ano 2015 são decorrentes da infecção pelo vírus e suas complicações (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). A prevalência da infecção varia conforme a região geográfica. Nos países ocidentais, a prevalência de infecção é baixa (menor que 2%) e normalmente se adquire na fase adulta. Em alguns países da Ásia e na maior parte da África, ocorrem altas taxas de prevalência (maior ou igual a 8%), sendo que a maior parte da infeção ocorre por via perinatal ou nos primeiros anos de vida. A China possuía uma alta prevalência em 1992 (9,8%), mas, diminuiu para 7,8% em função de programas de vacinação. A hepatite B é a maior causa de hepatite crônica, cirrose (CH) e carcinoma hepatocelular (CHC), em uma escala global (EL-SERAG, 2012; EL–SERAG; RUDOLPH, 2007; LAVANCHY, 2008; LIANG et al., 2009).

A infecção crônica pelo HBV aumenta cerca de 5 a 100 vezes o risco de desenvolvimento do CHC. Cerca de 70% a 80% de CHC relacionado à infecção pelo HBV ocorre em pacientes com cirrose. A maioria dos casos de CHC (acima de 80%) ocorre na África Subsaariana e na Ásia Oriental, com uma incidência aproximada de 20 casos para cada 100.000 indivíduos. Países ao sul da Europa, como Espanha e Itália, têm níveis médios de incidência de 10-20 casos por 100.000 indivíduos. Por outro lado, América do Norte, América do Sul, Norte da Europa e Oceania apresentam baixa incidência, de menos de 5 casos por 100.000 indivíduos (EL-SERAG, 2012).

As coinfecções com outros vírus podem causar um aumento da gravidade do quadro clínico (acelerar a progressão da doença (CHC e/ou CH) e aumentar a morbidade e mortalidade associada) comparando-se com uma infecção isolada. As principais coinfecções são com o HIV (vírus da imunodeficiência humana), HCV (vírus da hepatite C) e HDV (vírus da hepatite D), devido às vias de transmissão comum a estes vírus. Aproximadamente 37 milhões de pessoas estavam com uma infecção conjunta pelo HBV e HIV no ano de 2017. Destas, 5 a 20% possuem o HBV e o HIV (1,85 a 7,4 milhões de pessoas) (KONSTANTINOU; DEUTSCH, 2015; SINGH et al., 2017). O número exato de pacientes coinfectados por HBV+HCV é incerto pela falta de estudos populacionais em grande escala, e a prevalência relatada de infecção por HBV/HCV em diferentes estudos depende da região geográfica, população estudada,

método e critérios de seleção dos pacientes. Desta forma, dois estudos, um da Índia e um do Egito, relatam resultados contraditórios com uma prevalência de coinfecção de 16% e 0,7%, respectivamente. Outro estudo na Turquia encontrou 2,6% de casos com dupla infecção em 1950 pacientes. Outros trabalhos na Espanha, Itália, Japão, Taiwan e Irã demonstraram aproximadamente 10-15% dos pacientes com infecção crônica pelo HBV e infectados com HCV. Estudos americanos demonstraram a prevalência de coinfecção por HBV/HCV em 5,8% de 1257 pacientes com infecção crônica (KONSTANTINOU; DEUTSCH, 2015). Estima-se que até 5% da população mundial está infectada com HBV e, destas, é provável que 5% de pessoas com infecção crônica com HBV tenham uma infecção com o HDV. No entanto, algumas áreas endêmicas no mundo em desenvolvimento podem ter taxas muito mais altas (Chifre da África, Europa oriental, Bacia Amazônica) (FELD et al., 2016).

4.9 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO, CARCINOMA HEPATOCELULAR E CIRROSE ASSOCIADOS AO HBV E COINFECÇÕES NO VIETNÃ

A prevalência da infecção pelo HBV, confirmada pela presença do antígeno HBsAg, é aproximadamente 8,8% a 19,0% da população do Vietnã. A prevalência de cirrose hepática associada ao HBV (pacientes com cirrose e HBsAg positivos) é de 47,8% a 87,6%. A prevalência de CHC associado ao HBV (pacientes com CHC e HBsAg positivos) é de 34,8% a 80,0%. Entre os profissionais da saúde do Vietnã, notou-se uma prevalência de 12 a 18% de indivíduos positivos para o HBsAg. Ademais, a prevalência de profissionais infectados que estavam em contato direto com os pacientes infectados (8,9%) foi maior do que aqueles com contato indireto (6,3%) (DO, 2015; NGUYEN, 2012).

Em 1995, a prevalência de positividade para o anti-HBc em pacientes politransfundidos foi o dobro em relação à população (80% contra 40%). Além disso, cerca de 50% dos pacientes referiam que sua doença (CHC e/ou CH) era por conta da hepatite B. Foi estimado que 8,4 milhões de pessoas estavam com hepatite B crônica, o que resultou na morte de 23,3 mil pessoas em 2005. O número de mortos em 2005 por cirrose hepática ou carcinoma hepatocelular relacionado à hepatite B e a infecção foi de 36.500, 15.600 e 23.300, respectivamente (NGUYEN, 2012). Em estudo mais atual (DO, 2015), as taxas de mortalidade relacionadas ao CHC em 2012 variaram entre 14,8 a 23,7 por 100.000 habitantes; além disso, aproximadamente 65%

dos casos de carcinoma hepatocelular são associados a infecção crônica pelo HBV. O número de indivíduos ou incidência de CHC na cidade de *Ho Chi Minh* no Vietnã é de 25,3 homens e 5,9 mulheres por 100.000 habitantes. Na capital do Vietnã, Hanói, estima-se a incidência do carcinoma hepatocelular em 166 em homens e 58 em mulheres para cada 100.000 pessoas. Os meios mais comuns de transmissão são mãe para filho; entre familiares, principalmente entre irmãos (por exemplo, o compartilhamento de utensílios de higiene pessoal); admissão hospitalar; procedimentos de acupuntura e procedimentos médicos que envolvem injeções (NGUYEN, 2012).

Em um estudo conduzido por DUNFORD et al. (2012), verificou-se a coinfecção pelo HIV, HDV e HCV nas seguintes cidades: Ha Noi, Hai Phong, Da Nang, Khanh Hoa e Can Tho. A prevalência da coinfecção HBV/HIV para profissionais do sexo foi 15,2% (15/99) e usuários de drogas injetáveis 28% (49/174). Notou-se que em profissionais do sexo a prevalência de coinfectados HCV/HBV/HIV eram 89,8% (44/49) e 40% (16/40), respectivamente. A prevalência de HDV foi 10,7% de todos os indivíduos recrutados (34/318), sendo a maior parcela dos usuários de drogas injetáveis 25,6% (20/78). Por fim, notou-se em usuários de drogas injetáveis uma infecção conjunta de HBV/HIV/HCV/HDV com uma prevalência de 17,9% (14/78).

O programa de vacinação contra a hepatite B no Vietnã foi iniciado em 2002 nos bebês e, ao longo dos anos, a cobertura vacinal variou muito (DO, 2015). Mas, em 2017, a cobertura foi de 94% para a vacina em três doses (HepB3) e 77% para a vacina dada logo ao nascer (HepB_BD) (WHO, 2018).

4.10 ESTUDOS POPULACIONAIS E DE ASSOCIAÇÃO REALIZADOS COM AS AMOSTRAS DO PRESENTE ESTUDO

As amostras de pacientes analisadas neste estudo vieram do Vietnã, em colaboração com pesquisadores da Alemanha, na Universidade Tübingen - Instituto de Medicina Tropical (Alemanha). Esse mesmo conjunto de amostras foi utilizada para outros estudos, com diferentes objetivos, dentre os quais estão estudos de associação entre polimorfismos genéticos e hepatites virais, principalmente o HBV, estudos de distribuição de genótipos virais e epidemiológicos (HBV, HDV e coinfecções) e estudo

de genética de populações (AMORIM et al., 2018a; HOAN et al., 2016, 2017; NGUYEN et al., 2017; SY et al., 2018).

O genótipo do gene *ISG15* (gene estimulado pelo interferon - proteína 15 kDa) *rs1921GA* conferiu uma associação de proteção a cirrose hepática (OR = 0,5 e *p* = 0,006) e carcinoma hepatocelular (OR = 0,5 e *p* = 0,014) relacionada com a infecção crônica pelo HBV. No modelo dominante, os genótipos *rs1921GA* e *rs1921AA* também apresentaram conferiram uma associação de proteção a cirrose hepática (OR = 0,5 e *p* = 0,0016) e carcinoma hepatocelular (OR = 0,5 e *p* = 0,003) em indivíduos com infecção crônica pelo HBV. O genótipo *rs1921GG* foi mais frequente em pacientes com infecção pelo HBV e com pior prognóstico da função hepática (níveis elevados de AST, ALT, bilirrubina total, bilirrubina direta) (*p* = 0,014). Além disso, níveis séricos da proteína ISG15 estão elevados nos grupos de indivíduos infectados pelo HBV em comparação ao controle (*p* = 0,0001) e entre os grupos com cirrose hepática (*p* = 0,00083) em relação ao grupo de indivíduos sem cirrose. Os níveis séricos da proteína ISG15 foram maiores no grupo de pacientes (*p* = 0,001) com maior carga viral ($\geq 10^5$ cópias/mL). Por fim, a expressão do RNAm de *ISG15* foi maior em tecidos não neoplásicos de pacientes com carcinoma e infecção crônica em comparação ao grupo de pacientes com carcinoma não relacionado a infecção pelo HBV (*p* = 0,016). Os resultados encontrados pelos autores foram que os polimorfismos do gene *ISG15* podem auxiliar na replicação viral e na progressão para piores desfechos clínicos da infecção pelo HBV (HOAN et al., 2016).

Um outro estudo avaliou a prevalência e distribuição dos genótipos do vírus da hepatite delta (HDV) em pacientes infectados com o vírus da hepatite B na região central do Vietnã. Notou-se que a prevalência de pacientes infectados com HBV e HDV foi de 10% (25) no total de 250 pacientes infectados com HBV. Além disso, dentre os 25 indivíduos, 20 (80%) possuíam o genótipo HDV-2 e 5 (20%) HDV-1. Pacientes com coinfecção por HBV e genótipo HDV-1 (8,5 de mediana log10 do número de cópias de DNA/mL) apresentaram níveis séricos de HBV mais elevados que aqueles HBV/HDV-2 (4,4 de mediana log10 do número de cópias de DNA/mL) (*p* = 0,036). Por fim, foi verificado que o genótipo HDV-2 foi mais prevalente na região central do Vietnã (NGUYEN et al., 2017).

Segundo HOAN et al. (2017), a variante genética do promotor do gene *SOCS3* (supressor da sinalização de citocinas 3) *rs111033850C* está associada a sucetibilidade progressão para o carcinoma hepatocelular (OR = 1,7 e *p* =0,046) e a variante *rs12953258A* com a cirrose hepática (OR = 1,4 e *p* = 0.017). Uma maior metilação no promotor do gene *SOCS3* está presente em tecidos neoplásicos que os não neoplásicos (OR = 5,4 e *p* = 0,001). Desta forma, os autores sugerem que polimorfismos e a hipermetilação do promotor de *SOCS3* poderiam auxiliar na sucetibilidade a infecção crônica e no desenvolvimento do carcinoma respectivamente.

Em um estudo conduzido por SY et al. (2018), foi demonstrado que variantes no gene *IRF5* (fator de regulação do interferon 5), *rs13242262T* (OR = 1,5 e *p* = 0,04) e *rs10488630G* (OR = 1,7 e *p* = 0,019), estão associados com o desenvolvimento da cirrose hepática em pacientes com carcinoma hepatocelular associado a infecção crônica pelo vírus da hepatite B.

Em um estudo populacional feito por AMORIM et al. (2018a), foram analisados 14 genes e 2 pseudogenes de *KIR*, e também os genes *HLA* e seus epítopos: HLA Bw4, HLA-A Bw4 80I, HLA-B Bw4 80I, HLA-C C1 e HLA-C C2. A frequências de presença destes genes e ligantes HLA de uma amostra do grupo controle da população Vietnamita deste estudo foram comparadas com as frequências de 43 populações mundiais. A frequência de portador dos genes *KIR* encontrados na população Vietnamita foi similar à encontrada na população Tailandesa e da etnia Han (Chinesa) ($p > 0,05$), mas diferiu das populações japonesa ($p < 10^{-3}$) e sul-coreana ($p = 0,007$).

4.11 ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO REVELAM A IMPORTÂNCIA DOS GENES *KIR* NA SUCETIBILIDADE À INFECÇÃO PELO HBV E OUTRAS INFECÇÕES VIRAIS

Existe um processo de educação/licenciamento durante a maturação das células NK, a qual serão treinadas a reconhecerem as células que não estão em um estado saudável (transformação neoplásica, estressadas ou infectadas) e obter a autotolerância. Os genes *KIR* e o seus ligantes HLA são importantes para este

processo de educação. Existem vários modelos propostos (*Licensing*, *Arming*, *Disarming*, *Rheostat* and *Tuning*), mas a maioria deles revela a importância dos genes *KIR* inibidores. Os *KIR* inibidores tornam as células *natural killers* sensíveis e mais responsivas à inibição ao HLA de classe I (apresentação do próprio) e consequentemente à falta do próprio em células não saudáveis. Desta forma, elas se tornam sensíveis à inibição e são ativadas ou se tornam responsivas pelos sinais de seus receptores ativadores (BOUDREAU; HSU, 2018; ELLIOTT; YOKOYAMA, 2011). Neste contexto; BOUDREAU et al. (2016); apresenta que a densidade e a interação entre o receptor inibidor KIR3DL1 e o seu ligante HLA-B são responsáveis pelo ajuste da educação ou licenciamento e a resposta das células NK frente ao HIV para sua eliminação. O estudo foi realizado em Nova York na população norte-americana. Eles observaram que células NK apresentando uma grande quantidade de interações entre KIR3DL1 e HLA Bw4-80I aumentam a responsividade contra células com uma menor expressão de moléculas HLA ($p < 0,001$).

Como já foi dito, o papel dos genes inibidores é fundamental para o processo de educação/licenciamento e para a sensibilidade aos sinais ativadores e inibidores. No entanto, durante o processo educação segundo o modelo "disarming" ("desarmamento") e "*rheostat*" ("reostato"), sugerem que as células NK com o efeito final do balanço entre sinais ativadores/inibidores estiver "inclinado" para o sinal ativador, pode haver uma redução do potencial de excitabilidade e responsividade derivada pela diminuição da "quantidade" de inibição da interação receptores inibidores-HLA, e pela anergia ou hiporesponsividade induzida pela ativação (BOUDREAU; HSU, 2018).

Os estudos conduzidos por ZHI-MHING et al. (2007) e LU et al. (2008); investigaram a associação entre o polimorfismo dos genes *KIR* e a sucetibilidade à infecção pelo vírus da hepatite B. Os estudos foram realizados na população chinesa da etnia Han. No estudo realizado por ZHI-MHING et al. (2007), houve 3 grupos analisados: 412 indivíduos sem a infecção, 150 com infecção crônica pelo HBV e 251 com remissão espontânea. Os genes *KIR2DS1* ($p < 0,001$), *KIR2DL5* ($p = 0,001$) e *KIR3DS1* ($p = 0,001$) foram mais frequentes no grupo de pacientes com remissão espontânea que no grupo de pacientes com infecção crônica. Os genes ativadores *KIR2DS2* ($p = 0,001$) e *KIR2DS3* ($p = 0,014$) apresentaram maior frequência entre os portadores do grupo de hepatite B crônica que no grupo controle. Desta forma

segundo ZHI-MING et al. (2007), os genes *KIR2DS1*, *KIR2DL5* e *KIR3DS1* possuem um efeito protetor contra a infecção crônica. Em contrapartida, *KIR2DS2* e *KIR2DS3* apresentaram efeitos de sucetibilidade para a infecção crônica.

No trabalho de LU et al. (2008), o grupo amostral foi dividido em: 150 pacientes com infecção crônica, 251 com remissão espontânea e 412 indivíduos controle. A frequência de portadores do haplótipo *B* ($p < 10^{-3}$) foi maior no grupo de indivíduos com infecção crônica em comparação com o grupo controle. A frequência do haplótipo *A* ($p < 10^{-3}$) foi menor nos grupos de indivíduos com infecção crônica quando comparado com o grupo controle. A conclusão que os autores chegaram foi que a presença do haplótipo *A* ou *B* pode influenciar o curso da infecção, ou seja, na eliminação viral. No caso, o haplótipo *A* teria um efeito protetor contra a infecção crônica e o haplótipo *B* um efeito de sucetibilidade para a infecção crônica pelo HBV.

Estudos publicados revelam que a homozigose do haplótipo *A* estaria associada com uma maior proteção a infecções virais e o haplótipo *B* com uma maior sucetibilidade. Os estudos que apoiam estas conclusões são com o vírus da hepatite C (HCV) (DRING et al., 2011) e o vírus Ebola (WAUQUIER et al., 2010).

DRING et al. (2011) estudou uma população irlandesa euro-descendente. Os autores investigaram a associação dos genes do sistema imune inato em indivíduos com infecção crônica pelo vírus da hepatite C. Foram analisados 296 pacientes com infecção crônica e 247 com a resolução da infecção. Os autores do estudo, notaram uma associação do haplótipo *B* no desenvolvimento da infecção crônica pelo HCV. Uma vez que houve maior presença de genes relacionados ao haplótipo *B* no grupo de infecção crônica que no grupo de remissão espontânea, os quais são *KIR2DS3* (OR = 1,90 e p = 0,002) e *KIR2DL5*. *KIR2DL5* apresentou uma maior frequência, mas não apresentou significância estatística (OR = 2,70 e p = 0,10). Desta forma, os autores sugerem que a homozigose do haplótipo *A* (ausência do haplótipo *B*) teria uma associação protetora contra a infecção crônica pelo HCV.

O estudo conduzido na população do Gabão (África) por WAUQUIER et al. 2010, foi investigado o polimorfismo dos genes *KIR* frente a infecção pelo vírus Ebola. Foram 4 grupos: 54 controles (IgG - para o vírus), 68 indivíduos saudáveis e IgG+ de regiões sem casos reportados para a doença, 21 sobreviventes à infecção e 15 casos fatais. Segundo os autores, o genótipo *A/A* (homogizose do haplótipo *A*) foi mais

frequente em sobreviventes (33,3%) e menos frequente em casos fatais (13,3%). A proporção dos genes ativadores *KIR2DS1* e *KIR2DS3* foi maior em casos fatais (46,8% e 53,3% respectivamente) que nos sobreviventes (4,6% e 9,5% respectivamente); o valor de *p* para ambos os genes foi significativo ($p < 0,05$).

PALADINO et al. (2007) realizaram um estudo em uma população latino-americana euro-descendente. O objetivo era avaliar os efeitos das interações entre KIR e HLA na infecção pelo vírus da hepatite C. O grupo amostral contou com 339 pacientes sem a infecção pelo vírus e 257 pacientes que foram infectados. Dentre os infectados, existem: 23 pacientes com a eliminação viral (carga de RNA viral negativa e anti-HCV positivo), 54 com a infecção ativa (carga de RNA viral positiva e anti-HCV positivo) e níveis séricos da alanina aminotransferase (ALT) normais (um dos marcadores de dano celular hepático); 180 pacientes com níveis séricos elevados de ALT, 125 pacientes com a infecção ativa e sem cirrose hepática; 109 pacientes com infecção ativa e presença de cirrose hepática. Os autores notaram que a presença do gene *KIR2DS5* foi maior em pacientes que eliminaram o vírus que no grupo controle (OR = 0,4 e $p = 0,04$). Além disso, o gene *KIR3DL1* apresentou uma menor frequência nos grupos de pacientes com infecção ativa (OR = 0,43 e $p = 0,01$) e pacientes com cirrose (OR = 0,34 e $p = 0,007$) em comparação ao controle. Ademais, *KIR2DS4* apresentou menor frequência no grupo de indivíduos com infecção pelo vírus (OR = 0,37 e $p = 0,002$). No entanto, *KIR2DS3* estava mais presente em pacientes com níveis elevados de ALT (OR = 1,6 e $p = 0,0018$) que no grupo de indivíduos saudáveis. Além disso, *KIR2DS2* estava mais presente em pacientes com a infecção ativa do que no grupo de pacientes capazes de eliminar o vírus (OR = 3 e $p = 0,014$). Eles também notaram que a homozigose do receptor KIR3DS1 (OR = 3 e $p = 0,007$) e indivíduos homozigotos para *KIR3DS1* e *HLA-Bw4* (OR = 7,1 e $p = 0,016$) estavam associados a progressão a cirrose. Portanto, os autores do estudo demonstraram, pela análise do grupo de indivíduos que não eliminaram o vírus, que o aumento de genes *KIR* ativadores sugere que a maior atividade citotóxica pelas células NK pode estar associada a uma pior progressão da infecção pelo HCV.

Em um estudo conduzido por PODHORZER et al. (2018), o qual analisou os grupos controle (n=273) e Infecção Crônica pelo HCV (n=351) na população Latino-Americana de Buenos Aires (Argentina), revelou uma maior frequência do grupo de alelos funcionais de *KIR2DS4* (*KIR2DS4 full*) no grupo com infecção crônica que o

grupo controle (0,52 vs 0,42 respetivamente e p = 0,02). Além disso, eles notaram que a presença de homozigotos para grupo de alelos não funcionais do gene *KIR2DS4* (*KIR2DS4 1D*) estavam em uma maior frequência no grupo controle que o com infecção crônica (0,58 vs 0,48 respetivamente e p<0,05).

CARIANI et al. (2013) apresentaram um estudo sobre variáveis preditoras, as quais teriam influência no desfecho clínico de pacientes que se submeteram ao tratamento do carcinoma hepatocelular devido à infecção pelo vírus da hepatite C. Estas variáveis avaliadas foram os *KIR* e seus ligantes HLA. Foram analisados 61 pacientes italianos e, segundo os autores, *KIR2DS5* foi associado a um maior tempo para a recorrência do carcinoma após o tratamento e um maior tempo de sobrevida médio (p < 0,03). Indivíduos homozigotos para *HLA-C1* (p < 0,02) e *HLA Bw4-I80* (p < 0,05) também obtiveram um melhor tempo de sobrevida médio, enquanto que aqueles com *HLA-C2* (p < 0,02) e *HLA-Bw4T80* (p < 0,01) foram associados com um menor tempo de sobrevida.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 AMOSTRA POPULACIONAL

As amostras de DNA foram gentilmente cedidas pelo Dr. Thirumalaisamy P. Velavan da Universidade Tübingen - Instituto de Medicina Tropical (Alemanha), responsável pela unidade de pesquisa clínica e o centro vietnamita-alemão de pesquisa médica em Hanói-Vietnã, obtidas de pacientes nos hospitais da cidade de Hanói. A coleta das amostras foi aprovada pelo comitê de ética do Hospital Tran Hung Dao em Hanói. A etnia dos indivíduos que participaram deste estudo foi a Kinh (representa cerca 86% da população do Vietnã). As amostras dos indivíduos controle foram obtidas de doadores em bancos de sangue da cidade com mesmo grupo etnico que os pacientes. Além disso, houve a confirmação de ausência da infecção pelo HBV, HIV e HCV (antígeno HBsAg negativo, anticorpos anti-HCV e anti-HIV negativos) nestes indivíduos. Foram excluídos indivíduos controle e pacientes com histórico de uso de entorpecentes ou álcool e outras patologias relacionadas ao fígado como hepatite autoimune, hemocromatose, hepatite alcoólica ou tóxica. A TABELA 3

apresenta a subdivisão das amostras em grupos de análise segundo suas características clínicas.

TABELA 3 - Grupos de Análise de Indivíduos com HBV

Grupo de Análise	**Número de indivíduos**	**Proporção de mulheres (%)**	**Proporção de homens (%)**	**Idade média (anos) e Amplitude**
Indivíduos controle (IC)	140	33	67	43 (15 - 69)
Pacientes com infecção crônica pelo HBV (HBC)	189	23	77	43 (18 - 82)
Pacientes com infecção crônica pelo HBV e cirrose hepática (CH)	156	16	84	52 (18 - 84)
Pacientes com infecção crônica pelo HBV e carcinoma hepatocelular (CHC)	67	7	93	52 (18 - 81)
Pacientes com infecção crônica pelo HBV com carcinoma hepatocelular e cirrose hepática (CHC e CH)	85	6	94	57 (26 - 81)
Total	637			

FONTE: O autor (2019)

5.2 GENOTIPAGEM DOS GENES *KIR*

Todas as amostras foram genotipadas para o polimorfismo de ausência e presença dos genes *KIR*. A genotipagem foi feita por PCR-SSP (reação em cadeia da polimerase com oligonucletídeos iniciadores de sequência específica) multiplex, cujo protocolo foi desenvolvido e otimizado pela equipe do Laboratório de Genética Molecular Humana. Para amplificação, foi utilizado o *Master Mix GoTaq RealTime qPCR* da Promega®, que possui o fluoróforo intercalante Sybr Green®, o qual emite fluorescência detectada pelo aparelho Viia7®. Os produtos da amplificação foram analisados por meio da curva de dissociação (ou curva de *melting*) (AMORIM et al., 2018b).

As PCR multiplex possuem mais de um par de oligonucleotídeos iniciadores em cada reação, listados no ANEXO 1. Cada gene *KIR* teve dois pares de *primers* para confirmação com exceção de *KIR3DL3* e o pseudogene *KIR3DP1*, que tinham apenas um par. *KIR2DS1* utilizou 3 primers, pois, existem alelos com SNPs na posição 3' do gene e houve a necessidade da utilização de mais de um primer forward para a sua amplificação. As reações contendo dois genes *KIR* sempre tiveram um gene com frequência alta (controle interno), juntamente com um gene de menor frequência. Reações que tiveram apenas um gene *KIR* tiveram um controle interno de

amplificação (gene *GALC)*. A escolha da combinação dos pares de oligonucleotídeos iniciadores de cada reação multiplex foi feita de acordo com a temperatura de dissociação (Tm, do inglês *melting temperature*) de cada produto de amplificação. Amplicons com Tm semelhantes foram combinados, em reações diferentes. Em cada reação, foram amplificados de um a três fragmentos diferentes, que foram identificados individualmente, pela curva de dissociação específica de cada fragmento (AMORIM et al., 2018b).

Para a genotipagem completa de *KIR*, foram realizadas 24 PCR multiplex para cada amostra e 16 indivíduos por cada placa 384, ANEXO 2. O procedimento da PCR foi feito conforme AMORIM et al. (2018b). Os ciclos de temperatura para a PCR são: 2 min à 94°C; 5 ciclos à 94°C por 5 s, 65°C por 15 s and 72°C por 30 s; 21 ciclos à 94°C por 5 s, 60°C por 15 s and 72°C for 30 s; 4 ciclos à 94°C for 5 s, 55°C por 15 s e 72°C por 30 s; 2 min à 72ºC. Após esta etapa, todas as placas foram analisadas para curva de dissociação no equipamento Viia7®. A presença ou ausência de cada curva foi interpretada como presença ou ausência do gene. As curvas foram analisadas inicialmente pelos softwares QuantStudio Real-Time PCR®. Em seguida, foram analisadas por um programa baseado em linguagem JAVA (KillerPeak), desenvolvido pelo LGMH para leitura automatizada (AMORIM et al., 2018b).

5.3 ANÁLISE DE DADOS

A frequência de presença ou ausência de cada gene *KIR* foi estimada através da contagem direta (frequência do portador ou f_P), assim como a frequência dos genótipos *A/A* e *B/x*. O genótipo *A/A* consiste em indivíduos homozigotos para o haplótipo *A*, enquanto que, o genótipo *B/x* significa que os indivíduos possuem pelo menos um haplótipo *B* (homozigotos para o haplótipo *B - B/B* ou com um haplótipo *A* e *B - A/B*). A frequência gênica (f_G) dos genes *KIR* foram estimadas pela fórmula de Bernstein: $f_G = 1-\sqrt{(1- f_P)}$ (BERNSTEIN, 1906).

O teste exato de Fisher bicaudal, *Odds Ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC (95%)) foram calculados no software R® 3.5.3 (R CORE TEAM, 2019) com o pacote "*exact2x2*" utilizando método de "*minlike*" (FAY, 2010). Os testes foram realizados em tabelas de contingência 2x2 para a comparação de frequências de

portador. Os valores de *p* não corrigido considerados significativos foram aqueles com $p < 0,05$.

Para avaliar o risco de desenvolvimento da infecção crônica pelo HBV, cada gene *KIR*, número de genes ativadores e genótipos (*A/A* e *B/x*) presentes nos indivíduos foram avaliados comparando a frequência de portador entre os grupos IC (indivíduos controle) e HBC (pacientes com infecção crônica pelo HBV).

Para verificar o risco de progressão para cirrose hepática cada gene *KIR*, número de genes ativadores e genótipos foram avaliados comparando a frequência de portador entre os grupos: HBC e CH (pacientes com infecção crônica pelo HBV e cirrose hepática).

Para analisar o risco de desenvolvimento do carcinoma hepatocelular em indivíduos com infecção crônica pelo HBV cada gene *KIR*, número de genes ativadores e genótipos foram avaliados comparando a frequência de portador entre os grupos: HBC *vs* CHC + CHC e CH (pacientes com infecção crônica e carcinoma hepatocelular + pacientes com infecção crônica com carcinoma hepatocelular e cirrose hepática).

Os testes de regressão logística binária foram realizados no R® 3.5.3 (R CORE TEAM, 2019) e utilizados para verificar a independência do efeito de cada gene *KIR*, número de genes ativadores e genótipos associados. No modelo de regressão logística, as análises IC vs HBC, HBC vs CHC e CHC+CH utilizaram os grupos como variáveis dependentes. As variáveis independentes foram a frequência de portadores de genes *KIR,* número de genes ativadores e os genótipos (*A/A* ou *B/x*). O valor de *p* utilizado para incluir as variáveis independentes no modelo da regressão foi de $p < 0,05$.

As correções dos valores de *p* foram conduzidas segundo o método de FDR (*False discovery rate*) (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995) e a obtenção dos valores de *p* ajustados (p_c) conforme o método foram obtidos pelo software R® 3.5.3 (R CORE TEAM, 2019). As correções foram realizadas conforme o número de testes ou hipóteses independentes realizadas nas comparações das variáveis analisadas (genes *KIR* ativadores, genótipos, número de genes ativadores e regressão logística): IC vs HBC (15 testes), HBC vs CH (13 testes) e HBC vs CHC + CHC e CH (14 testes). Genes com desequilíbrio de ligação absoluto foram considerados como apenas um teste, por exemplo, KIR3DL1 com KIR2DS4 e KIR2DL2 com KIR2DS2. A correção

dos valores *p* pelo método de FDR foi utilizada a fim de diminuir as chances de cometer o erro do tipo I (rejeitar a hipótese nula quando isso não é verdadeiro), visto que, a chance de cometer este erro aumenta com a multiplicidade de testes realizados. A base do método desta correção está no controle da proporção de hipóteses nulas rejeitadas erroneamente dentro das hipóteses nulas que foram rejeitadas (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). As associações consideradas significativas foram aquelas com os valores de $p_c \leq 0,05$.

O teste exato de diferenciação populacional realizado no programa Arlequin versão 3.5.2.2 foi realizado para verificar a homogeneidade dos diferentes grupos em análise (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Desta forma, foi avaliada a possibilidade de junção dos grupos de infecção crônica com carcinoma e infecção crônica carcinoma com cirrose para formar o grupo CHC + CHC e CH. O valor de significância de *p* para este foi de 0,05.

6 RESULTADOS

A primeira pergunta que almejamos responder foi se a presença ou ausência de genes *KIR* está associada com hepatite B crônica. Para isso, comparamos as frequências desses genes em uma amostra de controles (n= 140) que foi previamente caracterizada (AMORIM et al., 2018a) e uma amostra de pacientes com hepatite B crônica provenientes da mesma região (n= 497). Excluímos das análises de associação os genes moldura (*KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e *KIR3DP1*) pelo fato deles apresentarem 100% de presença em todos os grupos analisados. Também excluímos o pseudogene *KIR2DP1* pelo fato de não haver evidências de que ele é funcional e também por ele estar em desequilíbrio de ligação absoluto com *KIR2DL1*, não sendo, portanto, informativo nesse contexto de análise de associação. A presença do grupo alélico funcional de *KIR2DS4* (TABELA 4) foi mais frequente no grupo de pacientes com infecção crônica em comparação ao grupo controle (OR = 1,95 e p_c = 0,04) (TABELA 4). Também foi visto uma maior presença do genótipo *KIR2DS4 full - / KIR2DS4 1D +* (ausência do grupo de alelos funcionais do gene *KIR2DS4* e presença do grupo de alelos não funcionais do gene *KIR2DS4*) no grupo controle que no grupo de infecção crônica (OR = 0,52 e p_c = 0,04). Para testarmos a independência das

associações encontradas, fizemos uma análise de regressão logística incluindo no modelo as duas variáveis associadas com $p < 0,05$ (*KIR2DS4 full* e o genótipo *KIR2DS4 full - / KIR2DS4 1D + KIR2DS4 1D*). A análise de regressão mostrou que somente presença do grupo alélico funcional de *KIR2DS4* (*KIR2DS4 full*) (OR = 2,19 e $p_c = 0,04$) permaneceu no modelo (TABELA 5).

A segunda pergunta que desejamos responder foi se a variação estrutural de presença e ausência de genes *KIR* aumenta o risco de progressão da hepatite B crônica para fenótipos de pior prognóstico.

Como estávamos interessados em verificar se a variação de presença e ausência de *KIR* e seus genótipos alteram o risco de desenvolvimento de carcinoma hepático em indivíduos com infecção crônica por HBV. Os grupos CHC (carcinoma hepatocelular) e CHC e CH (carcinoma hepatocelular concomitante a cirrose hepática) foram analisados em conjunto, pois apresentaram homogeneidade em relação às frequências de genes *KIR* após a realização do teste exato de diferenciação populacional ($p = 0,996$). Além disso, ao comparamos a frequência de genes *KIR* entre pacientes com hepatite B crônica com pacientes que desenvolveram cirrose hepática (TABELA 6). Não encontramos evidência de que a presença e ausência de genes ou genótipos de *KIR* contribuem significativamente com maior ou menor risco de desenvolvimento de cirrose hepática em indivíduos infectados cronicamente por HBV.

Observamos que a presença do genótipo *B/x* foi associada com a proteção contra o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, (OR = 0,54 e $p_c = 0,04$) (TABELA 6). Também foi visto que *KIR2DS5* apresentou um efeito de proteção contra o desenvolvimento do carcinoma (OR = 0,53 e $p_c = 0,04$) (TABELA 6). Da mesma forma, fizemos uma análise de regressão logística incluindo as variáveis associadas no modelo e com valores de $p < 0,05$. Apenas a presença do genótipo *B/x* permaneceu no modelo (OR = 0,54 e $p_c = 0,04$, verossimilhança de log -2 = 460,92) (TABELA 7).

TABELA 4 - Frequências de genes, genótipos de *KIR* e número de genes ativadores entres os grupos controle e pacientes com infecção crônica

***KIR* (Gene)**	**Indivíduos Controle (*n*=140)**		**Infecção Crônica (*n*=189)**					
	f_P% (n)	f_G (%)	f_P% (n)	f_G (%)	OR	IC (95%)	*p*	p_c
Inibidores								
KIR2DL1	98,57 (138)	88,05	98,94 (187)	89,71	1,35	0,14-12,7	1	1
KIR2DL2	36,43 (51)	20,27	33,33 (63)	18,35	0,87	0,55-1,4	0,56	0,87
KIR2DL3	96,4 (135)	81,10	95,77 (181)	79,43	0,84	0,26-2,7	1	1
KIR2DL5	44,3 (61)	24,88	44,97 (85)	25,82	1,03	0,65-1,62	0,91	1
KIR3DL1	95,71 (134)	79,30	96,83 (183)	82,18	1,36	0,42-4,43	0,77	1
Ativadores								
KIR2DS1	46,43 (62)	25,36	47,62 (90)	27,63	1,14	0,72-1,8	0,58	0,87
KIR2DS2	36,43 (51)	20,27	33,33 (63)	18,35	0,87	0,55-1,4	0,56	0,87
KIR2DS3	21,43 (30)	11,36	27,51 (52)	14,86	1,39	0,89-2,59	0,13	0,49
KIR2DS4	95,71 (134)	79,30	96,83 (183)	82,18	1,36	0,42-4,43	0,77	1
KIR2DS4 1D	54,3 (76)	20,65	55,03 (104)	32,94	1,03	0,65-1,62	0,91	1
KIR2DS4 full	60,7 (85)	23,28	75,13 (142)	50,13	**1,95**	**1,2-3,14**	**0,005**	**0,04**
KIR2DS5	32,14 (45)	17,62	35,45 (67)	19,66	1,2	0,75-1,96	0,48	0,87
KIR3DS1	40,0 (56)	22,54	45,50 (86)	28,36	1,21	0,77-1,94	0,43	0,87
Genótipos								
A/A	40,71 (57)	-	34,39 (65)	-	0,77	0,49-1,2	0,25	0,75
B/x	59,29 (83)	-	65,61 (124)	-	1,31	0,83-2,05	0,25	0,75
KIR2DS4 full - / KIR2DS4 1D +	25,93 (49)	-	21,69 (41)	-	**0,52**	**0,31-0,85**	**0,0087**	**0,04**
Número de genes ativadores								
Maior ou igual a 3	56,43 (79)	-	61,90 (117)	-	1,25	0,79-2,0	0,36	0,87

Legenda: IC (95%) = intervalo de confiança de 95%. *p* = Valor de *p* não corrigido. p_c = Valor de *p* corrigido com o método de FDR. Valores de $p < 0,05$ e $p_c \leq 0,05$ foram considerados significativos. f_P% (n) = frequência e número de portadores. f_G (%) = frequência gênica. *KIR2DS4 full* = grupo de alelos funcionais do gene *KIR2DS4. KIR2DS4 1D* = grupo de alelos não funcionais do gene *KIR2DS4* com uma deleção de 22 bp no exon 5. *KIR2DS4 full - / KIR2DS4 1D +* = indivíduos homozigotos para = grupo de alelos não funcionais do gene *KIR2DS4* com uma deleção de 22 bp no exon 5 (*KIR2DS4 1D*).

TABELA 5 - Regressão logística binária para genes *KIR*, seus genótipos e número de genes ativadores entre os grupos controle e pacientes com infecção crônica

***KIR* (Gene)**	**Infecção Crônica (*n*=189)**				
	B (SE)	OR	IC (95%)	*p*	p_c
KIR2DS4 full	0,67 (0,24)	**1,96**	**1,2-3,14**	**0,0055**	**0,04**
Genótipo					
KIR2DS4 full - / KIR2DS4 1D	NS	NS	NS	NS	NS
Intercepto	-0,16 (0,20)	-	-	-	-

Legenda: B (SE)= Valor de beta e seu erro padrão. IC (95%) = intervalo de confiança de 95%. *p*= Valor de *p* não corrigido. p_c = Valor de *p* corrigido com o mé todo de FDR. Valores de $p < 0,05$ e $p_c \leq 0,05$ foram considerados significativos. NS= Valor de *p* não significante. *KIR2DS4 full* = grupo de alelos funcionais d o gene *KIR2DS4. KIR2DS4 full* e *B/x* = indivíduos com grupo de alelos funcionais do gene *KIR2DS4* e genótipo *B/x*. Verossimilhança de log -2= 441,0. $R^2 = 0,023$ (Cox–Snell); 0,031 (Nagelkerke). Teste de Hosmer e Lemeshow, $x^2 = 10^{-28}$,graus de liberdade = 8 e $p = 1$

TABELA 6 - Frequências de genes, genótipos de *KIR* e número de genes ativadores entres os grupos de pacientes

***KIR* (Gene)**	**HBC (*n*=189)**		**CH (*n*=156)**						**CHC + CHC e CH (*n*=152)**					
	f_P% (n)	f_G (%)	f_P% (n)	f_G (%)	OR	IC (95%)	*p*	p_c	f_P% (n)	f_G (%)	OR	IC (95%)	*p*	p_c
Inibidores														
KIR2DL1	98,94 (187)	89,71	100 (156)	100	1,66	0,12-48,37	1	1	99,34 (151)	91,89	1,61	0,13-47,12	1	1
KIR2DL2	33,33 (63)	18,35	37,82 (59)	21,15	1,22	0,77-1,93	0,26	0,77	26,97 (41)	14,54	0,74	0,46-1,19	0,24	0,42
KIR2DL3	95,77 (181)	79,43	94,23 (147)	75,98	0,72	0,27-2,12	0,62	0,77	98,03 (149)	85,95	2,19	0,54-9,78	0,36	0,53
KIR2DL5	44,97 (85)	25,82	46,15 (72)	26,62	1,05	0,68-1,61	0,83	0,9	38,16 (58)	21,36	0,73	0,47-1,13	0,19	0,38
KIR3DL1	96,83 (183)	82,18	92,31 (144)	72,26	0,39	0,14-1,09	0,087	0,77	97,37 (148)	83,78	1,21	0,32-4,66	1	1
Ativadores														
KIR2DS1	47,62 (90)	27,63	44,23 (69)	25,32	0,87	0,57-1,36	0,59	0,77	36,84 (56)	20,53	0,64	0,40-0,99	0,05	0,14
KIR2DS2	33,33 (63)	18,35	31,22 (59)	21,15	1,22	0,77-1,93	0,26	0,77	26,97 (41)	14,54	0,74	0,46-1,19	0,24	0,42
KIR2DS3	27,51 (52)	14,86	33,33 (52)	18,35	1,32	0,82-2,12	0,29	0,77	23,03 (35)	12,27	0,79	0,48-1,3	0,38	0,53
KIR2DS4	96,83 (183)	82,18	92,31 (144)	72,26	0,39	0,14-1,09	0,087	0,77	97,37 (148)	83,78	1,21	0,32-4,66	1	1
KIR2DS4 1D	55,03 (104)	32,94	60,26 (93)	36,96	1,24	0,8- 1,92	0,38	0,77	57,24 (87)	34,61	1,09	0,71-1,69	0,74	0,94
KIR2DS4 full	75,13 (142)	50,13	71,15 (111)	46,29	0,82	0,51-1,32	0,46	0,77	74,34 (113)	49,35	0,96	0,58-1,6	0,9	1
KIR2DS5	35,45 (67)	19,66	32,69 (51)	17,96	0,88	0,56-1,41	0,65	0,77	22,37 (34)	11,89	**0,53**	**0,31-0,87**	**0,0089**	**0,04**
KIR3DS1	45,50 (86)	28,36	43,59 (68)	24,89	0,93	0,6-1,43	0,75	0,77	35,53 (54)	19,70	0,66	0,42-1,02	0,08	0,19
Genótipos														
A/A	34,39 (65)	-	39,1 (61)	-	1,22	0,78-1,93	0,37	0,77	49,34 (75)	-	**1,85**	**1,19-2,93**	**0,0057**	**0,04**
B/x	65,61 (124)	-	60,9 (95)	-	0,82	0,52-1,29	0,37	0,77	50,66 (77)	-	**0,54**	**0,34-0,84**	**0,0057**	**0,04**
Nº de genes ativadores														
Maior ou igual a 3	61,90 (117)	-	58,97 (92)	-	0,88	0,57-1,38	0,58	0,77	48,03 (73)	-	**0,6**	**0,36-0,88**	**0,012**	**0,04**

LEGENDA: HBC= Pacientes com infecção crônica pelo HBV; CH= Pacientes com infecção crônica pelo HBV e cirrose hepática; CHC + CHC e CH = Pacientes com infecção crônica e carcinoma hepatocelular + pacientes com infecção crônica com carcinoma hepatocelular e cirrose hepática; IC (95%) = Intervalo de confiança de 95%. *p* = Valor de *p* não corrigido. p_c = Valor de *p* corrigido com o método de FDR. Valores de $p < 0,05$ e $p_c \leq 0,05$ foram considerados significativos. f_P% (n) = frequência e número de portadores. f_G (%) = frequência gênica. *KIR2DS4 full* = grupo de alelos funcionais do gene *KIR2DS4. KIR2DS4 1D* = grupo de alelos não funcionais do gene *KIR2DS4* com uma deleção de 22 bp no exon 5.

TABELA 7 - Regressão logística binária para genes *KIR*, seus genótipos e número de genes ativadores entres os grupos de pacientes com infecção crônica e CHC + CHC e CH

***KIR* (Gene)**	**CHC + CHC e CH (*n*=152)**				
	B (SE)	OR	IC (95%)	*p*	p_c
KIR2DS5	NS	NS	NS	NS	NS
Genótipo					
B/x	-0,62 (22)	**0,54**	**0,35-0,83**	**0,0055**	**0,04**
Nº de genes ativadores					
Maior ou igual a 3	NS	NS	NS	NS	NS
Intercepto	0,14 (0,17)	-	-	-	-

Legenda: CHC + CHC e CH = Pacientes com infecção crônica e carcinoma hepatocelular + pacientes com infecção crônica com carcinoma hepatocelular e cirrose hepática. B (SE)= Valor de beta e seu erro padrão. IC (95%)= Intervalo de confiança de 95%. . *p*= Valor de *p* não corrigido. p_c = Valor de *p* corrigido com o método de FDR. *KIR2DS5* e *B/x* = indivíduos com o gene *KIR2DS5* e genótipo *B/x*. Valores de $p < 0,05$ e $p_c \leq 0,05$ foram considerados significativos. NS = Valor de *p* não significante. Verossimilhança de log -2= 460,92. R^2= 0,023 (Cox–Snell); 0,023 (Nagelkerke). Teste de Hosmer e Lemeshow, $x^2 = 10^{-29}$,graus de liberdade = 8 e *p* = 1

7 DISCUSSÃO

Os indivíduos deste estudo são provenientes do Vietnã, país que possui uma das mais altas taxas de prevalência de infecção crônica pelo HBV no mundo. Mais especificamente, a prevalência no Vietnã varia entre 8,8% a 19% da população, sendo que prevalências acima de 8% são consideradas altas (LAVANCHY, 2008; NGUYEN, 2012). A China possuía alta prevalência da infecção, que mais recentemente diminuiu para 7,8% (LIANG et al., 2009). Vários estudos em populações chinesas analisaram *KIR* e *HLA* em pacientes de HBV e controles (GAO et al., 2010; LI et al., 2017; LU et al., 2008; PAN et al., 2011, 2013; ZHI-MING et al., 2007). No entanto, somente os dados de LU et al. (2008); ZHI-MING et al. (2007) foram comparados com nossos dados de genes *KIR* e genótipos por apresentarem um número amostral que possibilita um maior poder de análise estatística (acima de 100 indivíduos por grupo de análise) e que apresentaram critérios mínimos de qualidade de genotipagem. Como critérios de qualidade de genotipagem, utilizamos os padrões conhecidos de desequilíbrio de ligação de certos pares de genes *KIR* (por exemplo, *KIR2DP1* e *KIR2DL1*, *KIR3DL1* e *KIR3DS1*, *KIR2DS1* e *KIR3DS1*, *KIR2DL2* e *KIR2DL3*) e as frequências de genes moldura (que devem ser próximo de 100% de presença) segundo HSU et al. (2002b) e Uhrberg; Parham; Wernet. (2002). No entanto, esse é o primeiro estudo que avalia o polimorfismo de *KIR* no contexto da infecção por HBV na população do Vietnã.

A presença do grupo alélico funcional de *KIR2DS4* apresentou quase 2 vezes mais chance no desenvolvimento da infecção crônica (TABELA 4). Desta forma, a nossos dados sugerem que presença de *KIR2DS4 full* aumenta a chance da progressão para a infecção crônica na população do Vietnã. Ainda, a ausência de *KIR2DS4 full* (presença do genótipo *KIR2DS4 full - / KIR2DS4 1D* +, ou seja, ausência de grupo alélico funcional e presença do grupo alélico não funcional de *KIR2DS4*) apresentou uma associação de proteção de quase duas vezes contra o desenvolvimento contra a infecção crônica. Resultados semelhantes foram observados no estudo conduzido por PODHORZER et al. (2018) em uma amostra de 351 pacientes com infecção crônica pelo HCV e 273 controles, que revelou uma maior frequência do grupo alélico funcional de *KIR2DS4* no grupo com infecção crônica pelo

vírus da hepatite C que o grupo controle (0,52 vs 0,42 respetivamente e p = 0,02). Além disso, esse estudo mostrou que a presença de homozigotos (ausência do grupo alélico funcional de *KIR2DS4*) para grupo de alelos não funcionais do gene *KIR2DS4* (*KIR2DS4 1D*) estavam em uma maior frequência no grupo controle que o grupo com infecção crônica pelo HCV (0,58 vs 0,48 respetivamente e $p < 0,05$).

A regressão logística é uma ferramenta poderosa para verificar a independência das associações encontradas. Essa análise é particularmente relevante no contexto de *KIR*, já que há grande desequilíbrio de ligação entres esses genes e a variação de presença e ausência entre genes não é necessariamente independente. Desta maneira, a análise da regressão mostrou que o efeito de sucetibilidade é devido à presença do grupo alélico funcional de *KIR2DS4* (OR = 2,19 e p_c = 0,04) (TABELA 5).

Vários estudos demonstraram que a presença de haplótipos de conteúdo gênico de *KIR* já foi associada anteriormente com diversas infecções virais (DRING et al., 2011; KHAKOO, 2004; WAUQUIER et al., 2010). A presença do haplótipo *B* representada pela maior presença de KIR2DS3 (OR = 1,90 e p = 0,002) e KIR2DL5 (maior frequência, mas p = 0,10) foi associada a maior risco à infecção crônica por HCV (DRING et al., 2011) e infecção crônica por HBV ($p = 10^{-3}$; LU et al., 2008). A presença do haplótipo *A* conferiu uma associação de proteção contra à infecção crônica pelo HBV (LU et al., 2008) e casos fatais do vírus Ebola (WAUQUIER et al., 2010). Os haplótipos do haplogrupo *A* possuem uma composição gênica mais constante em termos de conteúdo gênico e uma maior proporção de genes inibidores em comparação com os haplótipos do grupo *B*. No haplogrupo *A*, apenas *KIR2DS4* e *KIR2DL4* codificam moléculas ativadoras e ambos apresentam variantes não funcionais que são altamente frequentes (FAURE; LONG, 2002; KIKUCHI-MAKI et al., 2003; MAXWELL et al., 2002; MIDDLETON; GONZALEZ; GILMORE, 2007; YUSA; CATINA; CAMPBELL, 2002).

Os estudos de DRING et al. 2011; KHAKOO, 2004; WAUQUIER et al. 2010 corroboram com trabalhos os quais sugerem que a presença de genes inibidores é fundamental para a educação nos estágios de maturação das células NK. Pois, o sinal dos receptores inibidores auxilia as células NK se tornarem mais responsivas a falta do próprio e aos sinais ativadores de outros receptores ativadores que a célula NK

possui (por exemplo, receptores KIR ativadores, NKG2D e CD94) nos processos de infecção virais. Um exemplo de trabalhos que abordam a importância dos genes inibidores na educação das células NK seria o estudo conduzido por BOUDREAU et al. 2016. Este estudo demonstrou que o receptor inibidor KIR3DL1 é importante para o processo de educação das células NK. Especificamente, o reconhecimento do ligante HLA-Bw4 pelo receptor KIR3DL1 participa da educação das NK e ativação dessas células para o ataque a células infectadas pelo HIV (BOUDREAU et al., 2016).

Como já foi discutido, os sinais inibidores são importantes para a educação e responsividade das células NK frente a células infectadas por vírus. Os genes ativadores não exercem uma grande influência no licenciamento das células NK em comparação aos genes inibidores. Mas, se durante a educação das células NK os sinais ativadores se sobressaírem aos inibidores podem haver uma interferência na ação dos receptores inibidores durante o processo de educação/licenciamento no estágio de maturação das células NK. Isto pode causar uma redução da responsividade e excitabilidade frente as células infectadas por vírus pela diminuição da quantidade de sinal “inibitório”, que é necessário para a “sensibilização” da falta do próprio e dos sinais ativadores. A hipótese que o grupo alélico funcional do gene ativador *KIR2DS4* contribui para uma maior sucetibilidade à infecção crônica pelo HBV, a qual pode ser sugerida pela interferência nos sinais dos receptores inibidores das células NK durante licenciamento das células NK. As associações encontradas em nosso trabalho, assim como também no estudo de PODHORZER et al. (2018), sugere que o grupo dos alelos funcionais de *KIR2DS4* podem contribuir com a sucetibilidade a infecção crônica pelo HBV. Este efeito de maior sucetibilidade visto com o grupo alélico funcional de *KIR2DS4* pode se encaixar na hipótese que os sinais ativadores de receptores ativadores de KIR2DS4 podem causar uma menor responsividade das células NK durante o processo de educação.

O estudo feito por ZHI-MHING et al. (2007) investigou a associação dos genes *KIR* e a sucetibilidade à infecção crônica pelo vírus da hepatite B. O estudo foi realizado na população chinesa da etnia Han. Os genes *KIR2DS1* ($p < 0,001$), *KIR2DL5* ($p = 0,001$) e *KIR3DS1* ($p = 0,001$) foram mais frequentes no grupo de pacientes com remissão espontânea que no grupo de pacientes com infecção crônica pelo HBV. Os genes ativadores *KIR2DS2* ($p = 0,001$) e *KIR2DS3* ($p = 0,014$) foram mais frequentes entre os indivíduos do grupo de hepatite B crônica que no grupo

controle. Segundo ZHI-MING et al. (2007), os genes *KIR2DS1*, *KIR2DL5* e *KIR3DS1* possuem um efeito protetor contra a infecção crônica. Por outro lado, os genes ativadores *KIR2DS2* e *KIR2DS3* apresentaram efeitos de sucetibilidade para a infecção crônica. Em nosso estudo, não houve associação significativa para nenhum destes genes analisados por ZHI-MHING et al. (2007).

O estudo realizado por LU et al. (2008) ocorreu na população chinesa e da etnia Han com 150 pacientes com infecção crônica, 251 com resolução da infecção e 412 indivíduos controle. Os autores encontram uma maior frequência de portadores do haplótipo *B* ($p < 10^{-3}$) no grupo de indivíduos com infecção crônica pelo HBV que no grupo controle. A frequência de indivíduos com o haplótipo *A* ($p < 10^{-3}$) foi menor nos de portadores da infecção crônica quando comparado com o grupo controle. Os autores sugerem que a presença do haplótipo *A* ou *B* pode influenciar desfecho no clínico da infecção, ou seja, na capacidade da eliminação viral. O haplótipo *A* poderia teria um efeito protetor contra a infecção crônica e o haplótipo *B* um efeito de sucetibilidade para a infecção crônica pelo HBV. A associação de proteção ou suscetibilidade ao desenvolvimento pela infecção em relação aos genótipos *A/A* (haplótipo *A*) e *B/x* (haplótipo *B*) não foi observada em nosso estudo como em LU et al. (2008).

A próxima análise que fizemos visou verificar se a presença ou ausência de *KIR* impacta na progressão da infeção pelo HBV para cirrose hepática (CH) e/ou carcinoma hepático (CHC + CHC e CH). A infecção crônica pelo HBV aumenta a chance de 5 a 100 vezes de desenvolver o carcinoma hepatocelular (EL-SERAG, 2012). A cirrose hepática normalmente é de causa secundária em pacientes que desenvolveram o carcinoma, isto se deve a necroinflamação persistente. Dessa forma, geralmente 70% a 80% de pacientes com CHC relacionado à infecção pelo HBV possuem cirrose hepática (EL-SERAG, 2012). A prevalência de pacientes que possuem carcinoma hepatocelular com sobrevida em cinco anos após descoberto é baixa, por exemplo, nos Estados Unidos apenas cerca de 8,9% sobrevivem apesar de agressivos tratamentos contra o câncer (CABIBBO et al., 2010). Sem tratamento, a prevalência de sobrevida diminui muito, mesmo após 2 anos (cerca de 7,3%) (CABIBBO et al., 2010). Nesse contexto, torna-se relevante procurar por variantes genéticas que possam ser indicadoras de prognóstico, assim como contribuir para a compreensão da doença. Os receptores KIR são, portanto, candidatos naturais para

esse estudo pela grande importância que apresentam no controle de células cancerosas (CARIANI et al., 2013; LI et al., 2017; PAN et al., 2011, 2013; STELMA et al., 2016; YINDOM et al., 2017)

Ao compararmos aqueles pacientes com hepatite B crônica com aqueles que desenvolveram carcinoma hepático, observamos uma associação com a presença do haplótipo *B*, diminuindo aproximadamente 2 vezes a chance de desenvolver carcinoma hepatocelular. *KIR2DS5* também apresentou uma associação de proteção. Visto que *KIR2DS5* é encontrado apenas no haplótipo *B*, no entanto, nem todos os haplótipos *B* apresentam *KIR2DS5* e, para verificar qual era a associação com maior importância, recorremos novamente à regressão logística. Nossa análise de regressão mostrou que a presença de haplótipos *B* permaneceu no modelo, sendo essa a única variável associada (TABELA 7).

Até o momento deste estudo, não foi encontrada alguma associação de proteção do haplótipo *B* (genótipo *B/x*) no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular relacionada a infecção crônica pelo HBV ou contra o carcinoma hepatocelular de causa não relacionada à infecção crônica pelo HBV. A análise do número de genes ativadores revelou que pacientes com três ou mais genes ativadores está associada com a proteção à progressão ao carcinoma. Os haplótipos *A* possuem no máximo 2 genes ativadores e os haplótipos *B* pelo menos três ou mais. Desta forma, análise do número de genes ativadores reforça que é a presença de um maior número de genes ativadores no haplótipo B a possível causa da associação encontrada. Uma hipótese para explicação da proteção contra progressão ao carcinoma pelo haplótipo *B* seria o seu efeito ativador de seus receptores ativadores nas células NK contra as células neoplásicas com a infecção crônica já estabelecida, isto é, um maior número de genes ativadores conferiria uma citotoxidade contra estas células para evitar a proliferação neoplásica. Esta hipótese é corroborada por estudos que demonstram os genes ativadores com uma associação de proteção contra desenvolvimento carcinoma hepatocelular em indivíduos com infecção crônica pelo HCV (CARIANI et al., 2013; LÓPEZ-VÁZQUEZ et al., 2005).

Não encontramos associação de conteúdo gênico de *KIR* com o desenvolvimento de cirrose hepática. Nossos resultados foram similares a um estudo anterior em Gâmbia (YINDOM et al., 2017), no qual também não foi encontrada

associação entre presença ou ausência de *KIR* e cirrose hepática em decorrência de infecção por HBV. PALADINO et al. (2007), demonstraram que pacientes com hepatite C que não conseguiram eliminar o vírus e possuíam piores prognósticos apresentavam maior quantidade de genes ativadores. Em conjunto, esses resultados sugerem que o polimorfismo de presença ou ausência de *KIR* não é um fator relevante para o desenvolvimento de cirrose, mas não exclui a possibilidade da participação de *KIR*. Portanto, seria interessante a análise da variação alélica de genes *KIR* em conjunto com presença de ligantes HLA para conclusões mais aprofundadas.

O conjunto dos nossos resultados permite sugerir que os sinais ativadores dos receptores funcionais de KIR2DS4 aumentam a sucetibilidade para o desenvolvimento para a infecção crônica, possivelmente por diminuírem a responsividade das células NK durante o processo de licenciamento/educação. Após o estabelecimento da infeção crônica, a presença do haplótipo *B* e o consequente maior número de genes ativadores parecem contribuir para uma maior eliminação de células neoplásicas, diminuindo dessa forma, o risco de progressão ao carcinoma hepatocelular.

Uma melhor compreensão destes resultados e sua significância biológica apenas será possível quando se analisar KIR em conjunto com seus ligantes HLA, visto que, dependendo da interação entre KIR e seu ligante HLA podemos descobrir a afinidade entre eles e o potencial de inibição ou ativação das células NK. O conhecimento do potencial de ativação e inibição destas interações nas células NK é importante, pois, uma grande inibição ou ativação da célula pode gerar respostas citotóxicas contra células infectadas ou neoplásicas que sejam pouco eficientes ou exageradas, levando a uma eliminação viral ineficiente e danos teciduais. Desta maneira, o conhecimento das interações entre KIR e HLA neste estudo serviria para avaliar se o efeito ativador dos receptores funcionais *KIR2DS4* com seus ligantes aumenta o risco para a infecção crônica. Ademais, seriam importantes os dados de *HLA* para se avaliar as possíveis associações que eles teriam na sucetibilidade ou proteção na infecção crônica e progressões da infecção. A possibilidade de análise de alelos de *KIR* juntamente com *HLA* poderia trazer uma maior profundidade nas associações encontradas neste estudo. Uma análise conjunta com dos grupos de infecção aguda e infecção crônica seria capaz de avaliar a sucetibilidade ou proteção para a infecção. Contudo, o recrutamento de pacientes com infecção aguda não é uma tarefa fácil, dado que a infecção pode ser assintomática ou autolimitada, tornando

difícil a identificação destes pacientes, que na sua maioria, não procuram por ajuda médica e/ou não são diagnosticados para essa doença.

8 CONCLUSÕES

- A presença do grupo alélico funcional de *KIR2DS4* (ativador) está relacionado a um maior risco à infeção crônica do vírus HBV. Sugerimos que isto possa ser causado pelo efeito ativador desse gene, que poderia diminuir a responsividade das células NK durante educação no estágio de maturação destas células.
- Não foram encontradas associações de presença ou ausência de genes *KIR* com o desenvolvimento de cirrose hepática. Esse resultado é diferente do observado em hepatite C, na qual genes *KIR* ativadores foram associados com maior dano hepático.
- Em indivíduos nos quais a infecção crônica já foi estabelecida, a presença de haplótipos *B* confere proteção contra o desenvolvimento de carcinoma hepático, provavelmente por resultar e maior ativação e consequente maior citotoxicidade contra células neoplásicas.
- Nosso estudo contribui para a compreensão do impacto da variação de ausência e presença de *KIR* na proteção contra hepatite B e na sua progressão para quadros clínicos de pior prognóstico. É o primeiro estudo a analisar a população do Vietnã, que apresenta taxas altíssimas taxas de prevalência de HBV.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

AHLENSTIEL, G. et al. Distinct KIR / HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses. **Journal of clinical investigations**, v. 118, n. March, p. 1017–1026, 2008.

AMORIM, L. M. et al. KIR-HLA distribution in a Vietnamese population from Hanoi. **Human Immunology**, v. 79, n. 2, p. 93–100, fev. 2018a.

AMORIM, L. M. et al. Cost-effective and fast KIR gene-content genotyping by multiplex melting curve analysis. **HLA**, v. 92, n. 6, p. 384–391, 22 dez. 2018b.

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, 23 set. 2015.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995.

BERNSTEIN, S. Sur la généralisation du problème de Dirichlet. Première partie. **Mathematische Annalen**, v. 62, n. 2, p. 253–271, jun. 1906.

BERTOLETTI, A. The immune response during hepatitis B virus infection. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 6, p. 1439–1449, 1 jun. 2006.

BJORKMAN, P. J. et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. **Nature**, v. 329, n. 6139, p. 506–512, 8 out. 1987.

BJORKMAN, P. J.; PARHAM, P. Structure, Function and Diversity of Class I Major Histocompatibility Complex Molecules. **Annu Rev Biochem**, v. 59, p. 253–88, 1990.

BLUM, H. E.; GEROK, W.; VYAS, G. N. The molecular biology of hepatitis B virus. **Trends in Genetics**, v. 5, n. 1987, p. 154–158, 1989.

BOUDREAU, J. E. et al. KIR3DL1 and HLA-B Density and Binding Calibrate NK

Education and Response to HIV. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 8, p. 3398–3410, 15 abr. 2016.

BOUDREAU, J. E.; HSU, K. C. Natural Killer Cell Education and the Response to Infection and Cancer Therapy: Stay Tuned. **Trends in Immunology**, v. 39, n. 3, p. 222–239, mar. 2018.

CABIBBO, G. et al. A meta-analysis of survival rates of untreated patients in randomized clinical trials of hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 51, n. 4, p. 1274–1283, abr. 2010.

CAMPBELL, R. D.; TROWSDALE, J. Map of the human MHC. **Immunology Today**, v. 14, n. 7, p. 349–352, jul. 1993.

CARIANI, E. et al. HLA and Killer Immunoglobulin-like Receptor Genes as Outcome Predictors of Hepatitis C Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 19, p. 5465–5473, 1 out. 2013.

CARR, W. H.; PANDO, M. J.; PARHAM, P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 8, p. 5222–5229, 15 out. 2005.

CELLA, M. et al. NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 4, p. 1235–1242, 1994.

CHISARI, F. V.; FERRARI, C. Hepatitis B Virus Immunopathogenesis. **Annual Review of Immunology**, v. 13, n. 1, p. 29–60, abr. 1995.

DO, S. H. Epidemiology of Hepatitis B and C Virus Infections and Liver Cancer in Vietnam. **Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology**, v. 5, n. 1, p. 49–51, 2015.

DRING, M. M. et al. Innate immune genes synergize to predict increased risk of chronic disease in hepatitis C virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 14, p. 5736–5741, 5 abr. 2011.

DUNFORD, L. et al. A Multicentre Molecular Analysis of Hepatitis B and Blood-Borne Virus Coinfections in Viet Nam. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39027, 13 jun. 2012.

EL-SERAG, H. B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 142, n. 6, p. 1264- 1273.e1, 2012.

EL–SERAG, H. B.; RUDOLPH, K. L. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 132, n. 7, p. 2557–2576, jun. 2007.

ELLIOTT, J. M.; YOKOYAMA, W. M. Unifying concepts of MHC-dependent natural killer cell education. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 8, p. 364–372, ago. 2011.

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, maio 2010.

FAURE, M.; LONG, E. O. KIR2DL4 (CD158d), an NK Cell-Activating Receptor with Inhibitory Potential. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 12, p. 6208–6214, 15 jun. 2002.

FAY, M. P. Confidence intervals that match Fisher's exact or Blaker's exact tests. **Biostatistics**, v. 11, n. 2, p. 373–374, abr. 2010.

FELD, J. et al. World Gastroenterology Organisation Global Guideline Hepatitis B. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 50, n. 9, p. 691–703, out. 2016.

GANEM, D.; PRINCE, A. M. Hepatitis B Virus Infection — Natural History and Clinical Consequences. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 11, p. 1118–1129, 11 mar. 2004.

GAO, X. et al. Inhibitory KIR and specific HLA-C gene combinations confer susceptibility to or protection against chronic hepatitis B. **Clinical Immunology**, v. 137, n. 1, p. 139–146, 2010.

GRAEF, T. et al. KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A * 11 while diminishing avidity for HLA-C. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 11, p. 2557–2572, 26 out. 2009.

GUMPERZ, J. E. et al. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 3, p. 1133–1144, 1 mar. 1995.

HEDRICK, P. W. Balancing selection and MHC. **Genetica**, v. 104, n. 3, p. 207–14,

1998.

HIBY, S. E. et al. Maternal KIR in Combination with Paternal HLA-C2 Regulate Human Birth Weight. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 11, p. 5069–5073, 1 jun. 2014.

HOAN, N. X. et al. Interferon-stimulated gene 15 in hepatitis B-related liver diseases. **Oncotarget**, v. 7, n. 42, p. 67777–67787, 18 out. 2016.

HOAN, N. X. et al. SOCS3 genetic variants and promoter hypermethylation in patients with chronic hepatitis B. **Oncotarget**, v. 8, n. 10, p. 17127–17139, 7 mar. 2017.

HOLLENBACH, J. A. et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene content variation in the HGDP-CEPH populations. **Immunogenetics**, v. 64, n. 10, p. 719–737, 1 out. 2012.

HORTON, R. et al. Gene map of the extended human MHC. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 12, p. 889–899, dez. 2004.

HSU, K. C. 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. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 9, p. 5118–5129, 1 nov. 2002a.

HSU, K. C. et al. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. **Immunological Reviews**, v. 190, n. 1, p. 40–52, dez. 2002b.

HUGHES, A. L.; YEAGER, M. NATURAL SELECTION AT MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX LOCI OF VERTEBRATES. **Annual Review of Genetics**, v. 32, n. 1, p. 415–435, dez. 1998.

KAO, J.-H. Hepatitis B viral genotypes: Clinical relevance and molecular characteristics. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 6, p. 643–650, jun. 2002.

KENNEDY, P. T. F. et al. Immune Tolerant Chronic Hepatitis B: The Unrecognized Risks. **Viruses**, v. 9, n. 5, p. 1–19, 2017.

KHAKOO, S. I. HLA and NK Cell Inhibitory Receptor Genes in Resolving Hepatitis C Virus Infection. **Science**, v. 305, n. 5685, p. 872–874, 6 ago. 2004.

KIKUCHI-MAKI, A. et al. KIR2DL4 Is an IL-2-Regulated NK Cell Receptor That Exhibits Limited Expression in Humans but Triggers Strong IFN- Production. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 7, p. 3415–3425, 1 out. 2003.

KONSTANTINOU, D.; DEUTSCH, M. The spectrum of HBV/HCV coinfection: epidemiology, clinical characteristics, viralinteractions and management. **Annals of gastroenterology**, v. 28, n. 2, p. 221–228, 2015.

KOSTYU, D. D.; CRESSWELL, P.; AMOS, D. B. A public HLA antigen associated with HLA-A9, Aw32, and Bw4. **Immunogenetics**, v. 10, n. 5, p. 433–442, out. 1980.

LAMPERTICO, P. et al. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 67, n. 2, p. 370–398, ago. 2017.

LANIER, L. L. et al. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. **Nature**, v. 391, n. 6668, p. 703–707, 12 fev. 1998.

LANIER, L. L. NK CELL RECOGNITION. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 225–274, abr. 2005.

LANIER, L. L. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 4, p. 259–268, 14 abr. 2008.

LAVANCHY, D. Chronic viral hepatitis as a public health issue in the world. **Best practice & research. Clinical gastroenterology**, v. 22, n. 6, p. 991–1008, 2008.

LEE, W. M. Hepatitis B Virus Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 24, p. 1733–1745, 11 dez. 1997.

LI, W. et al. KIR3DS1/HLA-B Bw4-80Ile Genotype Is Correlated with the IFN-α Therapy Response in hepatitis B e antigen-Positive Chronic Hepatitis B. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1285, 11 out. 2017.

LIANG, X. et al. Epidemiological serosurvey of Hepatitis B in China—Declining HBV prevalence due to Hepatitis B vaccination. **Vaccine**, v. 27, n. 47, p. 6550–6557, nov.

2009.

LIAW, Y. F.; CHU, C. M. Hepatitis B virus infection. **The Lancet**, v. 373, n. 9663, p. 582–592, 2009.

LÓPEZ-VÁZQUEZ, A. et al. Protective Effect of the HLA-Bw4I80 Epitope and the Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor 3DS1 Gene against the Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Hepatitis C Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 1, p. 162–165, jul. 2005.

LU, Z. et al. Association of KIR Genotypes and Haplotypes with Susceptibility to Chronic Hepatitis B Virus Infection in Chinese Han Population. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 5, n. 6, p. 457–463, 1 dez. 2008.

MANDELBOIM, O. et al. Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 3, p. 913–922, 1 set. 1996.

MARRACK, P. et al. Evolutionarily Conserved Amino Acids That Control TCR-MHC Interaction. **Annual Review of Immunology**, v. 26, n. 1, p. 171–203, abr. 2008.

MARTIN, M. P. et al. Cutting Edge: Susceptibility to Psoriatic Arthritis: Influence of Activating Killer Ig-Like Receptor Genes in the Absence of Specific HLA-C Alleles. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 6, p. 2818–2822, 15 set. 2002.

MARTÍNEZ-BORRA, J.; LÓPEZ-LARREA, C. The Emergence of the Major Histocompatilibility Complex. In: LÓPEZ-LARREA, C. (Ed.). . **Self and Nonself**. New York, NY: Springer US, 2012. p. 277–289.

MASON, W. S. et al. HBV DNA Integration and Clonal Hepatocyte Expansion in Chronic Hepatitis B Patients Considered Immune Tolerant. **Gastroenterology**, v. 151, n. 5, p. 986- 998.e4, nov. 2016.

MAXWELL, L. D. et al. 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. 254–258, set. 2002.

MAZZA, C.; MALISSEN, B. What guides MHC-restricted TCR recognition? **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 4, p. 225–235, ago. 2007.

MEYER, D.; THOMSON, G. How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. **Annals of Human Genetics**, v. 65, n. 1, p. 1–26, jan. 2001.

MIDDLETON, D.; GONZALEZ, A.; GILMORE, P. M. Studies on the Expression of the Deleted KIR2DS4*003 Gene Product and Distribution of KIR2DS4 Deleted and Nondeleted Versions in Different Populations. **Human Immunology**, v. 68, n. 2, p. 128–134, fev. 2007.

MIDDLETON, D.; GONZELEZ, F. The extensive polymorphism of KIR genes. **Immunology**, v. 129, n. 1, p. 8–19, 2010.

MOFFETT, A. et al. Variation of maternal KIR and fetal HLA-C genes in reproductive failure: too early for clinical intervention. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 33, n. 6, p. 763–769, dez. 2016.

MÜLLER, C. A. et al. Genetic and serological heterogeneity of the supertypic HLA-B locus specificities Bw4 and Bw6. **Immunogenetics**, v. 30, n. 3, p. 200–207, set. 1989.

NAKIMULI, A. et al. A KIR B centromeric region present in Africans but not Europeans protects pregnant women from pre-eclampsia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 3, p. 845–850, 20 jan. 2015.

NGUYEN, H. M. et al. Prevalence and genotype distribution of hepatitis delta virus among chronic hepatitis B carriers in Central Vietnam. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175304, 12 abr. 2017.

NGUYEN, V. T. T. Hepatitis B Infection in Vietnam. **Asia Pacific Journal of Public Health**, v. 24, n. 2, p. 361–373, 15 mar. 2012.

NI, Y. et al. Hepatitis B and D Viruses Exploit Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide for Species-Specific Entry into Hepatocytes. **Gastroenterology**, v. 146, n. 4, p. 1070- 1083.e6, abr. 2014.

O'CONNOR, G. M. et al. Functional Polymorphism of the KIR3DL1/S1 Receptor on Human NK Cells. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 1, p. 235–241, 1 jan. 2007.

OLCESE, L. et al. Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells. **Journal of**

immunology (Baltimore, Md. : 1950), v. 158, n. 11, p. 5083–6, 1 jun. 1997.

PALADINO, N. et al. Increased frequencies of activating natural killer receptors are associated with liver injury in individuals who do not eliminate hepatitis C virus. **Tissue Antigens**, v. 69, n. SUPPL. 1, p. 109–111, abr. 2007.

PAN, N. et al. KIR and HLA loci are associated with hepatocellular carcinoma development in patients with hepatitis B virus infection: A case-control study. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. 1–8, 2011.

PAN, N. et al. Combination of Human Leukocyte Antigen and Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genetic Background Influences the Onset Age of Hepatocellular Carcinoma in Male Patients with Hepatitis B Virus Infection. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, p. 1–7, 11 out. 2013.

PARHAM, P. Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: Balancing signals in the natural killer cell response. **Immunology Letters**, v. 92, n. 1–2, p. 11–13, 2004.

PEPPA, D. et al. Blockade of Immunosuppressive Cytokines Restores NK Cell Antiviral Function in Chronic Hepatitis B Virus Infection. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 12, p. e1001227, 16 dez. 2010.

PODHORZER, A. et al. The Clinical Features of Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infections Are Associated with Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genes and Their Expression on the Surface of Natural Killer Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JAN, p. 1–16, 5 jan. 2018.

PYO, C.-W. et al. Different Patterns of Evolution in the Centromeric and Telomeric Regions of Group A and B Haplotypes of the Human Killer Cell Ig-Like Receptor Locus. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e15115, 29 dez. 2010.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2019. Disponível em: <https://www.r-project.org/>.

RADZIWILL, G.; TUCKER, W.; SCHALLER, H. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. **Journal of virology**, v. 64, n. 2, p. 613–20, fev. 1990.

RAIMONDO, G. et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 49, n. 4, p. 652–657, 2008.

REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 3, p. 215–229, 2005.

REITH, W.; LEIBUNDGUT-LANDMANN, S.; WALDBURGER, J.-M. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 10, p. 793–806, out. 2005.

ROSENTHAL, P. R.; PFALLER, K. S.; MURRAY, M. A. **Microbiologia Médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

ROUSE, B. T.; SEHRAWAT, S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 7, p. 514–26, 2010.

SELVAKUMAR, A.; STEFFENS, U.; DUPONT, B. Polymorphism and domain variability of human killer cell inhibitory receptors. **Immunological Reviews**, v. 155, p. 183–196, 1997.

SHILLING, H. G. et al. Allelic Polymorphism Synergizes with Variable Gene Content to Individualize Human KIR Genotype. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 5, p. 2307–2315, 1 mar. 2002.

SHIN, E.-C.; SUNG, P. S.; PARK, S.-H. Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 8, p. 509–523, 2016.

SHOUVAL, D.; SHIBOLET, O. Immunosuppression and HBV Reactivation. **Seminars in Liver Disease**, v. 33, n. 02, p. 167–177, 8 jun. 2013.

SINGH, K. P. et al. HIV-Hepatitis B virus co-infection: epidemiology, pathogenesis and treatment. **AIDS**, v. 31, n. 15, p. 2035–2052, set. 2017.

SMYTH, M. J. et al. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 11, p. 850–861, nov. 2002.

STEINLE, A. et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. **Immunogenetics**, v. 53, n. 4, p. 279–287, 2001.

STELMA, F. et al. HLA-C and KIR combined genotype as new response marker for HBeAg-positive chronic hepatitis B patients treated with interferon-based

combination therapy. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 23, n. 8, p. 652–659, ago. 2016.

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. 645–657, 26 ago. 2011.

SUNBUL, M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 18, p. 5427–5434, 2014.

SUREAU, C.; SALISSE, J. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus A-determinant. **Hepatology**, v. 57, n. 3, p. 985–994, mar. 2013.

SY, B. T. et al. Genetic variants of interferon regulatory factor 5 associated with chronic hepatitis B infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 248–256, 14 jan. 2018.

TONG, S. et al. Natural killer cell activation contributes to hepatitis B viral control in a mouse model. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 314, 22 dez. 2017.

TREICHEL, U. et al. Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells. **Archives of Virology**, v. 142, n. 3, p. 493–498, 2 mar. 1997.

TROWSDALE, J. et al. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. **Immunological Reviews**, v. 181, n. 1, p. 20–38, jul. 2001.

TROWSDALE, J. Genetic and Functional Relationships between MHC and NK Receptor Genes. **Immunity**, v. 15, n. 3, p. 363–374, set. 2001.

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. et al. Human Diversity in Killer Cell Inhibitory Receptor Genes. **Immunity**, v. 7, n. 6, p. 753–763, dez. 1997.

UHRBERG, M. et al. The Repertoire of Killer Cell Ig-Like Receptor and CD94:NKG2A Receptors in T Cells: Clones Sharing Identical TCR Rearrangement Express Highly Diverse Killer Cell Ig-Like Receptor Patterns. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 6, p. 3923–3932, 15 mar. 2001.

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, 1 jul. 2002.

VIVIER, E. et al. Functions of natural killer cells. **Nature Immunology**, v. 9, n. 5, p. 503–510, 2008.

VIVIER, E. et al. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. **Science**, v. 331, n. 6013, p. 44–49, 2011.

WAUQUIER, N. et al. Association of KIR2DS1 and KIR2DS3 with fatal outcome in Ebola virus infection. **Immunogenetics**, v. 62, n. 11–12, p. 767–771, 29 dez. 2010.

WENDE, H.; VOLZ, A.; ZIEGLER, A. Extensive gene duplications and a large inversion characterize the human leukocyte receptor cluster. **Immunogenetics**, v. 51, n. 8–9, p. 703–713, 4 jul. 2000.

WHO. **WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system**. Disponível em: <http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/countries?countrycriteria%5Bcountry%5D%5B%5D=VNM&commit=OK>. Acesso em: 19 ago. 2018.

WILSON, M. J. et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 9, p. 4778–4783, 25 abr. 2000.

WINTER, C. C.; LONG, E. O. A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 9, p. 4026 LP – 4028, 1 maio 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hepatitis B**. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>. Acesso em: 18 mar. 2019.

XIONG, S. et al. Maternal uterine NK cell–activating receptor KIR2DS1 enhances placentation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 10, p. 4264–4272, 1 out. 2013.

YAN, H. et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. **eLife**, v. 1, n. 1, p. 1–28, 13 nov. 2012.

YINDOM, L.-M. et al. KIR content genotypes associate with carriage of hepatitis B surface antigen, e antigen and HBV viral load in Gambians. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0188307, 17 nov. 2017.

YOU, C. R. Update on hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 37, p. 13293, 2014.

YUEN, M.-F. et al. Hepatitis B virus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 18035, 7 jun. 2018.

YUSA, S. -I.; CATINA, T. L.; CAMPBELL, K. S. SHP-1- and Phosphotyrosine-Independent Inhibitory Signaling by a Killer Cell Ig-Like Receptor Cytoplasmic Domain in Human NK Cells. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 10, p. 5047–5057, 15 maio 2002.

ZHI-MING, L. et al. Polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptor gene: possible association with susceptibility to or clearance of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. **Croatian medical journal**, v. 48, n. 6, p. 800–806, 2007.

ANEXO 1 - LISTA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES de *KIR* UTILIZADOS

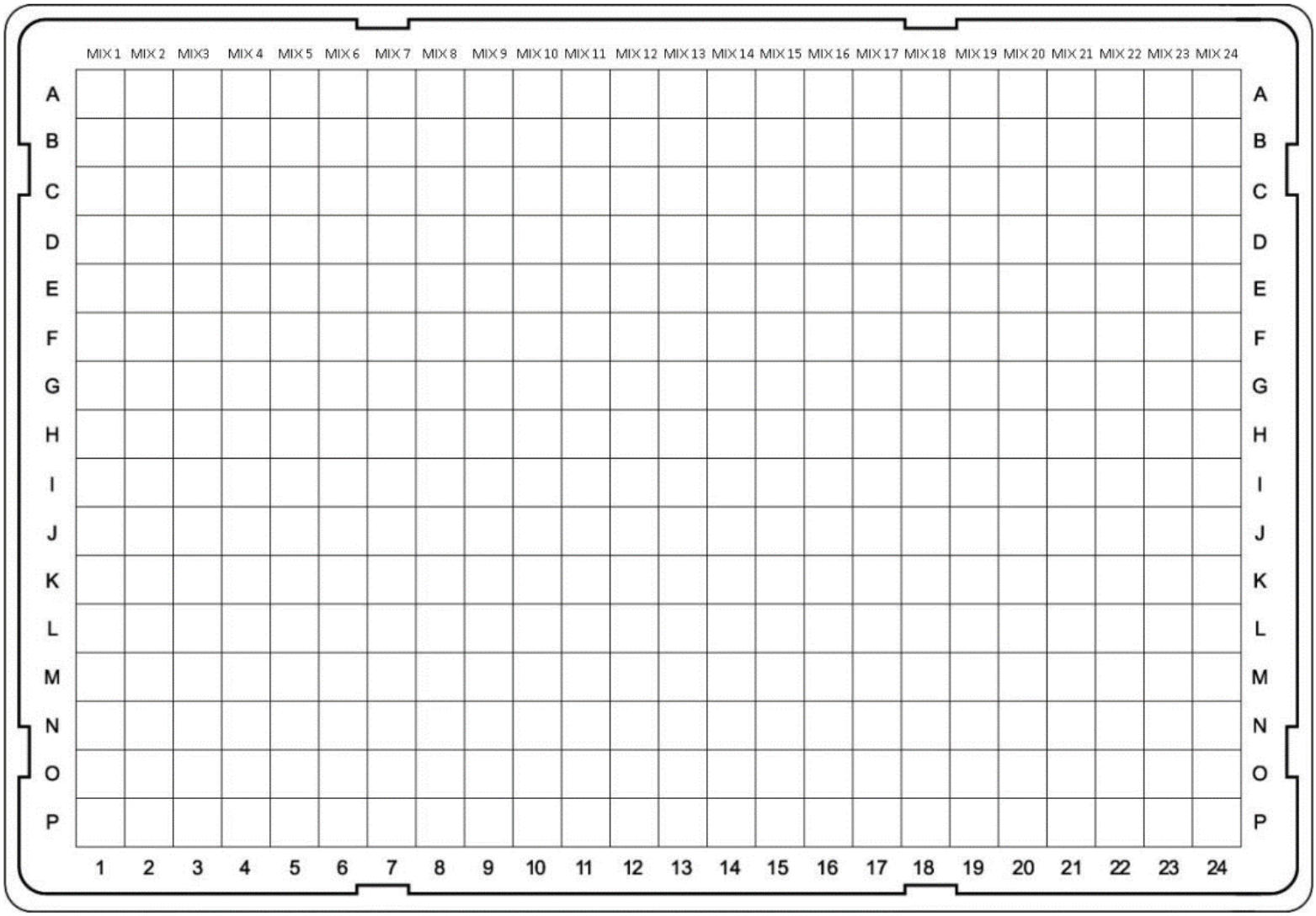
Oligonucleotídeo Iniciador	ID do Par	Sequência (5' - 3')
KIR2DL1 F1	16	GTTGGTCAGATGTCA
KIR2DL1 R1	16	GGTCCCTGCCAGGTCTTGCG
KIR2DL1 F2	17B	CCATCAGTCGCATGACG
KIR2DL1 R2	17B	TCACTGGGAGCTGACAC
KIR2DL2 F1	7	GAGGGGGAGGCCCATGAAT
KIR2DL2 R1	7	TCGAGTTTGACCACTCGTAT
KIR2DL2 F2	6	CTGGCCCACCCAGGTCG
KIR2DL2 R2	6	GGACCGATGGAGAAGTTGGCT
KIR2DL3 F1	8	CTTCATCGCTGGTGCTG
KIR2DL3 R1	8	AGGCTCTTGGTCCATTACAA
KIR2DL3 F2	9B	AGACCCTCAGGAGGTGA
KIR2DL3 R2	9B	CAGGAGACAACTTTGGATCA
KIR2DL4 F1	18	CAGGACAAGCCCTTCTGC
KIR2DL4 R1	18	CTGGGTGCCGACCACT
KIR2DL4 F2	19	ACCTTCGCTTACAGCCCG
KIR2DL4 R2	19	GGGTTTCCTGTGACAGAAACAG
KIR2DL5 F1	10	GCGCTGTGGTGCCTCG
KIR2DL5 R1	10	GACCACTCAATGGGGGAGC
KIR2DL5 F2	11	TGCAGCTCCAGGAGCTCA
KIR2DL5 R2	11	GGGTCTGACCACTCATAGGGT
KIR3DL1 F1	20	CGCTGTGGTGCCTCGA
KIR3DL1 R1	20	GGTGTGAACCCCGACATG
KIR3DL1 F2	21	CCCTGGTGAAATCAGGAGAGAG
KIR3DL1 R2	21	TGTAGGTCCCTGCAAGGGCAA
KIR3DL2 F1	27	CAAACCCTTCCTGTCTGCCC
KIR3DL2 R1	27	GTGCCGACCACCCAGTGA
KIR3DL2 F2	28	CCCATGAACGTAGGCTCCG
KIR3DL2 R2	28	CACACGCAGGGCAGGG
KIR3DL3 F2	1C	TTCTGCACAGAGAGGGGATCA
KIR3DL3 R2	1C	GAGCCGACAACTCATAGGGTA
KIR2DP1 F1	14	GTCTGCCTGGCCCAGCT
KIR2DP1 R1	14	GTGTGAACCCCGACATCTGTAC
KIR2DP1 F2	15	CCATCGGTCCCATGATGG
KIR2DP1 R2	15	CACTGGGAGCTGACAACTGATG
KIR2DS1 F1	24	CTTCTCCATCAGTCGCATGAA
KIR2DS1 F2	24	CTTCTCCATCAGTCGCATGAG
KIR2DS1 R1	24	AGAGGGTCACTGGGAGCTGAC
KIR2DS2 F1	3B	TTCTGCACAGAGAGGGGAAGTA
KIR2DS2 R1	3B	GGGTCACTGGGAGCTGACAA
KIR2DS2 F2	4	CGGGCCCCACGGTTT
KIR2DS2 R2	4	GGTCACTCGAGTTTGACCACTCA
KIR2DS3 F1	12	TGGCCCACCCAGGTCG

KIR2DS3 R1	12	TGAAAACTGATAGGGGGAGTGAGG
KIR2DS3 F2	13	CTATGACATGTACCATCTATCCAC
KIR2DS3 R2	13	AAGCAGTGGGTCACTTGAC
KIR2DS4 F2	26	GTTCAGGCAGGAGAGAAT
KIR2DS4 R2	26	GTTTGACCACTCGTAGGGAGC
KIR2DS5 F1	5A	TGATGGGGTCTCCAAGGG
KIR2DS5 R1	5A	TCCAGAGGGTCACTGGGC
KIR2DS5 F2	5C	ACAGAGAGGGGACGTTTAACC
KIR2DS5 R2	5C	ATGTCCAGAGGGTCACTGGG
KIR3DP1 F	31	CCCCSTCCCTTGATAGATGGTAG
KIR3DP1 R	31	TCTCTCAGCCCAGCCGC
KIR3DS1 F1	22	AGCCTGCAGGGAACAGAAG
KIR3DS1 R1	22	GCCTGACTGTGGTGCTCG
KIR3DS1 F2	23	CCTGGTGAAATCAGGAGAGAG
KIR3DS1 R2	23	GTCCCTGCAAGGGCAC
GALC F	-	TTACCCAGAGCCCTATCGTTCT
GALC R	-	GTCTGCCCATCACCACCTATT
KIR 2DS4 1D F	-	CCTTGTCCTGCAGCTCCAT
KIR 2DS4 1D R2	-	GACGGAAACAAGCAGTGGA
KIR 2DS4 Full F	-	CAGCTCCCGGAGCTCCTAT
KIR 2DS4 Full R2	-	GACGGAAACAAGCAGTGGA

FONTE: Adaptado e modificado de AMORIM et al. (2018b)

ANEXO 2 - LAYOUT DA PLACA 384 E AS TEMPERATURAS DE MELTING DOS AMPLICONS DE CADA GENE *KIR* E *GALC*

Posição	MIX 1		MIX 2		MIX 3		MIX 4		MIX 5	
Gene 1	15 (2DP1)	81,1-82	11(2DL5)	87	6 (2DL2)	83,3-83,5	17B(2DL1)	82	16 (2DL1)	83,5-83,94
Gene 2	1C (3DL3)	84,35-85,28	23(3DS1)	83,7	18 (2DL4)	85,4- 86,4	4(2DS2)	86,89-87,5	2DS4 full	86,6-87
Posição	**MIX 6**		**MIX 7**		**MIX 8**		**Mix 9**		**MIX 10**	
Gene 1	28(3DL2)	85,9-86,2	19 (2DL4)	86,5-87,2	3B (2DS2)	83,4-83,9	5A (2DS5)	84,4-84,8	5C (2DS5)	85-85,9
Gene 2	14(2DP1)	83,5-83,9	GALC	78-79	GALC	78-79	GALC	78-79	GALC	78-79
Posição	**MIX 11**		**MIX 12**		**MIX 13**		**MIX 14**		**MIX 15**	
Gene 1	7 (2DL2)	85,4-86	8(2DL3)	86	9b(2DL3)	83	10(2DL5)	85-86	12(2DS3)	85-85,5
Gene 2	GALC	78-79	GALC	78-79	GALC	78-79	GALC	78-79	GALC	78-79
Posição	**MIX 16**		**MIX 17**		**MIX 18**		**MIX 19**		**MIX 20**	
Gene 1	13(2DS3)	85,6-86,2	20(3DL1)	82,7-83,9	21(3DL1)	83,9-84,8	22(3DS1)	84-85	24(2DS1)	82,6-83,5
Gene 2	GALC	78-79	GALC	78-79	GALC	78-79	GALC	78-79	GALC	78-79
Posição	**MIX 21**		**MIX 22**		**MIX 23**		**MIX 24**			
Gene 1	26(2DS4)	86,7-87,3	27(3DL2)	85,8-86,5	30(3DP1)	84	2DS4 1D	86,5-87		
Gene 2							GALC	78-79		



FONTE: Adaptado e modificado de AMORIM et al. (2018b)