

MÁRCIO MARQUES DE MORAES

**ANÁLISE DOS LOCOS *KIR* EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS E SUA
RELAÇÃO COM A ACEITAÇÃO DO ALOENXERTO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração de Genética, do Curso de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

CURITIBA

2007

MÁRCIO MARQUES DE MORAES

**ANÁLISE DOS LOCOS *KIR* EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS E SUA
RELAÇÃO COM A ACEITAÇÃO DO ALOENXERTO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração de Genética, do Curso de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

CURITIBA

2007

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, por todo o apoio, sinceridade e perseverança, à minha orientadora Prof^a Dr^a Maria da Graça Bicalho. Por acreditar no meu trabalho e dedicar boa parte do seu tempo em ensinamentos.

À minha família, Leonardo Franco de Moraes e Suzete Marques de Moraes, pelo amor, dedicação integral, paciência e crédito. Além dos maiores exemplos de honestidade e sabedoria dos quais conheço. Meus irmãos Daniel e Fábio, pelos anos de aprendizado em amizade e diversão. Ao destino, que me apresentou à pessoa que eu amo, Giovana Tardin Torrezan, pessoa que me ilumina com sua alegria e me enriquece com sua força de vontade e paciência.

A todos os meus amigos do LIGH, que desde o começo me acolheram super bem, pelos muitos momentos de diversão e pelos ensinamentos, sejam eles técnicos ou de experiência de vida: Alessandro, Anna, Bia, Carol, Cláudia, Clineu, Dani, Eni, Fernanda, Gorete, Isabel, Izolde, José Luis, Marina, Patrícia, Paulo, Paulo Roberto, Rafael, Renate, Savana, Sibelle, Sonia, Téó e aos demais que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos de Turma, em especial, à Jociney, Kelly, Liziane e Marcos, por todos os bons momentos juntos, pela amizade e por todas horas de estudo em grupos de estudo antes e depois da seleção de mestrado.

Ao casal de amigos Benn e Lupe que são um exemplo de força de vontade, seriedade e alegria em se fazer ciência.

À todos os Professores do Departamento de Genética, por compartilhar de sua sabedoria e por semear a ética e a consciência científica. Um agradecimento especial às Prof.^a Eleidi A. C. Freire-Maia e Nina A. B. Pagnan e aos Prof. Iglénir J. Cavalli e Eduardo A. Donadi, pelas sugestões e críticas durante a realização do presente trabalho.

Ao Prof. Karam, um exemplo de vontade, disciplina, ética e bondade.

Às secretárias Valéria e Luciana, por todo o carinho e pelas várias vezes em que salvaram minha vida.

À Dr^a Fabiana Loss de Carvalho Contieri e ao Dr. Ricardo Benvenuto, juntamente com sua equipe do Hospital Evangélico de Curitiba e da Casa de Apoio

ao transplantado renal, pela imensa colaboração e pela disponibilização de amostras e dados referentes aos pacientes renais e seus doadores.

Obrigado à TODOS que fazem parte dessa minha família!

Um despertar difícil num mundo gigantesco de
realizações e objetivos a se alcançar,
um acordar suave e feliz numa pequena vida
recheada de amizades e pessoas a quem se
amar...

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS	2
2.1.1. Transplante Renal	5
2.2. O MHC HUMANO	7
2.3. CÉLULAS <i>NATURAL KILLER</i>	11
2.3.1. Hipótese do “ <i>Missing-Self</i> ” (Perda do Próprio)	12
2.3.2. Diferentes Estruturas de Reconhecimento das Células NK	15
2.3.2.1. Receptores de células NK que reconhecem ligantes não MHC	15
2.3.2.2. Receptores de células NK que reconhecem ligantes relacionados ao MHC	16
2.3.2.3. Receptores de células NK que reconhecem ligantes MHC de classe I	17
2.4. RECEPTOR KIR	20
2.4.1. Estrutura das Proteínas KIR	20
2.4.2. Interações entre Receptores KIR e seus Ligantes HLA de Classe I	23
2.4.2.1. Estrutura dos complexos KIR2D/HLA-Cw	24
2.4.3. Genes <i>KIR</i>	28
2.4.3.1. Nomenclatura dos Genes <i>KIR</i>	32
2.4.3.2. Estrutura Gênica e Variabilidade Alélica	34
2.4.3.3. Organização Gênica e Diversidade Haplotípica	37
2.4.3.4. Controle da Expressão Gênica	40
2.4.3.5. Evolução	41
2.4.3.6. Genes <i>KIR</i> e Transplante	43
3. OBJETIVOS	45

4. JUSTIFICATIVA	56
5. MATERIAL E MÉTODOS	47
5.1. Dados Epidemiológicos das duplas receptor/doador.....	47
5.2. Extração do Dna Genômico	48
5.3. Concentração do DNA	48
5.4. Tipagem dos Genes <i>KIR</i> pela Técnica PCR-SSOP	49
5.5. Tipagem dos Genes <i>HLA-Cw</i> pela Técnica PCR-SSP	52
5.6. Análise Estatística	55
6. RESULTADOS	58
6.1. Dados Epidemiológicos das duplas receptor/doador.....	58
6.2. Frequência dos Genes <i>KIR</i>	64
6.3. Frequência Haplótipica e Genótipos Encontrados.....	75
6.4. Identidade Genética para os locos <i>KIR</i> com ligantes específicos <i>HLA-Cw</i> entre receptores e doadores.....	80
7. DISCUSSÃO	90
7.1. Dados Epidemiológicos das duplas receptor/doador.....	90
7.2. Frequência dos Genes <i>KIR</i>	92
7.3. Haplótipos A e B.....	93
7.4. Genótipos.....	93
7.5. Identidade Genética <i>KIR</i> e Incompatibilidade <i>KIR</i> -Ligante.....	95
8. CONCLUSÃO	100
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXOS	115
ANEXO I – TABELA DE SINÔNIMOS DOS LOCOS <i>KIR</i>	115
ANEXO II – PROTOCOLOS DE TÉCNICAS.....	117
ANEXO III – FOLHAS DE INTERPRETAÇÃO DO “KIT” PARA TIPAGEM <i>HLA-Cw</i>	121

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Alorreconhecimento de aloantígenos	4
FIGURA 2 – Localização e estrutura do MHC humano	8
FIGURA 3 – Estrutura das moléculas MHC de classe I e de classe II	9
FIGURA 4 – Hipótese do “ <i>Missing-Self</i> ” revisada	13
FIGURA 5 – Receptores das células NK com ligantes MHC I	19
FIGURA 6 – Receptores KIR ativadores e inibidores das células NK	21
FIGURA 7 – Características estruturais dos receptores KIR (ativadores e inibidores) das células NK	22
FIGURA 8 – Estrutura da região extracelular da molécula KIR2D	24
FIGURA 9 – Interação molecular entre as proteínas KIR2D e HLA de classe I específicos.....	26
FIGURA 10 – Região Cromossômica dos <i>LRC</i> e dos <i>KIR</i>	30
FIGURA 11 – Nomenclatura dos genes <i>KIR</i>	33
FIGURA 12 – Estrutura gênica dos genes <i>KIR</i>	35
FIGURA 13 – Representação dos haplótipos A e B	39
FIGURA 14 – Diversidade do grupo haplotípico B	40
FIGURA 15a – Princípios da técnica PCR-SSOP para tipagem <i>KIR</i>	50
FIGURA 15b – Princípios da técnica PCR-SSOP para tipagem <i>KIR</i> (continuação).....	51
FIGURA 16 – Interpretação das bandas para tipagem do gene <i>HLA-Cw</i>	54
FIGURA 17 – Padrão de bandas para tipagem do gene <i>HLA-Cw</i>	54
GRÁFICO 1 – Etnia de receptores e doadores.....	59
GRÁFICO 2 – Etnia de receptores+doadores com e sem rejeição.....	59
GRÁFICO 3 – Representação da distribuição dos sexos em relação à rejeição.....	60
GRÁFICO 4 – Média das idades de receptores e doadores, entre os grupos com e sem rejeição..	63
GRÁFICO 5– Distribuição do grau de parentesco em relação à presença ou ausência da rejeição	64
GRÁFICO 6 – Distribuição Haplotípica entre receptores e doadores.....	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Número de transplantes de órgãos realizados no Brasil (1995-2003)	3
TABELA 2 – Características das moléculas HLA de classe I e II	9
TABELA 3 – Receptores KIR e seus ligantes HLA-Cw	24
TABELA 4 – Conversão sorológica das tipagens moleculares de <i>HLA-Cw</i>	25
TABELA 5 – Características funcionais e estruturais dos receptores KIR	27
TABELA 6 – Condições de amplificação para realização da PCR-SSOP para tipagem dos genes <i>KIR</i>	52
TABELA 7 – Condições de amplificação para realização da PCR-SSP para tipagem dos genes <i>HLA-Cw</i>	54
TABELA 8 – Distribuição dos sexos entre duplas com e sem rejeição.....	60
TABELA 9 – Distribuição das duplas (receptor/doador) de mesmo sexo e com sexos diferentes nos grupos com e sem rejeição.....	61
TABELA 10 – Média das idades de receptores e doadores em relação ao sexo e a ocorrência ou não de rejeição.....	62
TABELA 11 – Média das diferenças de idade entre receptores e doadores em relação à ocorrência de rejeição.....	62
TABELA 12 – Frequência da presença dos genes <i>KIR</i> entre receptores e doadores.....	66
TABELA 13 – Comparação das frequências da presença dos locos <i>KIR</i> entre o grupo com rejeição, sem rejeição e outras cinco populações.....	68
TABELA 14 – Comparação das frequências da presença loco por loco <i>KIR</i> entre receptores e outras cinco populações.....	70
TABELA 15 – Comparação das frequências da presença loco por loco <i>KIR</i> entre doadores e outras cinco populações.....	72
TABELA 16 – Comparação das frequências da presença dos locos <i>KIR</i> entre receptores e doadores com e sem rejeição.....	74
TABELA 17 – Frequência dos haplótipos dentro dos grupos receptor e doador.....	76
TABELA 18 – Distribuição dos genótipos entre receptores e doadores com os haplótipos B e AB.	78
TABELA 19 – Identidade para os locos <i>KIR</i> inibidores entre duplas com e sem rejeição.....	81
TABELA 20 – Identidade para os locos <i>KIR</i> ativadores entre duplas com e sem rejeição.....	81
TABELA 21 – Identidade para os locos <i>KIR</i> ativadores e inibidores entre duplas com e sem rejeição.....	82
TABELA 22 – Incompatibilidade KIR-Ligante entre os locos <i>KIR</i> inibidores e seu ligante <i>HLA-Cw</i> do doador.....	83
TABELA 23 – Incompatibilidade KIR-Ligante entre os locos <i>KIR</i> aticadores e seu ligante <i>HLA-Cw</i> do doador.....	84
TABELA 24 – Distribuição das identidades dos locos <i>KIR</i> inibidores e ativadores entre as duplas com e sem rejeição, com 0-2 MM, 3 MM e 4-6 MM (<i>mismatches</i>) HLA.....	85
TABELA 25 – Comparações das identidades dos locos <i>KIR</i> inibidores e ativadores entre as duplas com e sem rejeição, dentro dos grupos com 0-2 MM, 3 MM e 4-6 MM	86

(*mismatches*) HLA.....

TABELA 26 – Distribuição das incompatibilidades KIR-Ligante dos locos *KIR* inibidores e ativadores entre as duplas com e sem rejeição, com 0-2 MM, 3 MM e 4-6 MM (*mismatches*) HLA..... 88

TABELA 27 – Comparações das identidades dos locos *KIR* inibidores e ativadores entre as duplas com e sem rejeição, dentro dos grupos com 0-2 MM, 3 MM e 4-6 MM (*mismatches*) HLA..... 89

LISTA DE ABREVIATURAS

Células NK	- células <i>Natural Killer</i> ;
KIR	- <i>Killer-cell Ig-like Receptors</i> ou Receptores semelhantes à Imunoglobulina das Células <i>Natural Killer</i> ;
MHC	- <i>Major Histocompatibility Complex</i> ou Complexo Principal de Histocompatibilidade;
HLA	- <i>Human Leukocyte Antigen</i> ou Antígeno Leucocitário Humano;
SNT	- Sistema Nacional de Transplantes;
CNCDO	- Central Nacional de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos;
TCR	- <i>T cell Receptor</i> ou Receptor das Células T;
APC ou CAA	- <i>Antigen-presenting Cells</i> ou Células Apresentadoras de Antígenos;
Ig	- Imunoglobulina
LILR	- <i>Leukocyte Ig-like Receptors</i> ou Receptores semelhantes à Ig Leucocitários;
LRC	- <i>Leukocyte Receptor Complex</i> ou Complexo de Receptores Leucocitários;
ITIM	- Imunoreceptor com Motivo Inibidor baseado em Tirosina;
ITAM	- Imunoreceptor com Motivo Ativador baseado em Tirosina;
KARAP	- <i>Killer Cell Activating Receptor Associated Protein</i> ou Proteína Associada ao Receptor Ativador de Células NK;
ILT	- <i>Ig-like transcripts</i> ou Transcritos semelhantes à Ig
LENG	- <i>LRC Encoded Novel Gene</i> ou Novo gene LRC
NKC	- <i>Natural Killer Complex</i> ou Complexo <i>Natural Killer</i> ;
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> ou Reação em Cadeia da Polimerase;
SSP	- <i>Single Sequence Primer</i> ou Iniciador de Seqüência Específica;
SSOP	- <i>Sequence Specific Oligonucleotide Probe</i> ou Sonda Oligonucleotídica de Seqüência Específica;

RESUMO

Vários estudos têm relacionado genes envolvidos com a resposta imune, como os do sistema *HLA*, com variações na aceitação e na taxa de sobrevivência do aloenxerto em transplantes renais. Contudo, outros genes não *HLA* podem estar também influenciando, como por exemplo, os genes codificantes de receptores semelhantes à Imunoglobulina das células *Natural Killer* (KIR). Evidências experimentais têm demonstrado a infiltração das células NK em órgãos transplantados, juntamente com o aumento de sua atividade logo após o transplante. A ação citotóxica das células NK é mediada por interações entre receptores de superfície celular, dentre os quais está o foco deste estudo (receptores KIR) e moléculas *HLA* de classe I específicas na superfície da célula alvo. A ausência de ligantes *HLA* I específicos na superfície da célula alvo para receptores inibidores KIR pode levar a aloreatividade das células NK do receptor contra células do aloenxerto (hipótese “missing-self”). Esta ausência do ligante específico é denominada em vários estudos como “Incompatibilidade KIR-Ligante”. No presente estudo foi analisada, através da técnica de tipagem PCR-SSOP, a presença de 16 locos *KIR* em 100 duplas de transplantados renais e a possível influência da identidade (presença do loco tanto no receptor quanto no doador) de 5 destes locos (*2DL1*, *2DL2* e *2DL3*, *KIR* inibidores; *2DS1* e *2DS2*, *KIR* ativadores) cujos ligantes específicos são as moléculas *HLA-Cw* e à ocorrência de episódios de rejeição aguda. Verificou-se também a influência da incompatibilidade KIR-Ligante para estes mesmos 5 locos, sobre a rejeição aguda ao aloenxerto renal (com a tipagem dos ligantes *HLA-Cw* pela técnica PCR-SSP). Dentre as 100 duplas analisadas, 59 sofreram episódios de rejeição aguda. Constatou-se que a não identidade entre receptor e doador para os locos *2DL2*, *2DS1* e *2DS2* pode ter relação com a ocorrência de episódios de rejeição (OR=2,64, IC95%=1,12-6,22; OR=3,47, IC95%=1,26-9,56; OR=2,82; IC95%=1,20-6,66, respectivamente). Contudo, a estratificação dos transplantados renais de acordo com o grau de compatibilidade *HLA* (0-2MM, 3MM e 4-6MM), para reduzir a influência destes genes no resultado do transplante, permitiu observar que a não identidade para o loco *2DS2* mostra um aumento de 4,62 vezes na chance de ocorrência de episódios de rejeição em transplantes haploidênticos (3MM) (OR=4,62; IC95%=1,06-20,16). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na distribuição dos grupos com e sem rejeição em relação à incompatibilidade KIR-Ligante.

1. INTRODUÇÃO

Transplante é o processo de coletar células, tecidos ou órgãos de um indivíduo, transferindo este material (enxerto) para outro local do mesmo indivíduo (transplante autólogo) ou para um indivíduo diferente da mesma espécie (transplante alogênico). Na prática clínica, o transplante é utilizado com a finalidade de tentar superar uma deficiência funcional ou anatômica do paciente. Como todo alotransplante, o sucesso deste ou a “pega do enxerto” depende, entre outros fatores, da prevenção da rejeição do órgão pelo organismo do receptor. Embora a rejeição seja um processo dependente de células T, a destruição do aloenxerto resulta de uma ampla distribuição de mecanismos efetores. Um destes mecanismos, ainda pouco estudado, é a atividade aumentada das células *Natural Killer* (NK) logo após o transplante apesar de forte imunossupressão, sugerindo que a citotoxicidade destas células do receptor contra o doador possa ser um componente adicional previamente não reconhecido do processo de rejeição. Em humanos, o aumento do número de células NK circulantes, tem sido observado, durante a rejeição aguda de aloenxertos renais (COOKSEY et al., 1984), além da infiltração destas células em órgãos como coração (MARBOE et al., 1983) e rim (HANCOCK et al., 1985; TOTTERMAN et al., 1989) após o transplante. A atividade citolítica das células NK humanas é regulada pela interação de receptores de membrana ativadores e inibidores, expressos por estas células, com moléculas de superfície presentes em células alvo, como por exemplo, as moléculas HLA (Antígenos Leucocitários Humanos) de classe I expressas por células hospedeiras (MIDDLETON et al., 2005). Isto conduziu à hipótese do “missing-self”, que postula que as células NK reconhecem e eliminam as células que não expressam moléculas próprias do MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) (MIDDLETON et al., 2005). Das famílias de receptores de células NK conhecidas optou-se no presente trabalho em estudar as relações entre os Receptores semelhantes à Imunoglobulina das células *Natural Killer* (KIR do inglês, *Killer-cell Ig-like Receptors*) e sua possível influência no prognóstico e na sobrevivência do aloenxerto em pacientes renais. São ainda poucos os estudos que investigam as relações entre receptores KIR e aceitação de aloenxertos renais.

2. REVISÃO BILIOGRÁFICA

2.1 Transplante de Órgãos

A atividade de transplante de órgãos e tecidos, no Brasil, iniciou-se no ano de 1964 na cidade do Rio de Janeiro e no ano de 1965 na cidade de São Paulo, com a realização dos dois primeiros transplantes renais do país. No ano de 1997 foi criado pelo do Ministério da Saúde o Sistema Nacional de Transplantes (SNT) tendo como atribuição normatizar e desenvolver o processo de captação e distribuição de tecidos, órgãos e partes retiradas do corpo humano para finalidades terapêuticas. Três anos após a criação do SNT, foi estruturada pelo mesmo a Central Nacional de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos (CNCDO), cujo objetivo principal é coordenar o trabalho das CNCDO estaduais, no sentido de agilizar a atividade executiva do programa de transplantes, que cabe às Secretarias Estaduais de Saúde. Informações disponíveis no *site* do Sistema Nacional de Transplantes (<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/dsra/integram.htm> Acesso em: Julho de 2006)

Uma das mais importantes atribuições da CNCDO é dar continuidade a normatização e a distribuição de órgãos entre os estados, que, anteriormente, ocorria de forma aleatória. Segundo estatísticas apresentadas por estas instituições, foram realizados no país 50751 transplantes de órgãos (abrangendo transplantes de coração, pâncreas, pulmão, fígado, córnea, rim entre outros) no período de 1995 a 2003, de doadores vivos ou cadavéricos (TABELA 1).

O transplante de tecidos para substituição de órgãos doentes é, atualmente, uma importante terapia médica. Tal transferência de órgãos ou tecidos recebe a denominação de transplante autólogo, quando é feita para o mesmo indivíduo, e de transplante alogênico quando para indivíduos diferentes mas da mesma espécie. Entretanto, na maioria dos casos, a resposta imune desenvolvida pelo organismo do receptor em relação ao tecido transplantado estranho, se constitui no principal impedimento para um transplante bem sucedido. Em tecidos contendo células nucleadas, as respostas de células T às moléculas MHC podem desencadear uma reação ao aloenxerto. A compatibilidade para genes MHC, há muito tempo tem sido considerada um dos principais fatores responsáveis pela “pega do enxerto” (tolerância ao órgão transplantado). Esta compatibilidade entre doador e receptor aumenta a taxa de sobrevivência do aloenxerto (JANEWAY et al., 2000; ABBAS,

LICHTMAN & POBER, 2000).

TABELA 1. NÚMERO DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS REALIZADOS NO BRASIL (1995-2003)

TRANSPLANTES REALIZADOS POR ANO*									
1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	TOTAL
4134	3979	3932	4299	5128	6299	7229	7981	7770	50751

TRANSPLANTES DE RIM POR ANO									
1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	TOTAL
1530	1501	1502	1578	2050	2383	2551	2645	2496	18236

Tabela 1. Número de transplantes realizados no Brasil no período entre os anos de 1995 e 2003. * Dados calculados a partir de transplantes de coração, rim, córnea, medula óssea, fígado, pulmão e pâncreas. Durante este período foi registrado um acréscimo no número de transplantes da ordem de 97,6%, enquanto que o acréscimo de transplantes renais foi de 66,2% no mesmo período. Dados retirados do site do Sistema Nacional de Transplantes. (<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/dsra/integram.htm>, acesso em Agosto de 2006).

Contudo, o sucesso do alotransplante depende, entre outros fatores, da prevenção da rejeição, que se inicia com o reconhecimento de antígenos de histocompatibilidade presentes no enxerto do doador, por linfócitos T do receptor. Esta reação recebe a denominação de alorreconhecimento e pode se dar de duas formas:

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

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

FIGURA 1. ALORRECONHECIMENTO DE ALOANTÍGENOS

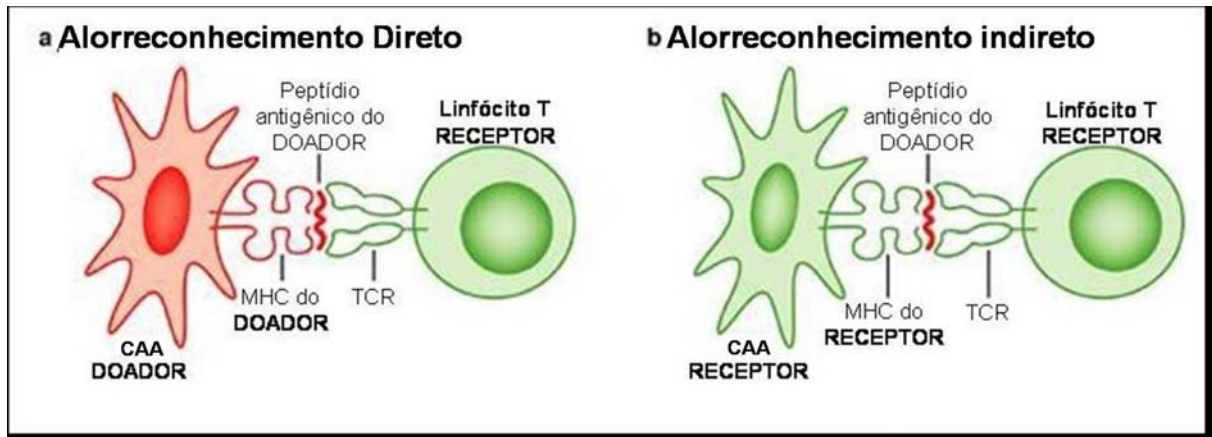


Figura 1. Alorreconhecimento de peptídeos antigênicos do órgão transplantado. a) Alorreconhecimento direto, apresentação de aloantígenos via Célula Apresentadora de Antígenos (CAA) do próprio doador a linfócitos T do receptor. b) Alorreconhecimento Indireto, requer a internalização, processamento e a apresentação dos aloantígenos por CAAs do receptor a linfócitos T também do receptor. FONTE: ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Cellular and molecular Immunology. 4ed., Saunders, 2000.

O tipo de rejeição pode ser classificado segundo alguns critérios em:

- **Rejeição Hiperaguda:** ocorre dentro de 48 horas após a ocorrência da anastomose das artérias e vasos sanguíneos nos receptores e, decorre da presença de anticorpos anti-HLA pré-formados presentes no soro do receptor em decorrência de um estímulo prévio (gestação, transfusões, transplante... etc.). É caracterizada por febre e por anúria. A ligação de anticorpos citotóxicos no endotélio vascular ativa o complemento, com subsequente agregação de neutrófilos e plaquetas, resultando em trombose. É um evento irreversível onde a única opção de tratamento é a remoção imediata do enxerto.
- **Rejeição Aguda:** tipo mais comum de rejeição, é devido a respostas alogênicas primárias (tais como o alorreconhecimento direto e indireto) ocorrendo dentre 6 a 120 dias após o transplante. É mediado por células T e anticorpos, os quais podem causar tubulite e vasculite, respectivamente. Altas doses de esteróides e drogas antilinfocitárias são efetivos na reversão da resposta pelas células T, aproximadamente em 80 a 90% das vezes, mas anticorpos antilinfocitários somente revertem a vasculite em aproximadamente 60% das vezes.

- **Nefropatia Crônica do Enxerto (anteriormente referida como Rejeição Crônica):** ocorre quando a tolerância ao aloenxerto é interrompida, após 4 ou mais meses do transplante. É caracterizada pela proteinúria, ocasional hematúria, hipertensão e síndrome nefrótica. O mediador primário deste tipo de rejeição é o anticorpo.

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

2.1.1 Transplante Renal

Apesar dos avanços técnicos no procedimento de diálise, o transplante renal é uma alternativa de tratamento para pacientes com doenças renais em estágio final (BENFIELD et al., 1999; CECKA, 2001) como por exemplo, a Insuficiência Renal Crônica (IRC). Essa condição resulta de lesões renais irreversíveis e progressivas, provocadas por doenças que tornam o rim incapaz de realizar as suas funções. As principais causas para o desenvolvimento da IRC são: nefropatia diabética, glomerulonefrite crônica, pielonefrite crônica, nefrosclerose maligna e doença renal policística. O ritmo de progressão depende da doença original e de causas agravantes, como hipertensão, infecção urinária, nefrite, gota e diabete. Muitas vezes a falência renal ocorre pelo desconhecimento e descuido dos portadores das doenças renais. Nas fases iniciais da IRC, diminuir proteínas, sal e alimentos que contenham fósforo é fundamental no tratamento dietético. Se a doença continuar danificando o rim até atingir 90% de sua atividade, os 10% restantes serão insuficientes para manter a saúde do paciente. Nessa condição, a dieta, os diuréticos, os anti-hipertensivos e outros medicamentos já não são efetivos. Torna-se necessário o uso da diálise e/ou o transplante renal (informações disponíveis no *site* do ABC da Saúde, <http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?268> Acesso em: Julho de 2006).

Alguns testes pré-transplante são realizados tanto no receptor quanto no doador, dentre os quais se incluem: tipagem do sistema sanguíneo ABO (os antígenos ABO estão presentes nos eritrócitos e no endotélio vascular); teste *cross-*

match ou prova cruzada (testa anticorpos do receptor contra possíveis antígenos na superfície celular de linfócitos do doador); e tipagem HLA (teste para determinar o nível de compatibilidade HLA entre receptores e doadores). A prova-cruzada (*cross-match*) é importante para evitar que anticorpos anti-HLA pré-existentes danifiquem o endotélio do enxerto, causando assim, a rejeição hiperaguda.

A compatibilidade HLA entre receptor e doador no transplante renal, assim como em muitos outros tipos de transplante, demonstram que quanto maior a similaridade HLA entre ambos, maior será a sobrevida do enxerto. Estudos clínicos têm permitido concluir que de todos os locos de classe I e de classe II, a similaridade *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DR* entre doador e receptor é de grande importância para prever o prognóstico do transplante. Em geral, nos transplantes de órgãos sólidos, a similaridade entre os locos *HLA-A* e *HLA-B* é importante tanto no período inicial quanto no tardio, após o transplante. A compatibilidade do locos *HLA-DR* só é importante nos três primeiros meses após o transplante, devida sua expressão limitada à APCs e células dendríticas, enquanto os locos *HLA-A* e *HLA-B* se expressam em todas as células do órgão transplantado (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Os alelos *HLA* são expressos de forma co-dominante. Por essa razão, na investigação e tipagem dos três locos acima citados, para se definir o grau de compatibilidade HLA entre a dupla receptor/doador, pode-se observar de zero a seis similaridades (*matches*) entre receptores e doadores. Seis *matches* são preditivos de uma melhor sobrevida do enxerto e, quanto menor o número de *matches*, menor a taxa de sobrevida (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Embora a rejeição seja um processo dependente de células T, a destruição do aloenxerto resulta de uma ampla participação de mecanismos efetores. Um destes mecanismos, ainda pouco estudado, é a atividade aumentada das células *Natural Killer* (NK) logo após o transplante, mesmo estando o paciente sob um regime forte de imunossupressão. Este fato é sugestivo de que a citotoxicidade das células NK do receptor contra o doador seja um alvo previamente não reconhecido do processo de rejeição. Em humanos, o aumento do número de células NK circulantes, tem sido observado durante a rejeição aguda de aloenxertos renais (COOKSEY et al., 1984), podendo haver infiltração destas células no tecido

transplantado (HANCOCK et al., 1985; TOTTERMAN et al., 1989). Este mesmo processo de infiltração pode ocorrer em aloenxertos cardíacos (MARBOE et al., 1983). As células NK têm a habilidade para lisar células epiteliais do rim humano *in vitro* (LIN et al., 1993). O trabalho de Hancock e colaboradores (1985) demonstra que painéis de anticorpos monoclonais direcionados contra vários marcadores leucocitários, detectam células NK CD56 no aloenxerto renal durante as fases iniciais do processo de rejeição. Após esta fase ocorre um fluxo de células T e macrófagos (HANCOCK et al., 1985). A importância destas células, em transplantes de órgãos sólidos, tem sido também demonstrada em alotransplantes de modelos animais (MAIER et al., 2001; POPOOLA et al., 2001).

2.2. O MHC humano

A identificação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) na espécie humana ocorreu na década de 50, por Dausset, Payne e van Rood. (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Estes autores descobriram que alguns anticorpos, presentes no soro de indivíduos politransfundidos, eram reativos a antígenos presentes em leucócitos. Estudos genéticos relacionados às esses aloantígenos, bem como estudos sorológicos e moleculares realizados em *workshops* internacionais de histocompatibilidade, permitiram a identificação de vários locos gênicos polimórficos e polialélicos situados em uma região do braço curto do cromossomo 6 humano (6p21.31) (FIGURA 2). Essa região do genoma, foi subdividida em regiões de classe I, II e III (FIGURA 2) (LAMM et al., 1985; BELL, 1989; CHRISTANSEN et al., 1994) de acordo com a estrutura e função dos produtos dos genes nela situados. Estes genes codificam aloantígenos expressos na superfície de leucócitos, os quais receberam a designação de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Cada molécula HLA consiste em uma fenda (ou sulco) extracelular que se liga a peptídeos proteicos, seguido de um par de domínios semelhantes à Imunoglobulina. A proteína HLA é ancorada à membrana celular por regiões transmembrânicas e citoplasmáticas. As moléculas HLA são subdivididas em classe I e II. As moléculas de classe I, são heterodímeros constituídos de uma cadeia α

composta por três domínios (α_1 , α_2 e α_3) ligada de forma não covalente a uma molécula de β_2 -microglobulina. Proteínas de classe II são heterodímeros formados por uma cadeia α , com dois domínios (α_1 e α_2), e uma cadeia β , também com dois domínios (β_1 e β_2) (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Suas características e diferenças estão representadas na tabela 2 e na figura 3.

FIGURA 2. Localização e estrutura do MHC humano

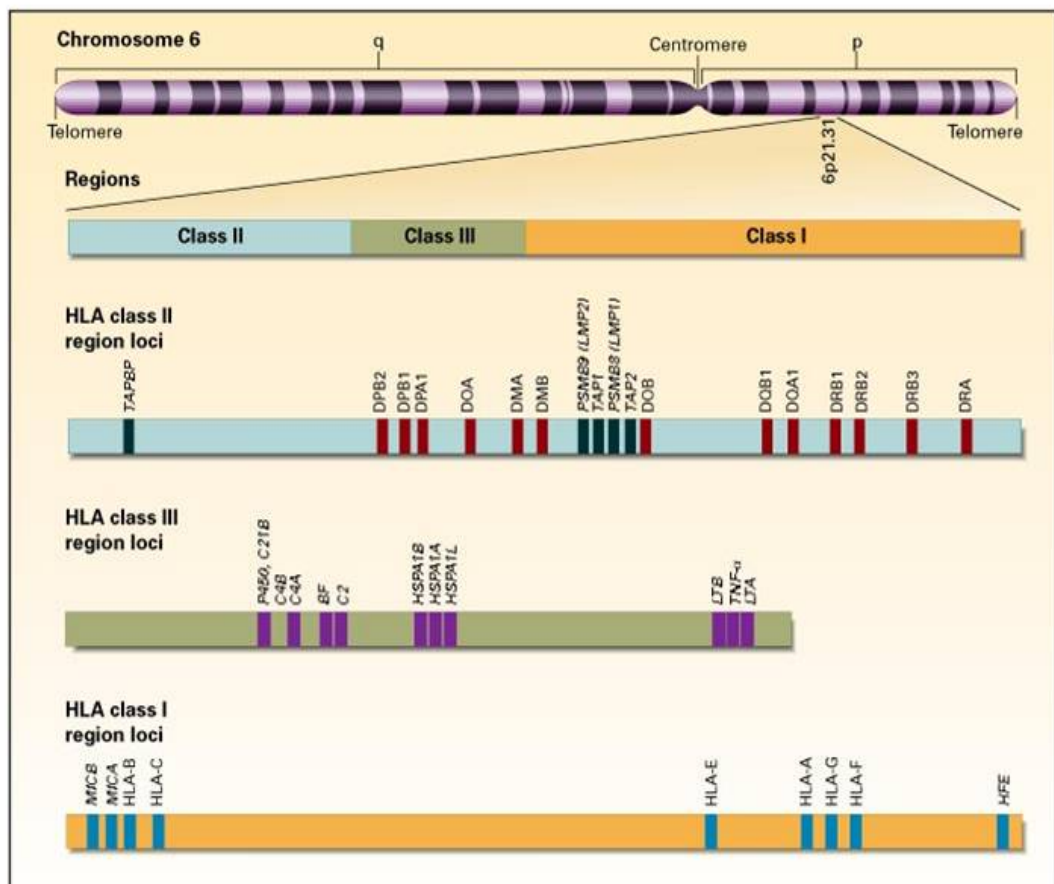


Figura 2. Localização do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) humano. Disponível em http://nejm.org/teaching_tools/jpegs_large/klei.fig1.jpg, acesso em Novembro de 2006)

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

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

Aác = aminoácidos

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

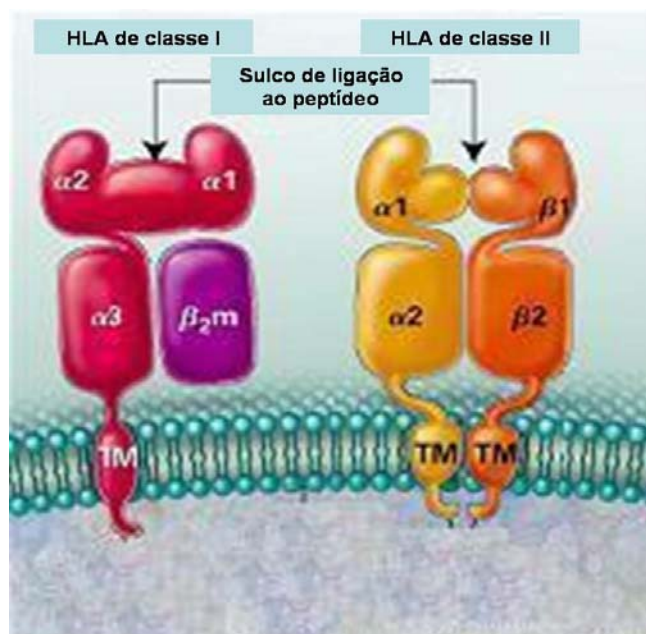


Figura 3. TM = região transmembrânica. Moléculas de classe I formadas por um heterodímero constituído por uma cadeia α e uma cadeia leve denominada β_2 -microglobulina, enquanto que moléculas de classe II formam um heterodímero de uma cadeia α e uma cadeia β .

A descoberta deste sistema de histocompatibilidade deu início à área clínica em crescente expansão de transplante de órgãos e tecidos. Em humanos, os genes HLA, codificam proteínas que auxiliam no processo de imunomodulação da resposta imune, e no reconhecimento do próprio e do não próprio (células e tecidos) por células do sistema imune e sua principal função é apresentar antígenos estranhos a linfócitos T.

Embora a compatibilidade HLA entre doador-receptor seja um requisito fundamental para o sucesso do transplante, o papel dos anticorpos, células apresentadoras de antígenos, células T helper e citotóxicas, moléculas de superfície

de células do sistema imune, mecanismos de sinalização e outros mecanismos efetores da resposta imune, não foram totalmente elucidados e necessitam de maiores esclarecimentos. Dentre estes está o objetivo deste estudo, que é investigar o papel das células NK na rejeição aguda ao aloenxerto renal.

2.3. Células *Natural Killer*

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

Mais do que ser regulada por apenas um receptor, as células NK parecem atuar pela integração de inúmeros sinais provenientes de vários receptores. Sua ativação é controlada por receptores inibidores que, presumivelmente funcionam como um sistema “a prova de falhas”, evitando assim estimulação inadvertida, a qual resultaria em dano às células normais do organismo (LANIER, 2005). O reconhecimento de células alvo, por células NK envolve a ligação e interação entre receptores ativadores e inibidores presentes em sua membrana celular com moléculas ligantes na superfície da célula alvo, além da integração de sinais transmitidos por estes receptores determinando se a célula deve ou não ser ativada. No caso de ativação, a célula NK responde reorganizando e liberando grânulos citotóxicos, além da transcrição e secreção de citocinas (LANIER, 2005). As NK estão prontas para agir, expressam constitutivamente transcritos para granzimas (proteases da mesma família das enzimas digestivas tripsina e quimiotripsina) e perforinas (proteínas que se polimerizam ao serem secretadas para gerar poros na membrana da célula alvo). Conseqüentemente sua resposta lítica pode ser ativada em minutos sem requerer transcrição, tradução ou proliferação celular (LANIER, 2005). Os mecanismos, envolvidos na ativação e na inibição destas células, estão aos poucos sendo elucidados, sendo a hipótese do “*missing-self*” (perda do próprio) (KÄRRE, 1985; KÄRRE, 2002) a mais aceita atualmente.

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

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

Evidências experimentais têm permitido sugerir que receptores inibidores para MHC de classe I possam servir somente para atenuar, mais do que inibir completamente, as funções efetoras da células NK e que, a quantidade de proteínas MHC I na superfície celular do alvo é proporcional ao grau de inibição.

FIGURA 4. HIPÓTESE “MISSING-SELF” REVISADA

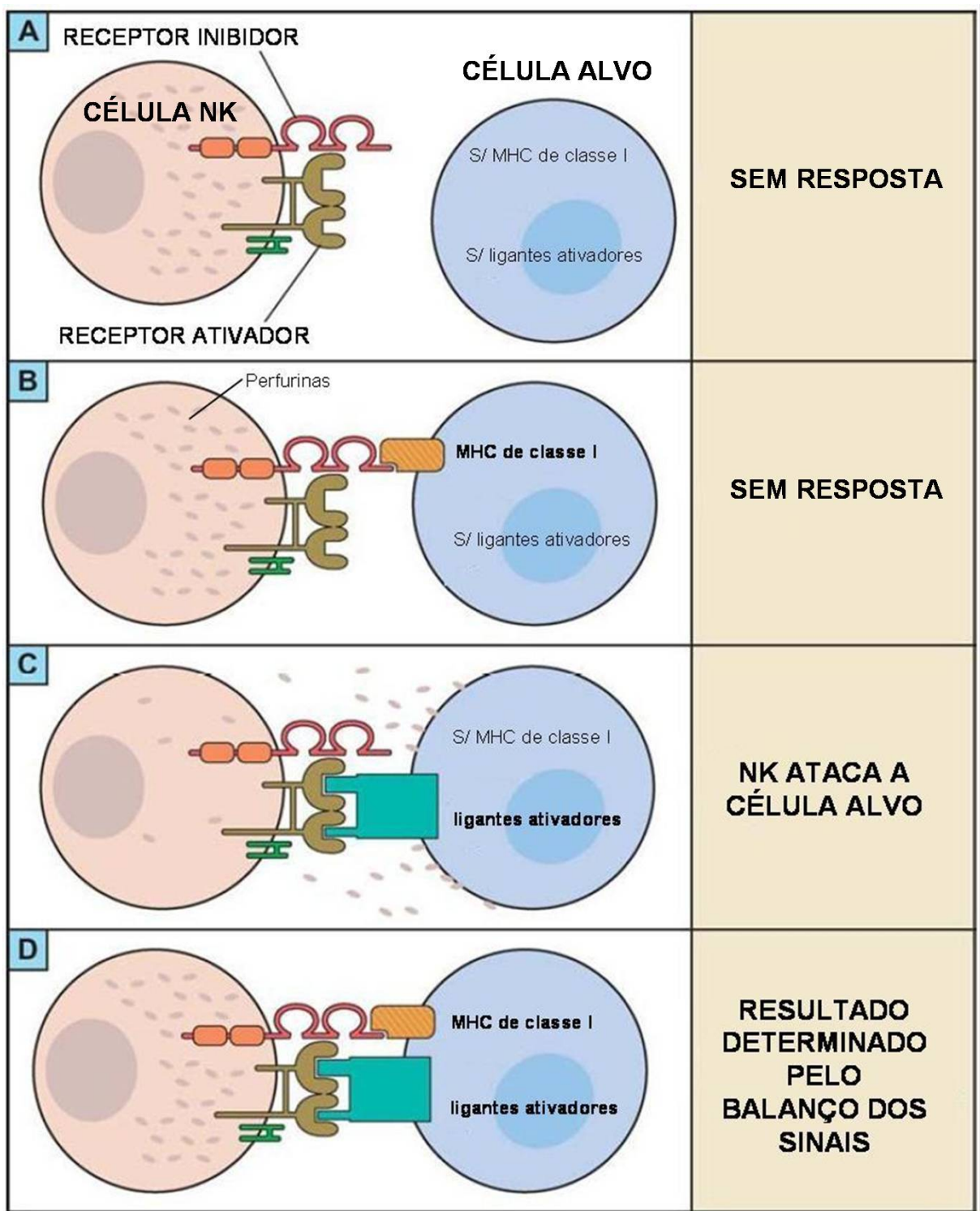


Figura 4. Hipótese “Missing-self” revisada. Representação do encontro entre uma célula NK e a célula alvo e possíveis resultados. A) Em algumas circunstâncias, receptores inibidores da célula NK (diferentes dos KIR) reconhecendo outros ligantes que não as proteínas MHC de classe I podem suprimir respostas das células NK. B) A expressão de moléculas MHC de classe I ligantes para os receptores inibidores KIR desabilita a resposta, além da não expressão de ligantes ativadores. C) A não expressão da molécula MHC I ligante do receptor inibidor KIR conjuntamente com a expressão de ligantes para receptores ativadores resultam em mecanismos responsivos efetores. D) Quando interagem com células alvo expressando ligantes para ambos receptores ativadores e inibidores, o

resultado é determinado pela soma da extensão dos sinais. A quantidade dos receptores ativadores e inibidores nas células NK e a quantidade de ligantes nas células alvo, tanto quanto diferenças qualitativas nos sinais transduzidos, determinam a extensão da resposta das células NK. FONTE: LANIER, L.L. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 225-274; 2005.

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

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

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

2.3.2. Diferentes Estruturas de Reconhecimento das Células *Natural Killer*

2.3.2.1. Receptores de células NK que reconhecem ligantes não MHC

As células NK possuem vários sistemas de receptores de membrana que evoluíram para detecção de moléculas MHC de classe I e moléculas relacionadas ao MHC I, as quais regulam suas respostas citolíticas. Contudo, estas células possuem mecanismos adicionais que regulam seu comportamento quando se trata de alvos potenciais que não expressam proteínas MHC ou relacionadas (LANIER, 2005). Não está claro ainda se receptores com ligantes não MHC possam servir como receptores “coestimulatórios”, aumentando a sinalização de outros receptores, ou independentemente iniciar uma resposta. Dois destes receptores com ligantes não MHC estão abaixo relacionados, receptores 2B4 e DNAM-1.

Receptor **2B4**

O receptor 2B4 (também denominado CD244) e seu ligante CD48 (BROWN et al., 1998; LATCHMAN et al., 1998) são membros da família CD42 de proteínas relacionadas à Imunoglobulinas (Ig), codificadas por um grupo de genes localizados no cromossomo 1 humano (1q22). Estes receptores estão presentes em todas as células NK, na maioria das células T TCR⁺ $\gamma\delta$ e das células T CD8⁺ (tipicamente o grupo de células com o fenótipo efetor/memória) (GARNI-WAGNER et al., 1993; VALIANTE & TRINCHIERI, 1993; PERITT et al., 1999; SPEISER et al., 2001), além de monócitos e basófilos (NAKAJIMA et al., 1999). A proteína 2B4 possui dois domínios extracelulares tipo Ig e caudas citoplasmáticas contendo 4 motivos Thr-x-Tyr-x-x-Leu/Ile (onde cada x denota um aminoácido qualquer). Em células NK maduras humanas, estes receptores comportam-se como receptores ativadores. Entretanto, se este receptor 2B4 é capaz de ativar funções efetoras independentemente ou servir como um receptor “coestimulador”, não está ainda definido (VALIANTE & TRINCHIERI, 1993; KUBIN et al., 1999; NAKAJIMA et al., 1999; SIVORI et al., 2000).

Receptor **DNAM-1**

O receptor DNAM-1 (também denominado CD226) é membro da superfamília das Ig, sendo codificado por um gene localizado no cromossomo 18 humano (18q22.3), que se expressa em células NK, células T, um grupo de células B, monócitos e plaquetas (BURNS et al., 1985; SCOTT et al., 1989; SHIBUYA et al., 1996). Seus ligantes foram identificados como sendo o CD112 (também conhecido por Receptor do Vírus da Pólio (PVR)) e CD155 (também chamado de Nectina-2) (BOTTINO et al., 2003; TAHARA-HANAOKA et al., 2004). Interações entre DNAM-1 em células NK e CD112 e CD155 em células tumorais, aumentam a citotoxicidade mediada por NK e produção de citocinas. Estes ligantes possuem uma expressão aumentada em células tumorais humanas (MASSON et al., 2001; BOTTINO et al., 2003; TAHARA-HANAOKA et al., 2004).

Além disso, a migração de monócitos, através de junções intracelulares de células endoteliais, envolve o DNAM-1 (em monócitos) e CD155 em células endoteliais vasculares (REYMOND, et al., 2004), sugerindo a possibilidade de um papel similar para estes receptores no tráfego das células NK (LANIER, 2005).

2.3.2.2. Receptores de células NK que reconhecem ligantes relacionados ao MHC

São receptores, dentre os quais o NKG2D, que reconhecem proteínas de superfície celular estruturalmente relacionadas com o MHC I, sendo a maioria destes ligantes não codificados por genes situados no complexo MHC e não possuem estruturas de ligação a peptídeos para a apresentação de antígenos às células T.

Receptor **NKG2D**

O receptor NKG2D reconhece glicoproteínas de superfície celular estruturalmente relacionadas ao MHC I. Diferentemente de outros receptores das células NK, o NKG2D é codificado por apenas um gene não polimórfico localizado no cromossomo 12 (12p12.3-p13.2) (HOUCHINS et al., 1991; SHUM et al., 2002) que codifica um receptor essencialmente ativador. Todas as células T CD8+, incluindo células T *naive* presentes no cordão umbilical, constitutivamente

expressam o NKG2D (BAUER et al., 1999). Este receptor liga-se a uma família de proteínas com homologias estruturais às moléculas MHC I, como MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3 e ULBP4 (BAUER et al., 1999; COSMAN et al., 2001; JAN et al., 2003). Destes, apenas os MICA e MICB são codificados por genes localizados no complexo MHC (ligados ao HLA-B) (BAHRAM et al., 1994).

A estimulação de células NK através do NKG2D ativa a citotoxicidade mediada por célula e, em alguns casos, induz a produção e a secreção de citocinas e quimiocinas (LANIER, 2005). Os receptores NKG2D têm sido implicados na imunidade contra vírus e células tumorais.

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

Receptores reconhecendo moléculas MHC de classe I “clássicas” e “não clássicas” codificadas por genes localizados no complexo MHC têm sido identificados, como a família de receptores CD94/NKG2, os Receptores semelhantes à Ig Leucocitários - LILR (do inglês, *leukocyte Ig-like receptors*) e os Receptores semelhantes à Ig das células *Natural Killer* – KIR (do inglês, *Killer-cell Ig-like Receptors*).

Não existem ainda evidências aceitáveis de que células NK reconheçam moléculas MHC de classe II, baseadas em análises de camundongos deficientes de MHC II e em estudos funcionais *in vitro*, usando células alvo humanas e murinas expressando MHC de classe II (LANIER, 2005).

Receptor **CD94/NKG2**

As famílias gênicas NKG2 e CD94 codificam receptores que reconhecem ligantes MHC I “não convencionais” (ex. HLA-E). Estes genes estão situados no complexo NK localizados no cromossomo 12 humano (12p12.3-p13.2). Em humanos um único gene *CD94* está intimamente ligado a quatro genes da família NKG2 (*NKG2A*, *NKG2C*, *NKG2E* e *NKG2F*) (HOUCHINS et al., 1991). Diferente de outros genes codificantes de receptores, os genes *CD94* e *NKG2* possuem pouca variação alélica, o que tem demonstrado não afetar as funções destes receptores (SHUM et
















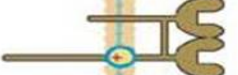

al., 2002). Ambos os genes codificam proteínas transmembrânicas do tipo II, da família semelhante à lectina do tipo C (FIGURA 5). Os receptores CD94/NKG2 são expressos na maioria das células NK e células T TCR⁺ $\gamma\delta$ e em um subgrupo de células T CD8⁺ TCR⁺ $\alpha\beta$ (ARAMBURU et al., 1990; TOYAMA-SORIMACHI et al., 2001). Diferentemente dos receptores KIR, que são estavelmente mantidos uma vez expressos, a expressão dos receptores CD94/NKG2 nas células NK e células T é modulada por citocinas do ambiente. A IL-15 (MINGARI et al., 1998), TGF- β (BERTONE et al., 1999) e IL-12 (DERRE et al., 2002) têm induzido a expressão de CD94/NKG2 nas células T *in vitro*.

Receptor LILR

A família dos genes *LILR* (também conhecidos por LIR, ILT e CD85) está localizado no LRC (Complexo de Receptores Leucocitários, do inglês *Leukocyte Receptor Complex*) no cromossomo 19 (19q13.4), próxima aos genes *KIR*. Dos três genes *LILR*, dois, *LILRB1* (ILT2/LIR1) e *LILB2* (ILT4 LIR2), codificam receptores inibidores que ligam moléculas MHC I (COLONNA et al., 1997; COSMAN et al., 1997). Entretanto, *LILB2* não é expresso em células NK.

O receptor *LILB1* é uma glicoproteína de superfície celular com quatro domínios semelhantes à Ig na região extracelular e quatro ITIMs (Motivo Inibidor baseado em Tirosina) no domínio citoplasmático (FIGURA 5). É variavelmente expresso em células NK do sangue periférico (variando de níveis indetectáveis até 75% das células NK) e em um subgrupo de células T, mas é uniformemente e altamente expresso em células B e monócitos (COLONNA et al., 1997; COSMAN et al., 1997). Esta expressão aumentada do receptor *LILB1* em células B, sugere que este receptor tenha um papel significativo na regulação destes leucócitos, uma vez que as células B não expressam receptores KIR e nem CD94/NKG2 (LANIER, 2005).

FIGURA 5. RECEPTORES DAS CÉLULAS NK COM LIGANTES MHC I

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





 **Domínio lectina-C**
 **Domínio Ig**
 **ITIM**
 **K/R**

Figura 5. Representação gráfica dos receptores de célula NK para ligantes MHC de classe I. Receptores Inibidores: KIRs inibidores (ex. KIR2DL e KIR3DL), LILB1 e CD94/NKG2A contendo ITIMs (motivos inibidores baseados em tirosina) em seus domínios citoplasmáticos. Receptores Ativadores: Proteínas CD94/NKG2C e algumas moléculas KIR faltando os ITIMs em sua cauda, possuindo um resíduo carregado em seus domínios transmembrana, resíduos estes de ligação com proteínas adaptadoras (DAP12) com ITAMs (motivos de ativação baseado em tirosina) (ex. KIR2DS e KIR3DS). O KIR2DL4 é uma exceção, possui o domínio citoplasmático com ITIM e está associado com uma proteína adaptadora. E ligantes MHC de classe I. O símbolo ? significa ligante desconhecido ou duvidoso. FONTE: LANIER, L.L. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 225-274; 2005.

2.4. Receptor **KIR**

2.4.1. ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS KIR

Os receptores semelhantes à Ig das células *Natural Killer* (KIR – *killer cell immunoglobulin-like receptor*) são membros de um grupo de moléculas reguladoras encontradas na superfície das células NK. Os KIRs foram primeiramente identificados por sua habilidade de conferir alguma especificidade na citólise mediada por células NK (HAREL-BELLAN et al., 1986; MORETTA et al., 1990). Esta especificidade se dá através da interação de isotipos de moléculas KIR com moléculas HLA de classe I. Essa interação protege células saudáveis da destruição espontânea causada pela citólise mediada por células NK. Entretanto, outros isotipos KIR podem estimular esta atividade (CARRINGTON & NORMAN, 2003). Análises de clones NK revelaram que células clones expressam diferentes grupos de KIRs inibidores ou ativadores, entretanto cada clone expressa pelo menos um receptor inibidor (MINGARI et al., 1995; MORETTA et al., 2003; VIVIER & ANFOSSI, 2004).

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

FIGURA 6. RECEPTORES KIR ATIVADORES E INIBIDORES DAS CÉLULAS NK

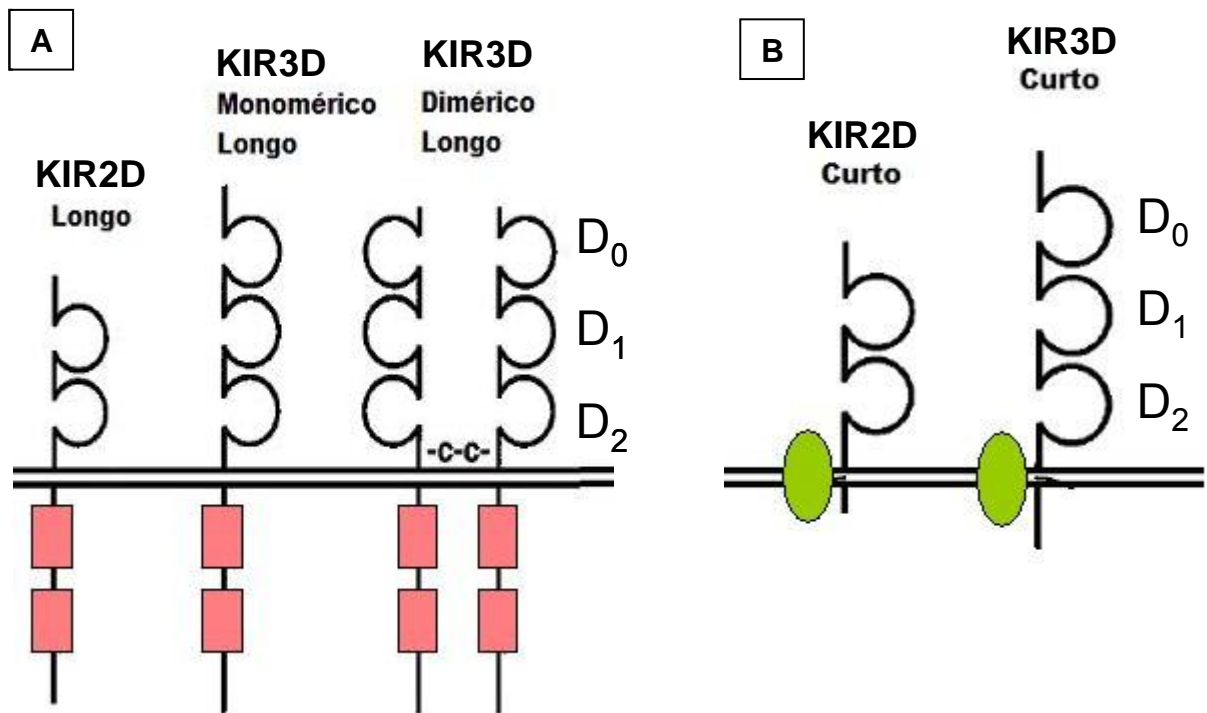


Figura 6. Todos os receptores KIR são membros da superfamília das imunoglobulinas, e podem conter dois ou três domínios Ig na região extracelular. A) Receptores KIR inibidores, todos os membros da família apresentam seqüências de aminoácidos inibidoras da ativação celular (ITIM) (em vermelho) na cauda citoplasmática. B) Os receptores KIR ativadores não apresentam domínios inibitórios ITIM, porém apresentam aminoácidos carregados no domínio transmembrana. A cor verde representa a proteína adaptadora (DAP-12) que possui os ITAMs dos receptores ativadores KIRs. A letra D seguida dos números 0, 1 e 2 indicam os domínios extracelulares semelhantes à Ig.

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

FIGURA 7. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS RECEPTORES KIR (ATIVADORES E INIBIDORES) DAS CÉLULAS NK

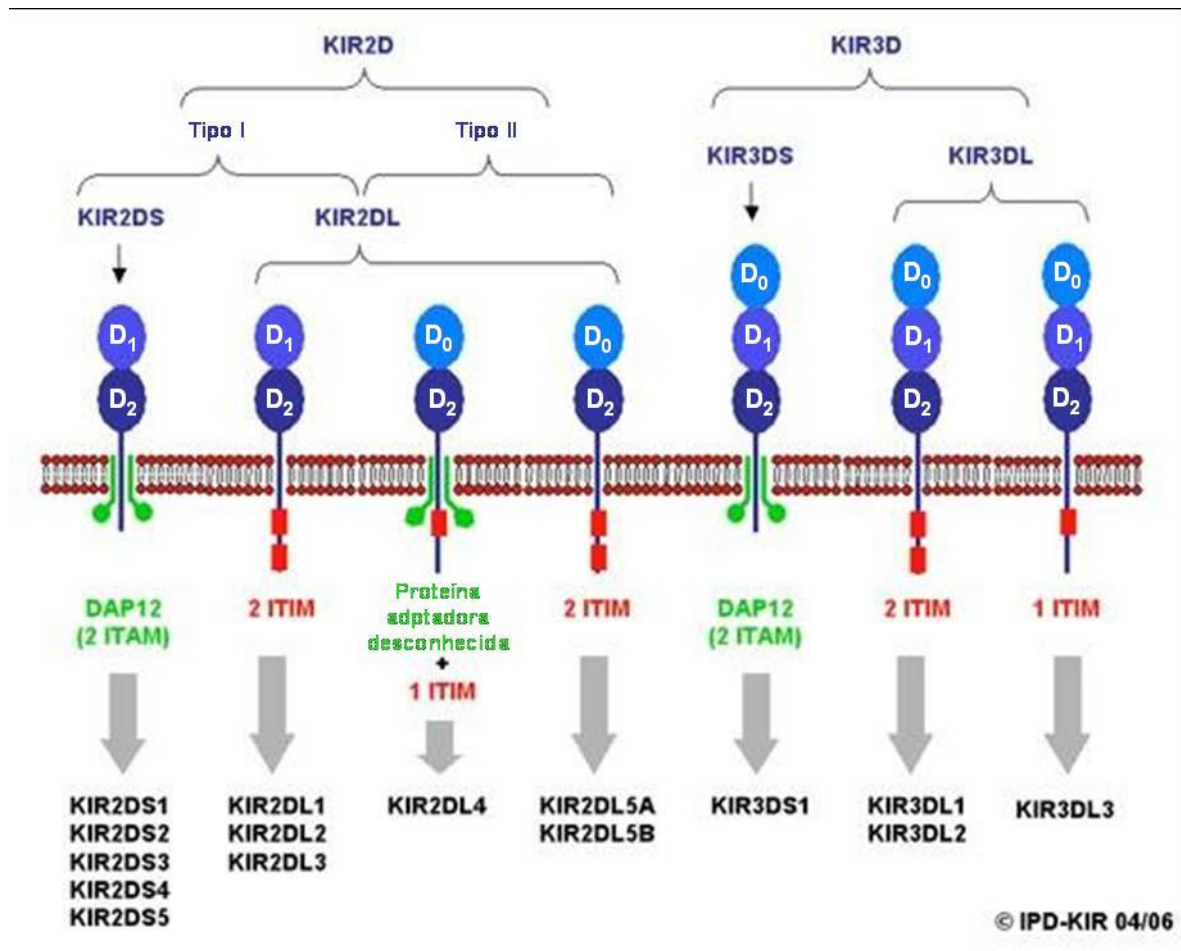


Figura 7. Estrutura das proteínas KIR. Características estruturais das proteínas KIR com 2 (KIR2D) ou 3 (KIR3D) domínios extracelulares semelhantes à Ig. A associação dos KIRs ativadores com as proteínas adaptadoras é mostrado em verde, enquanto que os ITIMs dos receptores inibidores são mostrados em vermelho. A letra D seguida dos números 0, 1 e 2 indicam os domínios extracelulares semelhantes à Ig.

FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: julho de 2006

As moléculas com cauda citoplasmática curta possuem uma alteração em um resíduo de aminoácido (lisina) localizado na região transmembrânica. Esta alteração, causada por mutações que afetam os receptores inibidores, pode ser suficiente para introduzir um outro aminoácido com polaridade diferente que resulte em versões ativadoras capazes de ligar o peptídeo de sinalização DAP12 (Proteína de Ativação de 12 kD DNAX - *DNAX activation protein of 12 kD*). Estas proteínas também conhecidas por KARAP (Proteína Associada ao Receptor Ativador de Células NK - *Killer Cell Activating Receptor Associated Protein*), uma molécula sinalizadora capaz de gerar um sinal ativador. Isto facilita a interação desta molécula DAP-12 com a

proteína KIR, além da concomitante perda dos motivos ITIMs (CARRINGTON & NORMAN, 2003; MORETTA & MORETTA, 2004). Essas moléculas adaptadoras possuem os ITAMs (Imunoreceptores com Motivos Ativadores baseados em Tirosina) (FIGURA 5) (CARRINGTON & NORMAN, 2003). A especificidade desta estimulação pelos KIRs é pouco definida e pode também incluir ligantes não HLA de classe I (MORETTA & MORETTA, 2004). A molécula KIR2DL4 contém seqüências de ambos receptores ativadores e inibidores (CARRINGTON & NORMAN, 2003).

As proteínas com dois domínios semelhantes à Ig (KIR2D), podem ser classificadas em dois grupos distintos conforme os domínios (D_0 , D_1 e D_2) que elas apresentam. Por exemplo, proteínas KIR2D Tipo I (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4 e KIR2DS5) exibem os domínios D_1 e D_2 , enquanto que os receptores KIR2D Tipo II (KIR2DL4 e KIR2DL5) não possuem o domínio D_1 e sim o domínio D_2 (FIGURA 5).

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

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

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

As moléculas KIR2D são formadas por dois domínios N-terminais em tandem (D_1 e D_2), unidos por um conector de 3 a 5 aminoácidos (FIGURA 8). Cada domínio é constituído por duas folhas β antiparalelas. A angulação entre estes dois domínios varia de 60 a 80 graus de acordo com a variação dos resíduos na interface D_1 - D_2 , nos diferentes receptores KIR2D (DENG & MARIUZZA, 2006).

FIGURA 8. Estrutura da região extracelular da molécula KIR2D.

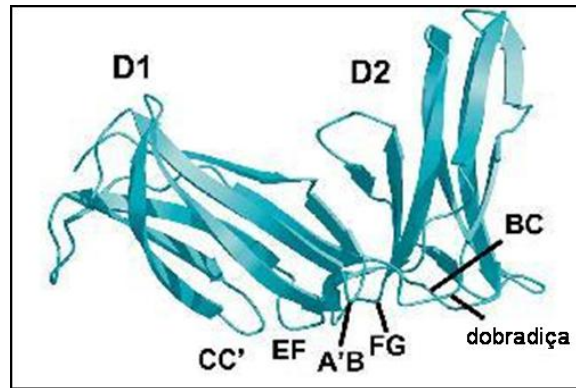


Figura 8. Estrutura dos domínios extracelulares D₁ e D₂ de um receptor KIR2D. CC', EF, A'B, FG e BC = "loops" que interagem com a molécula HLA.

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

2.4.2.1. Estrutura dos complexos KIR2D/HLA-Cw

As moléculas HLA-Cw (pertencentes ao MHC de classe I) são os principais ligantes dos receptores KIR. Estas proteínas ligam-se a 3 receptores KIR inibidores (dos receptores com ligantes conhecidos até o momento) e a 2 receptores ativadores. As relações entre as moléculas HLA-Cw e os receptores KIR inibidores e ativadores são apresentadas na tabela 3.

TABELA 3. RECEPTORES KIR E SEUS LIGANTES HLA-Cw

Epítomos HLA-Cw	Receptores KIR			
	INIBIDORES	ATIVADORES		
ASN77 e LYS80	Cw4	Grupo 1 (G1)	2DL1	2DS1
	Cw2			
	Cw5			
	Cw6			
SER77 e ASN80	Cw3	Grupo 2 (G2)	2DL2	2DS2
	Cw1			
	Cw7		2DL3	
	Cw8			

Tabela 3. Relações entre receptores KIR e seus ligantes HLA-Cw. Os epítomos HLA-Cw estão reunidos em dois grupos distintos: Grupo 1 ou G1= a molécula HLA-Cw possui o aminoácido lisina na posição 80 (LYS-80) e Grupo 2 ou G2= onde a molécula possui o aminoácido asparagina na mesma posição (ASN-80).

Se os indivíduos forem molecularmente tipados para o locus *HLA-Cw*, faz-se necessária a conversão destes dados moleculares em dados sorológicos onde se pode prever a estrutura da proteína, a fim de se estabelecer a qual grupo (G1 ou G2) o indivíduo é pertencente. Tais conversões podem ser estabelecidas a partir da tabela 4.

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

HLA-Cw	
Molecular (DNA)	Sorologia (Proteína)
Cw*01	Cw1
Cw*02	Cw2
Cw*03	Cw9(w3), Cw10(w3)
Cw*04	Cw4
Cw*05	Cw5
Cw*06	Cw6
Cw*07	Cw7
Cw*08	Cw8
Cw*12	indef
Cw*14	Cw1/indef
Cw*15	indef
Cw*16	indef
Cw*17	Cw7/indef
Cw*18	Cw6/indef

Tabela 4. Nem todos os dados moleculares possuem dados sorológicos, sendo assim identificados por “indef”.

A interação entre as duas moléculas ocorre via: domínios α_1 e α_2 das proteínas HLA de classe I; porções C-terminais do peptídeo ligado a fenda desta última molécula, além dos domínios D_1 e D_2 do receptor KIR2D (FIGURA 9). No complexo formado KIR2D-HLA de classe I, o eixo dos domínios D_1 - D_2 da molécula KIR é aproximadamente ortogonal ao eixo do peptídeo ligado ao sulco formado pelas hélices α_1 e α_2 do HLA, alinhando assim o domínio D_1 com a hélice α_1 e o D_2 com a α_2 . Os KIR fazem contato com seus ligantes através de “*loops*” em sua região inter domínios (FIGURA 8).

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

FIGURA 9. INTERAÇÃO MOLECULAR ENTRE AS PROTEÍNAS KIR2D E HLA DE CLASSE I ESPECÍFICOS

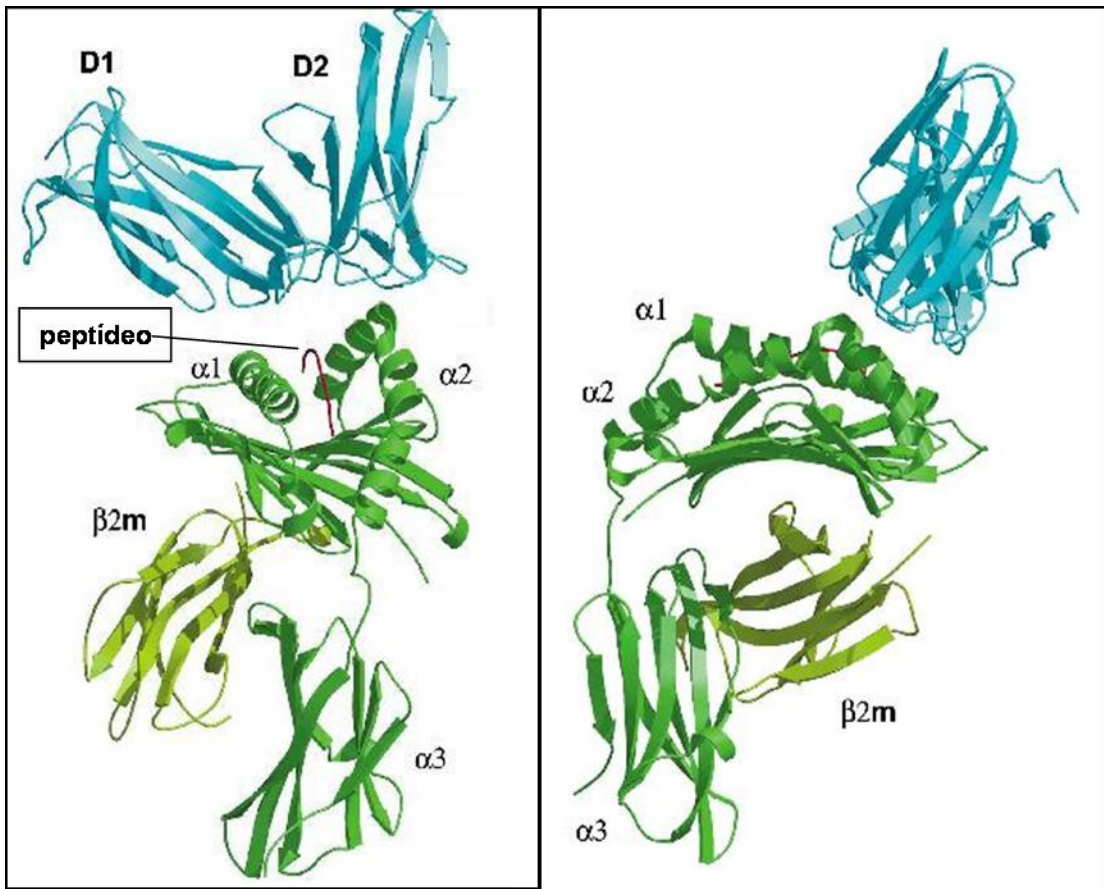


Figura 9. Interação molecular entre receptores KIR2D e moléculas HLA-C Azul = estrutura dos domínios semelhantes à Ig (D_1 e D_2) da molécula KIR; verde = estrutura da molécula HLA de classe I (domínios α_1 , α_2 e α_3 , além da β_2 -microglobulina); vermelho = peptídeo na fenda da molécula HLA. FONTE: Modificado de BOYINGTON, J.C.; MOTYKA, S.A.; SCHUCK, P.; BROOKS, A.G.; SUN, P.D. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature* 405: 537-543; 2000.

TABELA 5. CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DOS RECEPTORES KIR

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

Tabela 5. * ITIM (motivos inibidores baseados em tirosina); aác = aminoácidos.

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

2.4.3. GENES *KIR*

Os genes *KIR* localizam-se no braço longo do cromossomo 19 humano (19q13.4), dentro de um complexo gênico de 1Mb denominado de *LRC* (Complexo de Receptores Leucocitários - *Leukocyte Receptor Complex*) (FIGURA 10). Os genes *LRC* conhecidos podem ser agrupados baseando-se na sua organização, filogenia e estrutura, em quatro famílias multi-gênicas. Estas são: Família 1 - Receptores Leucocitários semelhantes à Ig, *LILRs* (*leukocyte Ig-like receptors*) e Transcritos semelhantes à Ig, *ILTs* (*Ig-like transcripts*); Família 2 - Receptores semelhantes à Ig das células *Natural Killer*, *KIRs* (*Killer-cell Ig-like Receptors*), Glicoproteína VI Receptor de colágeno de plaquetas, *GPVI* (*platelet collagen receptor glycoprotein VI*); Família 3 - um grupo representado pelos receptores de IgA Fc, *FCAR*, e *NKp46*; e Família 4 - Receptores semelhantes à Ig Associados a Leucócitos, *LAIRs* (*Leukocyte-associated Ig-like Receptors*) (MARTIN et al., 2002). O *LRC* contém genes que expressam uma seleção de 30 receptores semelhantes à Ig, dependendo do haplótipo analisado. Os novos genes *LRC*, denominados de *LENGs* (*LRC - Encoded Novel Genes*), codificados na extremidade centromérica do complexo, não estão estruturalmente relacionados ao Receptores semelhantes à Ig. Estes incluem o *LENG5*, que expressa a subunidade SEN34 de uma endonuclease de recomposição de transferência de RNA e *LENG7* que expressa um fator de alongamento 1 (VALES-GOMEZ et al., 1998).

O complexo *LRC* mostra uma similaridade evolutiva e estrutural ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex – MHC*) situado no cromossomo 6 humano, o qual contém os locos gênicos *HLA* (*Human Leukocyte Antigen*, Antígenos Leucocitários Humanos) de classe I e II que codificam e expressam moléculas de superfície celular envolvidas na regulação da imunidade celular (SHIMIZU & DEMARS, 1989). Alguns produtos do *MHC* de classe I são ligantes alvo de alguns membros da Família dos Receptores semelhantes à Ig (MARTIN et al., 2004), como, por exemplo, as moléculas expressas pelos genes *KIR*. Embora a maioria dos ligantes dos receptores *LRC* sejam moléculas *HLA* de classe I, uma família estrutural relacionada de genes (compreendendo *FCAR*,

NKp46 e *GPVI*), na extremidade telomérica do *LRC*, expressa receptores que interagem com ligantes não *HLA* (MARTIN et al., 2003).

FIGURA 10. REGIÃO CROMOSSÔMICA DO LRC E DOS KIR

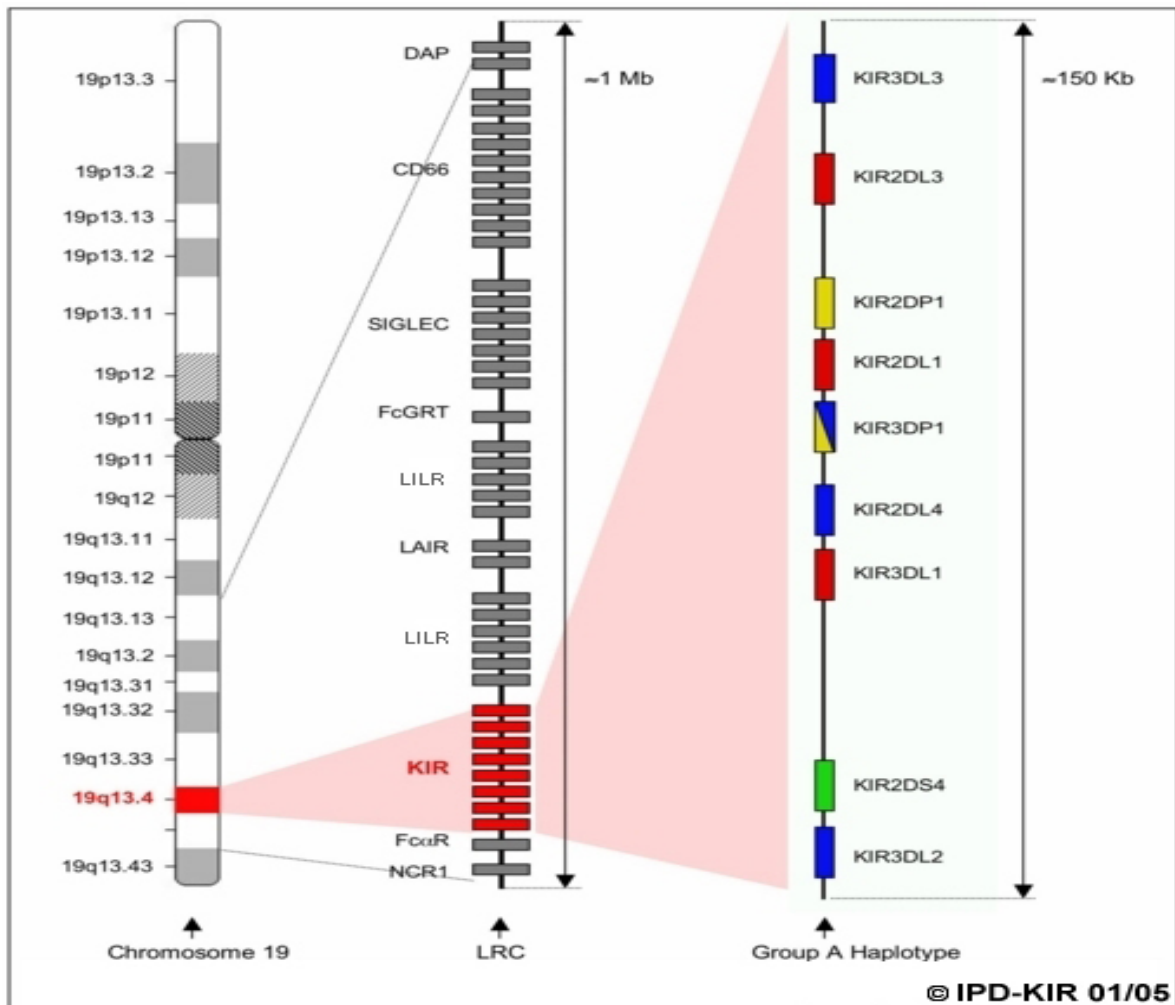


Figura 10. Localização cromossômica do LRC (Complexo do Receptor Leucocitário) destacando os genes *KIR* que se situam no cromossomo 19 (19q13.4). Dentro do LRC, encontram-se várias famílias gênicas, dentre elas estão: os *LILRs* (*leukocyte Ig-like receptors*); os *ILTs* (*Ig-like transcripts*); os *KIRs* (*Killer-cell Ig-like Receptors*); os *GPVI* (*platelet collagen receptor glycoprotein VI*); os receptores de IgA Fc, FCAR e NKp46; além dos *LAIRs* (*Leukocyte-associated Ig-like Receptors*).

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

Os genes *KIR* variam em comprimento de 4 a 16Kb (seqüência genômica completa) e podem conter de 4 a 9 exons. São classificados como pertencentes a um de 3 grupos de acordo com suas características estruturais:

1) Genes *KIR2D* Tipo I;

Codificam proteínas com 2 domínios extracelulares com uma conformação D₁ e D₂.

2) Genes *KIR2D* Tipo II;

Codificam proteínas com 2 domínios extracelulares com uma conformação D₀ e D₂.

3) Genes *KIR3D*;

Codificam proteínas com 3 domínios extracelulares (D₀, D₁ e D₂).

1) Genes *KIR2D* Tipo I

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

2) Genes *KIR2D* Tipo II

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

3) Genes *KIR3D*

Estes genes possuem os 9 exons e incluem os genes estruturalmente relacionados *KIR3DS1*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* e *KIR3DL3*. Dentro deste grupo os 4 genes diferem no comprimento de sua região codificante da cauda citoplasmática no exon 9 (COLONNA & SAMARIDIS, 1985; DOHRING, et al., 1996; TORKAR, et al., 1998). Este comprimento da cauda citoplasmática pode variar de 23 resíduos de aminoácido (codificados por alguns alelos do gene *KIR3DS1*) até 116 resíduos

(codificados por alelos do gene *KIR2DL4*). O gene *KIR3DS1* difere dos genes *KIR3DL1* e *KIR3DL2* apresentar uma seqüência mais curta do exon 8. Já o *KIR3DP1* difere dos demais por não possuir o exon 6. A mais notável característica de um gene *KIR* se refere ao gene *KIR3DP1*, cujo segmento gênico do exon 6 ao 9 foi deletado, e ocasionalmente também o exon 2 (VILCHES, et al., 2000C).

2.4.3.1. NOMENCLATURA DOS GENES *KIR*

O subcomitê do *Human Genome Organization* (HUGO), denominado de Comitê de Nomenclatura para Fatores do Sistema *HLA* (WHO - *World Health Organization Nomenclature Committee*) foi designado para nomear os genes *KIR* e seus alelos (MARSH et al., 2003). A denominação do sistema gênico *KIR* leva em consideração a estrutura da proteína *KIR* e consiste de quatro grupos principais, divididos com base em duas características: número de domínios Ig extracelulares (2D ou 3D) e características da cauda citoplasmática da proteína *KIR*. Existe ainda um outro tipo de nomenclatura adotada na literatura, mas tal não se baseia na estrutura, função ou localização da proteína (HSU et al., 2002A). Esta é denominada de *CD* e se baseia na ordem de proximidade centrômero-telomérica dos genes localizados no cromossomo 19.

Com base na nomenclatura apresentada pela HUGO, os genes que codificam proteínas com dois domínios extracelulares são representados por *KIR2D*. Enquanto que aqueles que têm como produto uma proteína com 3 domínios são *KIR3D*. Este sistema de nomenclatura separa ainda os *KIR2D* e *KIR3D* em dois grupos, considerando-se o tipo de cauda citoplasmática apresentada pela proteína. As moléculas *KIR* com cauda citoplasmática longa possuem na denominação, junto ao seu número de domínios extracelulares, a letra “L” (do inglês *Long*) indicando assim que a cauda citoplasmática é longa. Por exemplo, os genes *KIR2DL* ou *KIR3DL*. As moléculas que possuem a cauda citoplasmática curta são codificadas por genes designados pela letra “S” (do inglês *Short*), no caso *KIR2DS* e *KIR3DS* (OLCESE et al., 1997; LANIER et al., 1998). Os pseudogenes *KIR* são identificados pela letra “P” logo após o dígito correspondente ao tipo de domínio, como, por exemplo, nos

pseudogenes *KIR2DP* ou *KIR3DP*. Após a nomeação destas 2 características, o dígito final é correspondente aos diferentes locos (FIGURA 11). Quando dois ou mais genes *KIRs* possuem seqüências e expressam estruturas protéicas muito similares (entretanto não idênticas), a eles é dado o mesmo número, contudo são distintos por uma letra final, por exemplo os genes *KIR2DL5A* e *KIR2DL5B* (MORETTA & MORETTA, 2004).

FIGURA 11. NOMENCLATURA DOS GENES *KIR*



Figura 11. Nomenclatura adotada pelo HUGO (*Human Genome Organization*).

FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: julho de 2006

A maioria dos genes *KIR* apresenta variação alélica e esta diversidade tem sido nomeada com base na nomenclatura adotada para os locos *HLA* (SHILLING et al., 2002; GARDINER et al., 2001). Assim, os três primeiros dígitos, após a designação do loco, distinguem alelos onde diferenças nas seqüências de éxons conferem mudanças não sinônimas. Os dois próximos dígitos indicam alelos que se distinguem por diferenças na seqüência de éxons e que difiram em um íntron, promotor ou outra região não codificante (MORETTA & MORETTA, 2004). No primeiro relatório do Comitê de Nomenclatura, 87 alelos foram nomeados (SIVORI et al., 1997). Subseqüentemente, 18 alelos foram adicionados em 2003, mais dois em 2004 e um alelo foi excluído (MORETTA & MORETTA, 2004).

2.4.3.2. ESTRUTURA GÊNICA E VARIABILIDADE ALÉLICA

O conjunto de genes *KIR* localiza-se no cromossomo 19, ocupando cerca de 150kb de um complexo gênico denominado *LRC*. Vários genes *KIR* seguem um arranjo básico quanto à organização de sua estrutura exon-intron: os exons 1 e 2 codificam a seqüência líder da proteína *KIR*; cada um dos domínios Ig (os domínios D_0 , D_1 e D_2) corresponde a um único exon (exons 3, 4 e 5, respectivamente). Apenas um exon é responsável pela região de ligação e um pela porção transmembrânica (exon 6 e 7, respectivamente), sendo o domínio citoplasmático codificado pelos dois exons finais (8 e 9) (FIGURA 8) (WILSON et al., 1997, 2000; TROWSDALE et al., 2001).

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

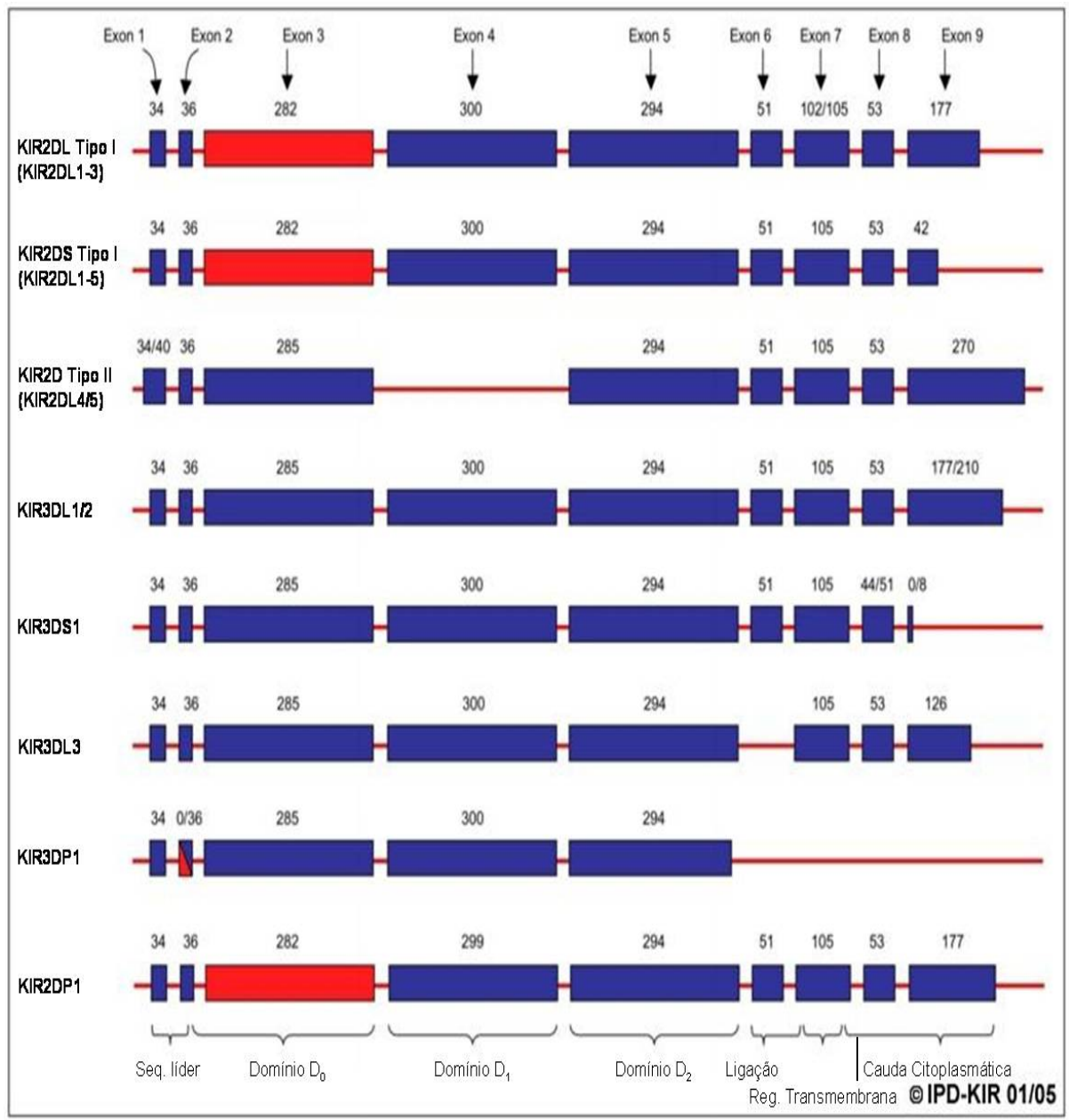
FIGURA 12. ESTRUTURA GÊNICA DOS *KIR*

Figura 12. Estrutura dos genes *KIR*. Os genes *KIR* que compartilham uma organização estrutural similar estão aqui agrupados, enquanto os demais genes *KIR* com peculiaridades estruturais são mostrados por si só. As regiões codificantes estão representadas como caixas azuis e as nem sempre codificantes estão representadas em vermelho, seu tamanho em pares de bases (pb) está mostrado acima das caixas. O exon 3 não expresso e o exon 2 deletado do gene *KIR3DP1* são mostrados em vermelho. As chaves na porção final do diagrama representam a maneira que os exons codificam para cada domínio e região da proteína.

FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: julho de 2006

O produto dos genes *KIR2D* tipo 1 conseqüentemente perde o domínio D₀ (VILCHES et al., 2000C). Os *KIR2Ds* tipo 2 incluem *2DL4*, *2DL5A* e *2DL5B* (VILCHES & PARHAM, 2002), que se caracterizam pela ausência completa do exon 4 (SELVAKUMAR et al., 1997A), o que conseqüentemente causa a perda do domínio D₁ no produto protéico. Os genes *KIR3D* possuem toda a estrutura dos exons intacta, com exceção dos *3DL3* que não possuem o exon 6. (CARRINGTON & NORMAN, 2003).

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

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

A maioria dos genes *KIR* contém sítios variáveis, enquanto que o restante mostra pouca variação (SELVAKUMAR et al., 1997; WITT et al., 2000; GARDINER et al., 2001; SHILLING et al., 2002). Um fator significativo que contribui para esta diversidade da região genômica *KIR* é o polimorfismo alélico (VALIANTE et al., 1997; SHILLING et al., 2002) gerado por mutações de ponto e recombinação homóloga (VALIANTE et al., 1997; SHILLING et al., 2002). Tais polimorfismos alélicos têm sido identificados para todos os genes *KIR* (HSU et al., 2002A). Esta variação pode ocorrer dentro de seqüências codificadoras responsáveis pela interação dos receptores KIR com as moléculas HLA de classe I, poderia interferir em tal interação

(FAN et al., 1997, 2001; BOYINGTON et al., 2000; BOYINGTON & SUN, 2002). Nos genes *KIR*, variações nas seqüências nucleotídicas têm sido observadas em toda a extensão do gene, diferentemente da variação observada para os genes *HLA* de classe I e II, que é primariamente restrita a um ou dois éxons (HUGHES, 2002). O histórico de permutas desiguais e a similaridade de seqüências entre os *KIRs* têm dificultado a distinção de alelos de um mesmo loco e de locos diferentes (CARRINGTON & NORMAN, 2003).

2.2.4.3.3. ORGANIZAÇÃO GÊNICA E DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA

Os genes *KIR* estão organizados dentro do complexo LRC em haplótipos, os quais têm mostrado uma extensa variação no número e no tipo de genes *KIR* presentes. A ordem dos genes *KIR* determina dois haplótipos distintos. (FIGURA 13). Os genes estão organizados de forma “cabeça-a-cauda” (do inglês *head-to-tail*), e cada gene ocupa de 10 a 16kb de comprimento, com uma seqüência intermediária de aproximadamente 2kb separando cada par de genes, exceto por uma seqüência única de 14kb anterior ao *KIR2DL4*. Todos os haplótipos *KIR* conhecidos estão flanqueados em sua extremidade centromérica pelo loco *KIR3DL3* e em sua extremidade telomérica pelo *KIR3DL2*, além de dois locos centrais, os *KIR3DP1* e *KIR2DL4*. Estes genes presentes virtualmente em todos os haplótipos são denominados “genes de moldura do haplótipo” (do inglês, *frameworks*) (VILCHES, et al., 2000B, 2002; WILSON et al., 2000; TROWSDALE, et al., 2001). A variação haplotípica encontrada no complexo *KIR* é devido a variação no número de genes que compõem o haplótipo bem como pelo polimorfismo alélico em vários desses genes (SELVAKUMAR et al., 1997; UHRBERG et al., 1997; SHILLING et al., 2002). A investigação dos haplótipos *KIR* sugere uma história de duplicação gênica e permuta desigual nesta região (CARRINGTON & NORMAN, 2003). Com exceção dos *KIR* de “moldura”, o conteúdo gênico dos genes *KIR* dentro dos haplótipos varia de indivíduo para indivíduo, de tal modo que um haplótipo pode exibir menos de 8 ou mais de 14 genes e pseudogenes *KIR*, dependendo da presença ou ausência dos locos ativadores (UHRBERG et al., 1997; WITT et al., 1999; WILSON et al., 2000; HSU et al., 2002B).

Com base no conteúdo gênico, os haplótipos têm sido divididos em dois grupos primários, denominados A e B (FIGURA 13), os quais foram originalmente diferenciados usando a técnica PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição) baseado na presença de um fragmento de *HindIII* de aproximadamente 24Kb (UHRBERG et al., 1997). Esse fragmento também está presente nos haplótipos B e mais tarde foi relacionado à presença do gene *KIR2DL5* (UHRBERG, et al., 1997; VILCHES, et al., 2002). A principal distinção entre estes dois haplótipos é o número de genes de receptores ativadores presentes. O haplótipo A tem 7 genes: *KIR2DL1*, *2DL3*, *2DL4*, *2DS4*, *3DL1*, *3DL2* e *3DL3*, contendo apenas um gene ativador (*2DS4*). O gene *KIR2DS4* possui um alelo nulo com uma frequência populacional de cerca de 84% (MAXWEL et al., 2002). Sendo assim, alguns indivíduos podem ser homozigotos para um haplótipo A onde nenhum *KIR* ativador é expresso (HSU et al., 2002B). Enquanto que o haplótipo B possui várias combinações de genes ativadores: *KIR2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS5*, *3DS1* e *2DS4*; além dos demais *KIR2DL4*, *3DL2*, *3DL3* e *3DP1* (CARRINGTON & NORMAN, 2003) (FIGURA 14). As frequências dos haplótipos A e B na população Caucasóide são similares, entretanto em relação ao conteúdo gênico, o haplótipo B possui uma maior variedade de subgrupos. Contudo existe uma ampla variação destes entre diferentes etnias (WITT et al., 1999; NORMAN et al., 2001). O haplótipo A possui uma frequência de 75% em Japoneses e apenas 15% em Aborígenes Australianos (TONEVA et al., 2001; YAWATA et al., 2002).

FIGURA 13. REPRESENTAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS A E B

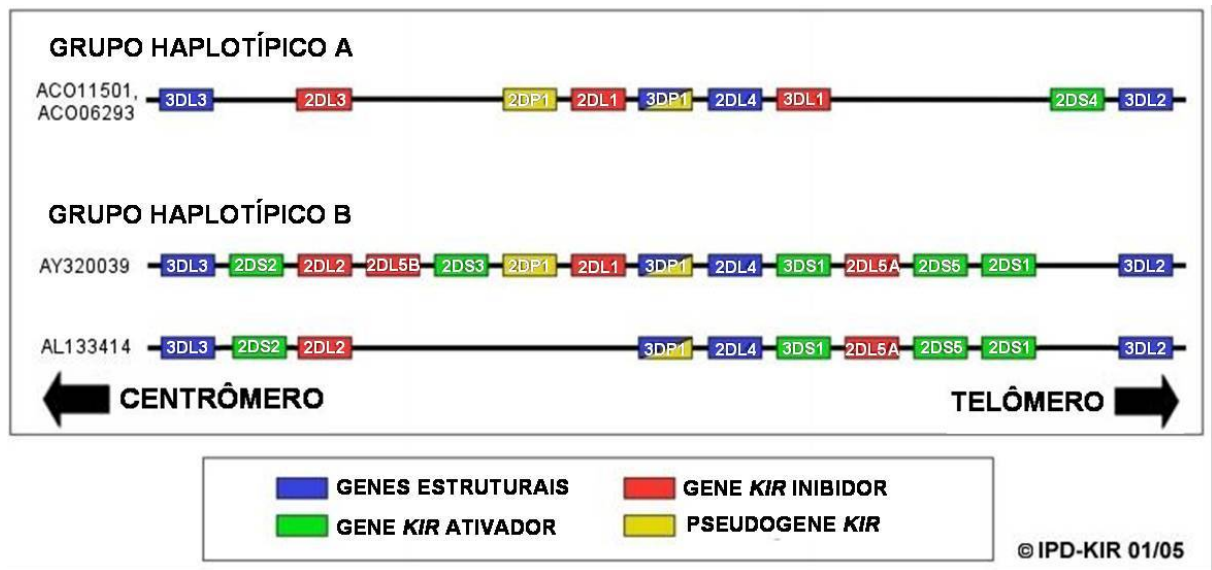


Figura 13. Representação dos haplótipos A e B. Diagrama representando a organização de 3 possíveis Haplótipos KIR. O grupo haplotípico A representa um típico Haplótipo KIR A, enquanto que o grupo B é demonstrado por dois dos possíveis haplótipos B, mostrando que este grupo haplotípico é bastante variável. ACO11501, ACO06293, AY320039 e AL133414 são os códigos de entrada dos dados seqüenciados no banco de dados do GenBank. Esta representação não está em escala.

FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: julho de 2006

O aumento e a diminuição da região do *KIR* parece ter ocorrido devido em parte a permutas desiguais e duplicações gênicas. Uma consequência destes eventos moleculares é a possível geração de haplótipos *KIR* que contenham duas (ou mais) cópias de um mesmo gene em um único haplótipo e o rearranjo da ordem dos genes (CARRINGTON & NORMAN, 2003).

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

FIGURA 14. DIVERSIDADE DO GRUPO HAPLOTÍPICO B

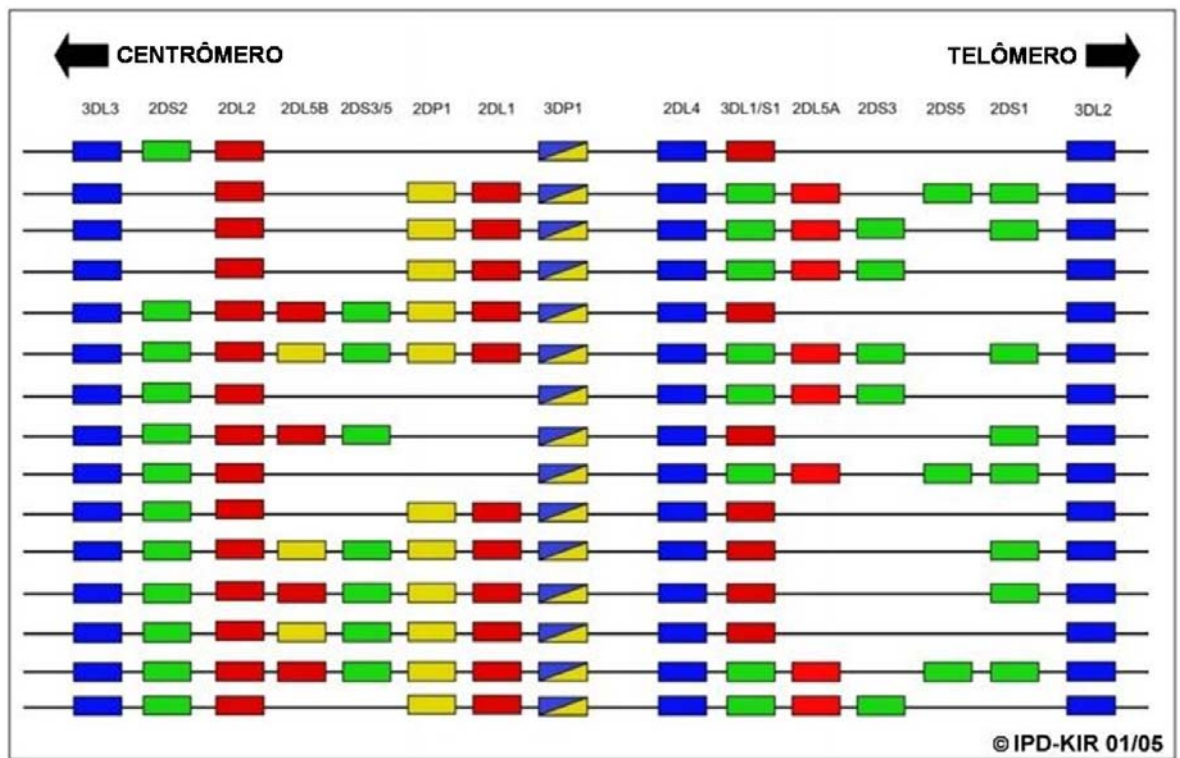


Figura 14. A diversidade do grupo B aqui apresentada foi identificada por dois estudos separados que envolveram a análise de segregação familiar, seqüenciamento genômico e análises de ordem gênica (SHILLING, et al., 2002; HSU, et al., 2002). As caixas azuis indicam os genes de “moldura”, as vermelhas os genes correspondentes a receptores inibidores enquanto que as verdes, os genes de proteínas ativadoras. As caixas amarelas representam os pseudogenes. O gráfico não está em escala.

FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: julho de 2006

2.4.3.4. CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA

O fator que contribui para o repertório diversificado de células NK com diferentes grupos de moléculas KIR é a expressão e a manutenção de um grupo único de moléculas KIR para cada célula NK. Embora exista essa diversificação entre os genes *KIR*, suas regiões reguladoras são bastante conservadas. A explicação de mecanismos reguladores que esclareçam a expressão diferencial dos KIRs ainda é limitada. Mecanismos epigenéticos têm sido especulados para o estabelecimento e a manutenção de diferentes padrões de expressão. Um mecanismo importante encontrado na regulação de genes é a metilação de citosinas dentro de dinucleotídeos CpG (ilhas CpG). Essa modificação está associada à inibição da transcrição. A metilação do DNA é mantida durante as divisões celulares

seguintes, o que fornece a capacidade de diversificar a expressão gênica de células individuais e transmiti-lá para sua progênie (MORETTA & MORETTA, 2004). Santourlidis e colaboradores (2002) identificaram uma ilha CpG anterior à região dos genes *KIR*, a qual possui estrutura similar em todos os genes *KIR* expressos, com exceção do *KIR2DL4* onde a densidade de dinucleotídeos CpG é baixa. As ilhas CpG altamente metiladas correspondem a *KIRs* não expressos, pois os genes que são expressos não são metilados. Esta correlação foi observada (SANTAOURLIDIS et al., 2002) em linhagens celulares NK e em células NK recentemente isoladas. Estudos confirmam que a manutenção da expressão clonalmente restrita para genes *KIR* altamente homólogos e alelos é feita por metilação nas células NK. Foi também demonstrado que em clones de NK, somente um alelo é expresso e sugere-se que seja o resultado da demetilação monoalélica, indicando assim, que os genes *KIR* são regulados independentemente. Os clones de NK mostraram claramente uma expressão dos genes *KIR* clonalmente restrita, mesmo após extensiva cultura e expansão clonal (CHAN et al., 2003).

2.4.3.5. EVOLUÇÃO

Estudos em roedores identificaram genes que expressam receptores de superfície celular denominados *Ly49*, com especificidade a moléculas MHC de classe I (LIAO et al., 1991; DANIELS et al., 1992; KARLHOFER et al., 1992; CORREA & RAULET, 1995). Subseqüentemente, vários grupos de pesquisadores identificaram os genes humanos *KIRs* que mostraram especificidade a moléculas ligantes *HLA* de classe I (COLONNA et al., 1993; D'ANDREA et al., 1995; WAGTMANN et al., 1995). Ambos *KIR* e *Ly49* são clonalmente expressos em diferentes células NK (MORETTA & MORETTA, 2004). Atualmente, os complexos gênicos *KIR* em humanos e *Ly49* em roedores são vistos como análogos funcionais, ou seja, possuem a mesma função, mas diferem quanto a sua estrutura e origem (WILSON et al., 2000; BARTEN et al., 2001; TROWSDALE, 2001; MAKRIGIANNIS et al., 2002). A existência de moléculas diferentes com funções similares em espécies distintas é um interessante exemplo de evolução convergente (MORETTA

& MORETTA, 2004). Ambos os genes (*KIR* e *Ly49*) codificam proteínas agrupadas em famílias protéicas estruturalmente distintas. Os genes *KIR* codificam e expressam moléculas relacionadas à Ig, enquanto que os genes *Ly49* expressam proteínas relacionadas à lectina tipo-C. No entanto, tais famílias gênicas compartilham algumas características, uma das quais é a expressão de receptores inibidores com especificidade a moléculas ligantes MHC de classe I. Outra característica comum entre os *KIR* e *Ly49*, é conter pares de receptores ativadores e inibidores que mostram uma alta homologia de seqüências em seus domínios extracelulares (LANIER, 1998; LONG, 1999; RAULET et al., 2001). A evolução dos genes *KIR* na linhagem humana tem se dado provavelmente a partir de uma espécie ancestral contendo genes *Ly49*, pois um único pseudogene *Ly49* ainda é observado dentro do Complexo *Natural Killer* (*NKC*) no cromossomo 12 humano (WESTGAARD et al., 1998; BARTEN et al., 1999). A região sintênica *NKC* nos ratos localiza-se no cromossomo 6, a qual contém também genes codificantes de outros receptores lectina tipo-C expressos em células NK tais como CD94 e NKG2A, em adição aos múltiplos genes *Ly49*. Como o *NKC*, o *LRC* tem uma região homóloga e sintênica definida em ratos, localizada no cromossomo 7. Embora existam muitas similaridades entre o *LRC* humano e o *LRC* de ratos, nenhum homólogo dos genes *KIR* humanos foi encontrado em ratos (HSU et al., 2002A). Esta ausência de genes *KIR* em roedores, junto com uma notável diversidade gênica e alélica em haplótipos *KIR* humanos, sugere uma rápida e recente evolução da família de genes *KIR*, o que induz à idéia de que estes tenham se desenvolvido apenas a partir dos primatas (MORETTA & MORETTA, 2004). Contudo, evidências de um gene funcional *Ly49* inibidor e múltiplos genes *KIR* no genoma de bovinos apóiam o modelo de que o gene *Ly49* ancestral antecedeu a divergência dos mamíferos placentários e que o ancestral *KIR* antecedeu a irradiação dos primatas (KHAKOO et al., 2000). Existe um número variável de genes contidos no haplótipo *KIR* humano, que pode ser resultado de uma extensiva duplicação gênica e permutas desiguais, facilitadas por alta similaridade de seqüências, organização de modo "cabeça-à-cauda" e proximidade dos genes (MARTIN et al., 2003). Estima-se que estes eventos de duplicação gênica que conduziram à geração da região genômica dos *KIRs* ocorreram há 30-45 milhões de anos (VILCHES & PARHAM, 2002). Alguns pesquisadores supõem que a diversificação instantânea apresentada pelo grupo

haplotípico B do *KIR*, é resultado da seleção mediada por patógenos (UHRBERG et al., 1997; ZAMBELLO et al., 2003).

2.4.3.6. GENES *KIR* E TRANSPLANTE

As células NK fazem parte da imunidade inata, formando assim, uma primeira linha de defesa contra antígenos estranhos. Em contraste às células T que são restritas pelo alotipo MHC, as células NK podem responder à ausência do MHC próprio intitulada de hipótese do "*Missing-Self*". Os antígenos MHC de classe I estão presentes em todas as células nucleadas e são compostas de uma cadeia pesada de 45 kD codificada pelos genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-Cw*, situados no MHC, no cromossomo 6. Essa cadeia pesada associa-se não covalentemente com um polipeptídeo de 12 kD, a β_2 -microglobulina codificada por um gene localizado no cromossomo 15 (KLEIN & SATO, 2000). A atividade das NK é provavelmente o resultado de um balanço entre receptores de superfície ativadores e inibidores, as moléculas *KIR* (LANIER, 2001), e a interação destes com moléculas HLA de classe I. Os receptores *KIR*, o grupo de moléculas receptoras melhor caracterizado das NK, são isotipo específicos. Assim, aloenxertos com moléculas HLA de classe I *KIR*-Ligante incompatíveis podem ser potencialmente reconhecidos e mortos. A incompatibilidade *KIR*-Ligante foi definida como a ausência de grupos alélicos HLA de classe I no tecido do doador, os quais são ligantes para as proteínas *KIRs* inibidoras do paciente (*3DL1*, *2DL2/3*, *2DL1* e *3DL2*). Estudos indicam a ocorrência de aloreações mediadas pelo repertório *KIR*, quando o alvo alogênico não expressa alelos HLA de classe I que os bloqueie (RUGGERI et al., 2004). O conhecimento atual das especificidades *KIR* ativadoras ou inibidoras da lise celular através da ligação com epítomos presentes nas moléculas HLA, ainda é incompleto, embora existam alguns exemplos de especificidade entre o *KIR* e o HLA já conhecidos. Por exemplo, o *KIR2DL1* liga-se somente ao HLA-Cw (Asn77, Lys80) do grupo 1, e o *KIR2DL2* liga-se somente à moléculas HLA-Cw (Ser 77, Asn 80) do grupo 2 (COLONNA et al., 1993) (TABELA 5).

Estas células são ativadas logo após o transplante, apesar da forte

imunossupressão, sugerindo que a citotoxicidade destas células do receptor contra o doador possa ser um alvo, previamente não reconhecido, do processo de rejeição. Tal situação é observada especialmente nos pares de doadores e receptores pouco compatíveis, onde o receptor pode não expressar o repertório correto de receptores inibidores para prevenir a morte das células do doador. O pico da atividade das NK ocorre dentro de 3 dias do início da resposta imune, precedendo a atividade das células T. Elas têm um significativo papel na defesa contra tumores (TRINCHERI, 1989), infecção viral (TRINCHERI, 1989; DOKUN et al., 2001), e a rejeição do transplante de medula óssea (BIX et al., 1991). Diferentemente das células T, elas não requerem preparação e são capazes de matar células alvo independentemente de ativação. Sua importância, em transplantes de órgãos sólidos, tem sido recentemente demonstrada em alotransplantes de modelos animais (MAIER et al., 2001; POPOOLA et al., 2001). Em humanos, o aumento do número de células NK circulantes tem sido observado durante a rejeição aguda de aloenxertos renais (COOKSEY et al., 1984), além de participar em infiltrados cardíacos (MARBOE et al., 1983) e renais (HANCOCK et al., 1985; TOTTERMAN et al., 1989).

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

Os testes pré-transplantes, tais como tipagem HLA e prova cruzada, para seleção de doadores, associados com os modernos agentes imunossupressores têm permitido um aumento na taxa de sobrevida do aloenxerto renal, chegando em algumas unidades transplantadoras a mais de 90% dos casos em 1 ano. Entretanto, a rejeição aguda ainda ocorre e freqüentemente conduz à permanente disfunção do enxerto ou a perda deste (VAMPA et al., 2003). A rejeição é o problema mais comum dos primeiros 3 meses imediatamente após o transplante de rim (ETTENGER et al., 1990; McENERY et al., 1992). Neste contexto uma melhor compreensão dos mecanismos associados à aceitação/rejeição do alo-enxerto, como a atividade das células NK, de seus receptores de reconhecimento e a interação destes com seus ligantes, poderá contribuir para o aumento da sobrevida do enxerto.

3. OBJETIVOS

- Caracterizar epidemiologicamente a amostra de pacientes renais.
- Estimar as frequências dos genes, dos haplótipos e dos genótipos *KIR*, no grupo de receptores renais e em seus respectivos doadores, isoladamente.
- Comparar a frequência da identidade genética para os locos *KIR* inibidores e ativadores (*2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DS1* e *2DS2*) com ligantes HLA-Cw específicos, em duplas receptor-doador no grupo de pacientes com rejeição aguda ao aloenxerto e no grupo de pacientes sem rejeição (controles).
- Comparar a incompatibilidade KIR-Ligante (locos *KIR inibidores* *2DL1*, *2DL2* e *2DL3*, e seus ligantes HLA-Cw específicos, quando conhecidos) nas duplas receptores-doadores no grupo de pacientes com rejeição aguda ao aloenxerto e no grupo de pacientes sem rejeição (controles).
- Comparar a incompatibilidade KIR-Ligante (locos *KIR ativadores* *2DS1* e *2DS2*, e seus ligantes HLA-Cw específicos, quando conhecidos) nas duplas receptores-doadores no grupo de pacientes com rejeição aguda ao aloenxerto e no grupo de pacientes sem rejeição (controles).

4. JUSTIFICATIVA

O atual estudo tem como justificativa o fato de haver poucos trabalhos relatando o papel dos genes *KIR* no contexto dos transplantes renais. A sugestiva atuação dos receptores KIR das células *Natural Killer* no processo imunomodulador da resposta imune, no sentido de induzir ou impedir a rejeição aguda (dependendo da combinação de seu repertório com seus ligantes *HLA* de classe I) justificam a realização de estudos nessa área, cujos resultados possam contribuir para elucidar a importância dos genes *KIR* na aceitação do aloenxerto renal.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foi conduzido um estudo caso-controle composto de uma amostra de 100 pares receptor-doador. Os pacientes transplantados renais foram sub-divididos em dois grupos: a) pacientes que apresentaram quadro de rejeição; b) pacientes que não apresentaram episódios de rejeição aguda (baseado em prontuários médicos) no período compreendido entre uma semana até quatro meses após o transplante, sendo caracterizados como amostra controle. Tais amostras foram obtidas de transplantes renais realizados no período entre 1996 e 2005, no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba (HUEC). Os pares receptor/doador foram selecionados segundo os seguintes critérios: grau de similaridades HLA (número de *matches* nos locos *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DR*); grupo étnico (predominantemente caucasóides) e idade (semelhantes entre doador e receptor).

Considerando-se o grau de compatibilidade HLA para os três locos (*HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DR*) pode-se dividir as duplas receptor/doador em: HLA idêntico, quando apresentam similaridades para todos os grupos alélicos dos três locos, portanto 6 compatibilidades e 0 incompatibilidades (compatibilidades também são designadas como *matches* (M) e as incompatibilidades como *mismatches* (MM)); HLA haploidêntico, os quais possuem um haplótipo comum com seus respectivos doadores, incluem as duplas com 3-5 M (*matches*); e HLA diferente, onde os indivíduos apresentavam 2-0 M. Houveram 17 transplantes onde as duplas foram HLA idênticos (17%), 61 transplantes HLA haploidênticos (61%) e 21 com as duplas HLA diferentes (21%). Em um dos transplantes, devido a falta de dados, não foi possível confirmar o grau de compatibilidade.

Quanto à frequência da doença de base, a mais comum foi a Glomerulonefrite Crônica (GNC), presente em 69 dos pacientes renais (69%) associada ou não a outras doenças, como: Insuficiência Renal Crônica (IRC) presente em 12 pacientes (12%); Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), em 40 indivíduos (40%); *Diabetes Mellitus* (DM) em 7 pacientes (7%); dentre outras.

A imunossupressão pré-transplante foi empregada de acordo com 6 diferentes protocolos, com distintas combinações de imunossupressores:

ciclosporina (CsA), prednisona e mofetil micofenolato (MMF) em 32 pacientes (32%); CsA, prednisona e rapamicina, em 3 (3%); tacrolimus (FK506), prednisona e rapamicina em 5 pacientes renais (5%); FK506, prednisona e MMF, em 58 pacientes (58%); rapamicina, prednisona e MMF em um (1%); e prednisona mais FK506 também em um paciente (1%). Nos casos onde houve rejeição ao órgão transplantado, utilizou-se uma terapia imunossupressora complementar, que em sua maioria consistia na administração de metil prednisona associada ou não a anticorpos policlonais (ATG) ou monoclonais (OKT3).

Dependendo do estado clínico do paciente, esses critérios de pareamento entre as duplas receptor e doador poderiam ser flexibilizados no sentido de contemplar o paciente com o transplante. Com relação ao teste pré-transplante da prova cruzada ou *cross-match* (soro do receptor x linfócitos do doador), todas as duplas apresentaram resultados negativos (receptor não apresentou anticorpos anti-HLA pré-formados contra antígenos HLA do doador o que poderia resultar em rejeição hiperaguda contra o aloenxerto). Os dados referentes aos pacientes foram obtidos a partir de prontuários médicos em visitas semanais na Casa de Apoio ao Paciente Transplantado Renal do HUEC. As tipagem *HLA* foram realizadas no Hospital Universitário Cajuru.

5.2. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Dez mililitros (10 ml) de sangue periférico foram coletados de cada indivíduo, através de punção venosa, em tubos estéreis tipo *vacutainer* com EDTA para coleta sangüínea. Essas amostras foram centrifugadas para obtenção da camada de leucócitos da qual foi extraído o DNA pela técnica de *salting-out* (JOHN et al., 1990, modificado por LAHIRI e NURNBERGER, 1991) (ANEXO II).

5.3 CONCENTRAÇÃO DO DNA

A concentração de DNA das amostras foi medida pela leitura de densidade óptica, utilizando-se o espectrofotômetro Gene Quant^{pro} RNA/DNA calculator.

5.4. TIPAGEM DOS GENES *KIR* PELA TÉCNICA PCR-SSOP

O método para tipificação dos genes *KIR* utilizado no presente estudo foi a PCR-SSOP (Reação em Cadeia da Polimerase Sonda Oligonucleotídica Sequência Específica - *Polymerase Chain Reaction Sequence-Specific Oligonucleotide Probe*) empregando-se o “kit” *KIR SSO Genotyping Test* fabricado pela empresa One Lambda Inc. A amplificação do produto específico foi feita através de três pares de iniciadores (*Primers*) específicos para os exons 3, 5 e 7 até o 9 (7-9). Tais iniciadores estão presentes já no “kit” para tipagem de genes *KIR* da empresa fabricante. Após a amplificação, o produto é aplicado em gel de agarose 2,5% e corado com brometo de etídio, com a finalidade de se verificar quais amostras tiveram seus produtos amplificados e quais amostras não. Para a realização da reação de amplificação é necessário uma DNA polimerase, neste caso a enzima Taq Platinum da empresa Invitrogen sendo que os demais reagentes da Mistura de Reação (dNTPs, tampão da enzima, cofatores da enzima) estão presentes no “kit” de tipagem. A realização da amplificação do segmento específico foi realizada no aparelho termociclador Perkin-Elmer 9600 e as condições de amplificação são mostradas na TABELA 6.

A técnica de PCR-SSOP baseia-se na desnaturação química da dupla fita de DNA do produto já amplificado com iniciadores marcados com Biotina (reagente fluorescente), seguida por neutralização química de ambas as fitas do DNA abertas e posterior hibridização com sondas oligo-específicas (FIGURA 15a). Tais sondas estão pré-conjugadas em micro-esferas (“pérolas”), sendo que cada micro-esfera possui um tipo de sonda específico. Seguinte à hibridização, as sondas que hibridizaram são marcadas com um produto fluorescente, a SAPE (Estreptavidina conjugada com R-Ficoeritrina - *R-Phycoerythrin-conjugated Streptavidin*) (FIGURA 15b). A leitura das micro-esferas marcadas é realizada com a ajuda de um citômetro de fluxo (LABScan™), equipamento que através de laser na cor vermelha, comprimento de onda de 633nm, reconhece a cor da microesfera e outro laser verde, comprimento de onda 532nm, reconhece se esta microesfera está ou não marcada com SAPE, o que determinaria sua positividade. A interpretação dos resultados é feita através do software *HLA VISUAL* Versão 2.0 (cedido pela empresa) que analisa as combinações de sondas nas micro-esferas detectadas pelo

aparelho, o qual consulta um banco de dados interno e sugere quais são os locos presentes. As concentrações dos reagentes não são fornecidos e os volumes foram utilizados conforme metade do recomendado pela empresa, colaborando assim para uma substancial redução dos custos de tipagem por amostra.

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

FIGURA 15a. PRINCÍPIOS DA TÉCNICA PCR-SSOP PARA TIPAGEM *KIR*

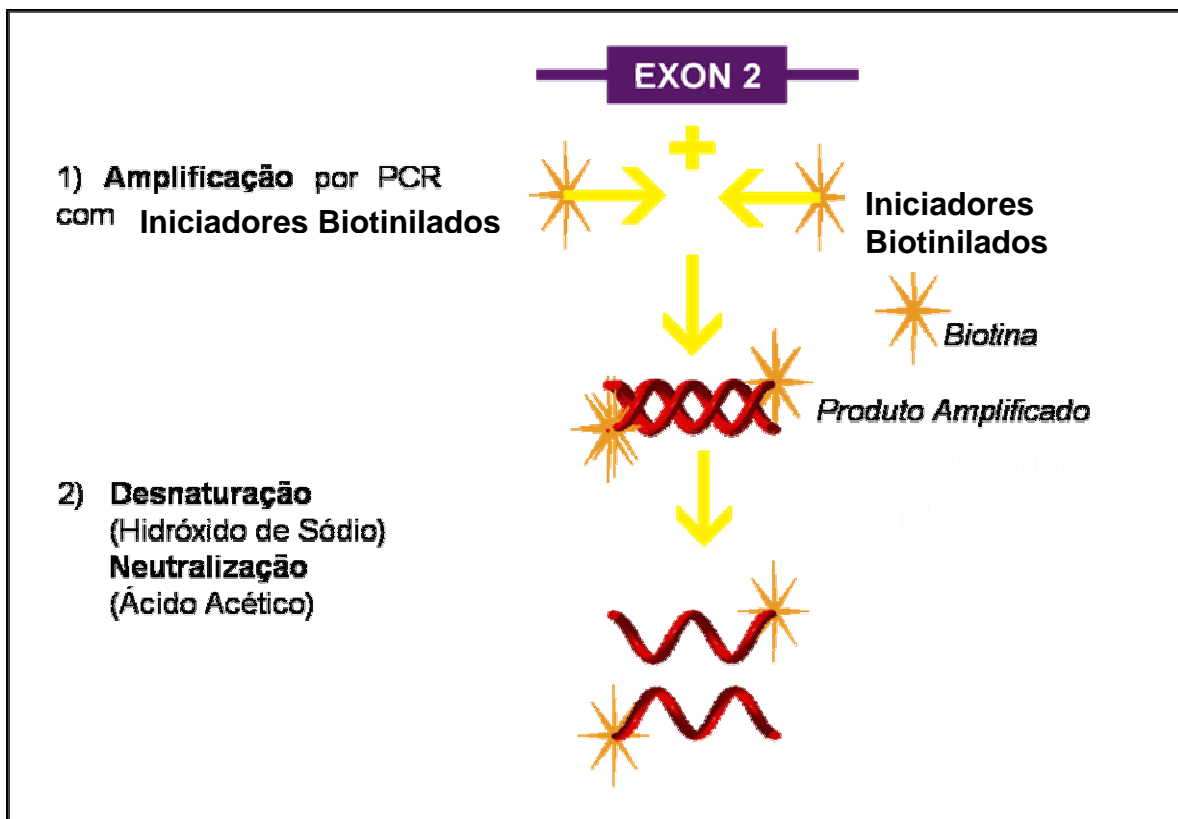
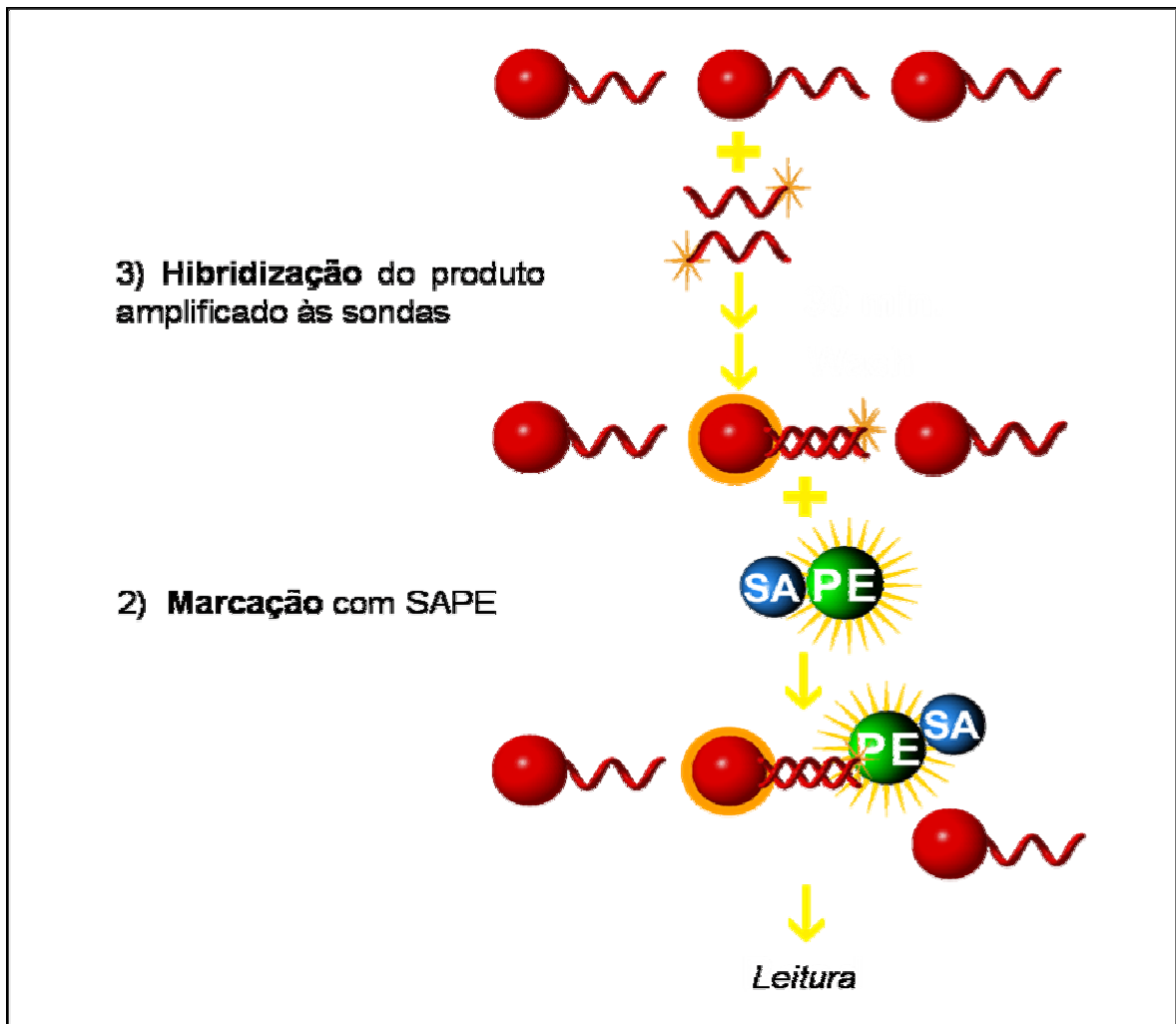


Figura 15a. Princípios da técnica de tipagem PCR-SSOP. 1) Amplificação do produto desejado com pares de iniciadores marcados com Biotina (reagente fluorescente). 2) Desnaturação química (hidróxido de sódio) da dupla fita do produto amplificado e posterior neutralização também química (ácido acético) a fim de manter ambas as fitas separadas.

FIGURA 15b. PRINCÍPIOS DA TÉCNICA PCR-SSOP PARA TIPAGEM *KIR*

(continuação)

Figura 15b. Princípios da técnica de tipagem PCR-SSOP. 3) Hibridização do produto amplificado às sondas (processo dependente de elevação de temperatura) ligadas às microesferas. 4) Amplificação do sinal fluorescente pelo reagente SAPE (Estreptavidina conjugada com R-Ficoeritrina).

TABELA 6. CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DA PCR SSOP PARA TIPAGEM DE *KIR*

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

5.5 TIPAGEM DOS GENES *HLA-Cw* PELA TÉCNICA DE PCR-SSP

Foi utilizada a metodologia da PCR-SSP (Reação em Cadeia da Polimerase Iniciador Seqüência-Específico - *Polymerase Chain Reaction Sequence-Specific Primer*) empregada pelo “kit” de tipagem *Micro SSP™ HLA Class I C Locus Specific Typing Tray*, da empresa One Lambda, Inc. Esta técnica baseia-se no princípio de que oligonucleotídeos iniciadores totalmente complementares são mais eficientemente usados para amplificar uma seqüência alvo pela Taq polimerase recombinante, do que oligonucleotídeos iniciadores mal pareados. Pares de oligonucleotídeos iniciadores são confeccionados para terem um pareamento perfeito com apenas um único alelo ou um grupo de alelos. Sob condições de PCR estritamente controladas, pares de oligonucleotídeos iniciadores perfeitamente pareados resultam na amplificação da seqüência alvo (resultado positivo), enquanto pares de oligonucleotídeos iniciadores mal-pareados não resultam em amplificação (resultado negativo). Logo, os iniciadores são sintetizados de duas formas: a forma “normal”, refratária ao DNA “mutante” (com polimorfismo de nucleotídeo único); e a forma “mutante”, refratária ao DNA com a seqüência “normal”. Para garantir que mesmo assim não haja hibridização, são colocadas bases adicionais não complementares na posição 3’ terminal do iniciador.

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

Após o processo de PCR, os fragmentos de DNA amplificado obtidos são separados por eletroforese em gel de agarose (2,5%) e visualizados por coloração em brometo de etídeo e exposição à luz ultravioleta. A interpretação dos resultados baseia-se na presença ou ausência de um fragmento de DNA amplificado específico (FIGURA 16). Devido ao fato de que a reação de PCR pode ser influenciada por vários fatores, tais como qualidade do DNA, presença de inibidores e erros humanos (na manipulação do DNA, na pipetagem...), adiciona-se à reação um par de iniciadores de controle interno, os quais amplificam uma região conservada de um gene (gene da β -globina humana), que está presente em todas amostras de DNA. Esta é uma prova utilizada para confirmar a integridade da reação de PCR, pois aparecerá a banda controle (correspondente a essa região conservada do gene) no final das reações. Na presença de uma banda de tipagem positiva (amplificação específica de um alelo *HLA*), o produto dos iniciadores de controle poderá ser fraco ou ausente, devido às diferenças de concentração e de temperaturas de hibridização entre os iniciadores específicos e os de controle interno. Os fragmentos de DNA dos pares de iniciadores específicos são menores que os de controle interno, mas maiores do que a banda de iniciadores não incorporados. Como conseqüência, a reação positiva é vista no gel como um fragmento de DNA amplificado entre a banda de controle e a banda de iniciador não incorporado. Uma foto de um gel de agarose pode ser vista na figura 17. Todos os procedimentos para o uso do “*kit*” foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. A folha para análise (*Worksheet*) inclusa no “*kit*” está no anexo III. As condições de amplificação adotadas, estão descritas na tabela 7.

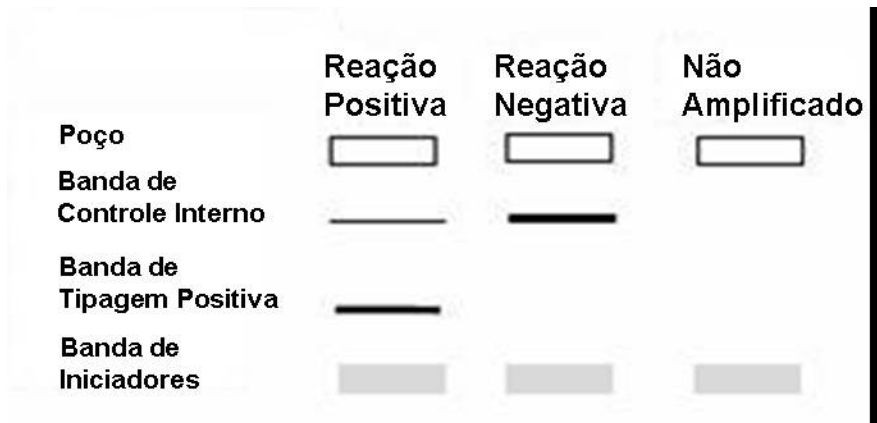
FIGURA 16. INTERPRETAÇÃO DAS BANDAS PARA TIPAGEM DO GENE *HLA-Cw*

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

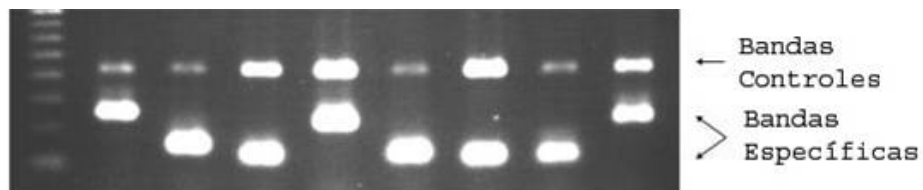
FIGURA 17- PADRÃO DE BANDAS PARA TIPAGEM DO GENE *HLA-Cw*

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

TABELA 7. CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DA PCR SSP PARA TIPAGEM *HLA-Cw*

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

5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As freqüências das diferentes etnias dentro do grupo dos receptores e do grupo dos doadores e entre as duplas (receptor/doador) com e sem rejeição, foram obtidas por contagem direta.

A análise da distribuição dos sexos em relação aos episódios de rejeição foi realizada utilizando-se tabelas de contingência (produzidas no programa Microsoft Excel), os valores do qui-quadrado (χ^2) resultantes foram comparados, segundo ao número de graus de liberdade, à tabela do qui-quadrado. Considerou-se que os dois grupos seriam significativamente diferentes se o valor de p fosse inferior a 0,05. Os graus de liberdade, para tal análise, foram calculados segundo a fórmula: $(n^\circ \text{ de linhas} - 1) \times (n^\circ \text{ de colunas} - 1)$. Quando o número amostral do grupo analisado fosse muito pequeno (inferior a 10), o que pode diminuir a acurácia do teste χ^2 , convencionou-se utilizar a correção de Yates. Esta correção consiste na subtração de 0,5 dos desvios entre as freqüências observada e esperada. Tal correção foi adotada na análise da distribuição dos sexos nos grupos com e sem rejeição.

As diferenças, entre as médias de idade dos receptores com rejeição e sem foram testadas a partir do teste de *Student* (t), os valores das médias de idade e os respectivos desvios também são fornecidos. O teste de *Student* ou teste de t foi realizado com o auxílio do programa *STATISTICA* 5.5 (ano 2000). Todas as análises referentes à média de idades foram realizadas por este método.

Possíveis correlações entre a média de idade (receptores e doadores) e o período compreendido entre o dia do transplante e o início da rejeição, foram estimadas a partir da matrix de correlação empregada pelo programa *Statística*.

A relação entre o parentesco da dupla receptor/doador e a presença ou ausência da reação ao aloenxerto, foi analisada utilizando-se o teste de contingência com três classes: I) parentesco de primeiro grau (pai, mãe, filhos e irmãos); II) parentesco de segundo grau (avós, netos, tios e primos) e III) parentes de terceiro grau e duplas sem parentesco.

A freqüência da presença de cada um dos 16 genes *KIR* para todas as amostras, juntamente das freqüências haplotípicas, dentro do grupo de receptores e do grupo de doadores, foram obtidas por contagem direta a partir de uma tabela geral de dados montada no programa Microsoft Excel.

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

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

Possíveis diferenças entre as freqüências do grupo de receptores (tratado como uma população com $N = 100$) e do grupo de doadores (também tratada como uma população) com freqüências encontradas na literatura foram analisadas a partir de testes de contingência utilizando o programa RxC desenvolvido por Miller (1997). Este programa realiza análises de contingência empregando um algoritmo de metropolis, obtendo-se assim, uma estimativa imparcial do valor exato de p .

As freqüências dos haplótipos A e B foram obtidas por contagem direta. As comparações entre os grupos de receptores e de doadores foi realizada utilizando-se o teste de contingência empregado pelo programa RxC.

A determinação das diferenças e similaridades (equivalência para os genes *KIR* entre receptores e doadores e compatibilidade entre receptores *KIR* do receptor e seus ligantes *HLA-Cw* no doador), entre duplas com rejeição aguda e duplas sem rejeição, foi efetuada pela análise de tabelas de contingência. Sendo o número de classes analisadas superior a 4, a análise foi realizada empregando-se o programa RxC (MILLER, 1997), assumindo como significantes valores de p menores ou iguais a 0,05. Análises onde o número de classes foram inferiores ou igual a 4, o cálculo foi

realizado a partir de tabelas de contingência produzidas no programa Microsoft Excel. Para os valores que mostraram significância estatística foi calculado o Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95% através do método de Woolf (WOOLF, 1955). Quando um dos dados da tabela assumir o valor zero, foi utilizada a correção de Haldane, que consiste em acrescentar o valor de 0,5 a todos os dados da tabela de contingência, com o objetivo de prevenir a impossibilidade de cálculo do OR, quando da divisão de um valor por zero.

Para verificar a compatibilidade entre os locos que codificam moléculas KIR (do receptor renal) e seus ligantes codificados pelo gene *HLA-Cw* (do doador), foram necessárias conversões dos dados moleculares (resultantes da tipagem molecular do gene *HLA-Cw*) em seus equivalentes sorológicos. Esses epítomos sorológicos (Cw) podem ser reunidos em dois diferentes grupos. A distinção entre os dois grupos leva em conta qual aminoácido está presente na posição 80 da proteína HLA-Cw. A posição 80 da molécula é de grande importância durante interações destas com os diferentes receptores KIR. O grupo G1 reúne epítomos que possuem o aminoácido lisina na posição 80 (LYS-80), e o grupo G2, o aminoácido asparagina (ASN-80). Contudo, devido à limitações na técnica de tipagem molecular dos grupos alélicos *HLA-Cw*, onde os grupos *Cw*05* e *Cw*08* não podem ser diferenciados, os seus epítomos também não os foram. Os epítomos referentes a estes grupos alélicos pertencem a grupos de epítomos diferentes, sendo *Cw5* pertencente ao grupo G1, e o *Cw8* ao grupo G2. Sendo assim, quando essa ambigüidade na tipagem foi verificada, a compatibilidade entre os receptores e doadores não foi passível de verificação. Estes dados estão indicados nas tabelas 21 e 22 pela letra N. Nestas mesmas tabelas, o símbolo “?” representa grupos alélicos *HLA-Cw* tipados molecularmente e que não possuem correspondentes sorológicos, não pertencendo a nenhum dos dois grupos G1 e G2, sendo portanto considerados como incompatibilidade. Tais conversões foram apresentadas na tabela 4, na página 25 do presente trabalho.

6. RESULTADOS

6.1. Dados Epidemiológicos das Duplas receptor/doador

A amostra foi analisada considerando-se a ausência/presença de episódios de rejeição e sua relação com a etnia, sexo, idade, grau de parentesco, frequência da presença dos genes *KIR* e de seus ligantes *HLA-Cw* entre receptores e doadores renais.

Quanto à etnia, 37% (37) dos receptores são caucasóides, 4% (4) negróides e 0% (0) de origem indígena, os 59% (59) restantes não constavam informações sobre sua etnia nos prontuários médicos. Dentre os doadores, 13% (13) são caucasóides, 2% (2) negróides e 1% (1) indígenas, 84% (84) faltam informações sobre sua etnia. Dados referentes a etnia de 59 receptores e 84 doadores não constavam nos prontuários médicos.

Os dados referentes à etnia de receptores e doadores estão representados no gráfico 1. Com relação às duplas (receptor/doador) com rejeição e sem, 53% (31) das duplas com reação alogênica são caucasóides, 7% (4) negróides e 2% (1) indígenas. As duplas que não apresentaram rejeição, foram observadas em 46% (19) de caucasóides e 5% (2) de negróides e 0% (0) de indígenas (GRÁFICO 2). Dentre as duplas com rejeição 39% (23) não constavam dados sobre sua etnia nos prontuários, e entre as duplas sem episódios de rejeição 49% (20).

GRÁFICO 1. Etnia de receptores (N=100) e doadores (N=100)

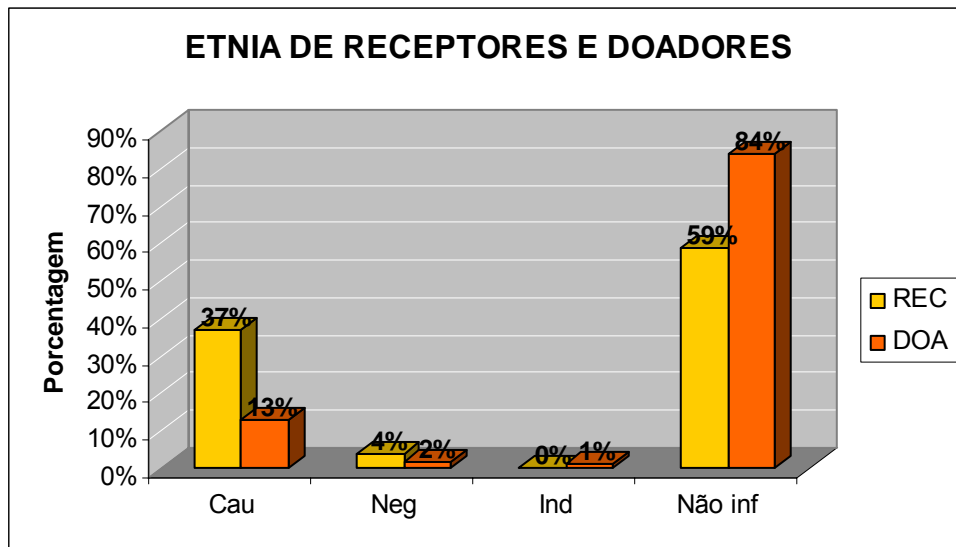


Gráfico 1. REC = receptores, DOA = doadores; Cau = caucasóides, Neg = negróides, Ind = indígenas; Não inf. = receptores e doadores cujas informações sobre etnia não constavam nos prontuários médicos.

GRÁFICO 2. Etnia de receptores+doadores com (N=59) e sem rejeição (N=41)

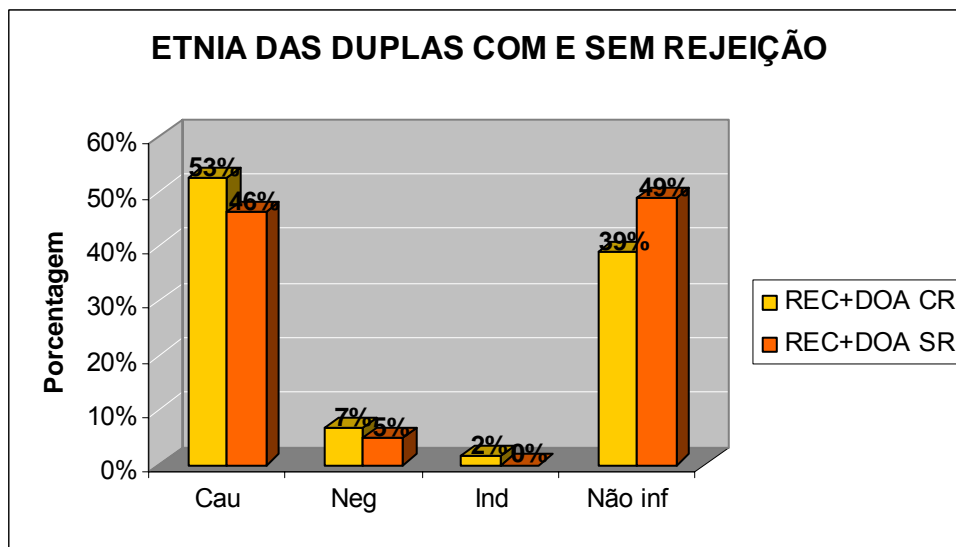


Gráfico 2. REC+DOA CR = duplas com rejeição, REC+DOA SR = duplas sem rejeição; Cau = caucasóides, Neg = negróides, Ind = indígenas; Não inf. = receptores e doadores cujas informações sobre etnia não constavam nos prontuários médicos..

A análise da distribuição dos sexos em relação aos episódios de rejeição (TABELA 8) mostrou uma diferença significativa ($\chi^2_1 = 5,1229$; $p < 0,05$) quando se comparou o número de receptores homens com o número de receptores mulheres

com (CR) e sem rejeição (SR). A porcentagem de cada sexo está representada no gráfico 3.

TABELA 8. Distribuição dos sexos entre duplas com e duplas sem rejeição

	Homens n(%)	Mulheres n(%)	total	
CR	38 (64,41)	21(35,59)	59	$\chi^2_1 = 4,898; p < 0,05$
SR	17(41,46)	24(58,54)	41	$\chi^2_1 = 1,196; p > 0,10$
total	55	45	100	

$\chi^2_1 = 5,1229; p < 0,05$

Tabela 8. CR= duplas com rejeição; SR= duplas sem rejeição. Para 1 grau de liberdade.

GRÁFICO 3. Representação da distribuição dos sexos em relação à rejeição

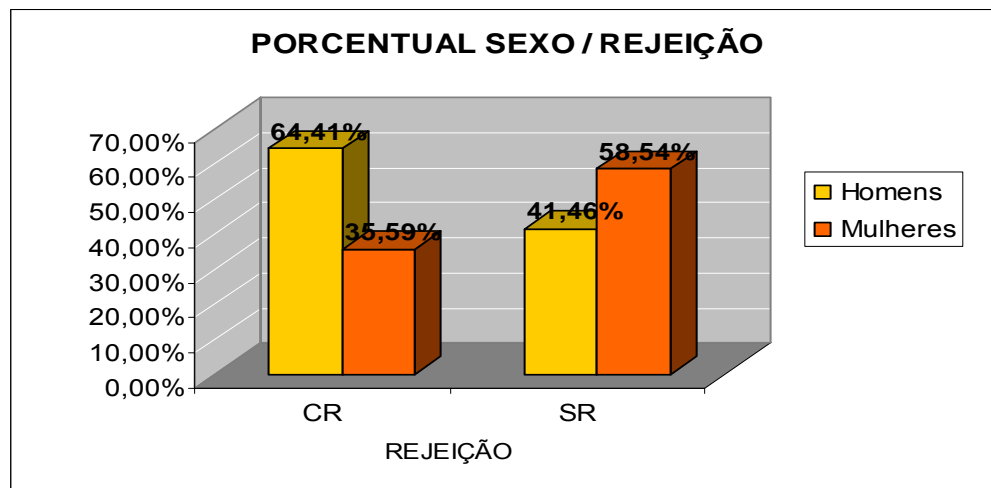


Gráfico 3. CR= duplas com rejeição; SR= duplas sem rejeição.

A análise da distribuição entre duplas receptor/doador de mesmo sexo e duplas de sexos diferentes, na presença ou ausência de episódios de rejeição, não demonstrou significância estatística quando da comparação dos dois grupos ($\chi^2_1 = 0,08; p > 0,78$) (TABELA 9).

TABELA 9. Distribuição das duplas (receptores e doadores) de mesmo sexo e com sexos diferentes nos grupos com e sem rejeição

	mesmo sexo (H/H + M/M)	sexo diferente (H/M + M/H)	total
CR n(%)	29 (60,42)	30 (57,69)	59
SR n(%)	19 (39,58)	22 (42,31)	41
total	48	52	100

($\chi^2_1=0,08$; $p>0,78$)

Tabela 9. H = homem e M = mulher. H/H = receptor homem / doador homem; M/M = receptor mulher / doador mulher; H/M receptor homem / doador mulher; M/H = receptor mulher / doador homem. CR = duplas com rejeição; SR = duplas sem rejeição. Para 1 grau de liberdade.

As médias de idade entre os receptores renais com a ocorrência de rejeição ao enxerto foi de $34,48 \pm 12,57$ anos, e o grupo que não apresentou a rejeição foi de $39,56 \pm 12,22$ anos. Dentre os doadores essa média foi de $39,89 \pm 10,39$ anos para aqueles onde o receptor apresentou episódios de rejeição. Doadores de pacientes sem rejeição tiveram a média de idade igual a $37,46 \pm 10,54$ anos.

Os dados referentes às médias de idade entre receptores e doadores, e suas comparações quando agrupados segundo fatores como presença de rejeição e sexo, foram tabulados juntamente com os valores de t na tabela 10. Foram encontradas diferenças significativas entre a média de idade do grupo de receptores com e as médias do grupo sem rejeição ($t_7 = 2,00$; $p < 0,04$). O teste para os doadores não demonstrou diferenças significativas.

A comparação das médias de idade entre os sexos e os grupos com e sem rejeição mostrou significância apenas em doadores. Essa diferença estatística foi observada entre doadores do sexo masculino entre os grupos com e sem rejeição ($t_6 = 2,16$; $p < 0,03$) (TABELA 10).

A análise da média das diferenças das idades entre receptores e doadores na época do transplante não mostrou diferenças significativas (TABELA 11). Os dados provenientes da comparação entre médias de idades estão representados no gráfico 4.

TABELA 10 Média das idades de receptores e doadores em relação ao sexo e a ocorrência ou não de rejeição

CRxSR	RECEPTORES						DOADORES					
	H + M		H		M		H + M		H		M	
	CR (59)	SR (41)	CR (38)	SR (17)	CR (21)	SR (24)	CR (59)	SR (41)	CR (35)	SR (23)	CR (24)	SR (19)
Média	34,48 ±12,57	39,56 ±12,22	34,45 ±11,92	40,17 ±13,19	34,52 ±13,94	39,12 ±11,76	39,89 ±10,39	37,46 ±10,54	40,63 ±11,10	34,60 ±8,82	38,82 ±9,42	41,11 ±11,66
Teste t	($t_1 = 2,00$; $p < 0,04$)		$(t_4 = 1,58$; $p > 0,11$)		$(t_3 = 1,20$; $p > 0,23$)		$(t_2 = 1,12$; $p > 0,26$)		($t_6 = 2,16$; $p < 0,03$)		$(t_5 = 0,69$; $p > 0,49$)	

Tabela 10. H = homem e M = mulher. H+M = todos os indivíduos do grupo independentemente de seus sexos. CR = duplas com rejeição; SR = duplas sem rejeição.

TABELA 11. Médias das diferenças de idades entre receptores e doadores em relação a ocorrência ou não de rejeição

CRxSR	Diferença Rec/Doa	
	H + M	
	CR (55)	SR (45)
Média	12,6 ± 9,83	12,15 ± 11,64
Teste t	$(t = 0,20$; $p > 0,83$)	

Tabela 11. H = homem e M = mulher. CR = duplas com rejeição; SR = duplas sem rejeição.

GRÁFICO 4. Média das idades entre os grupos com e sem rejeição

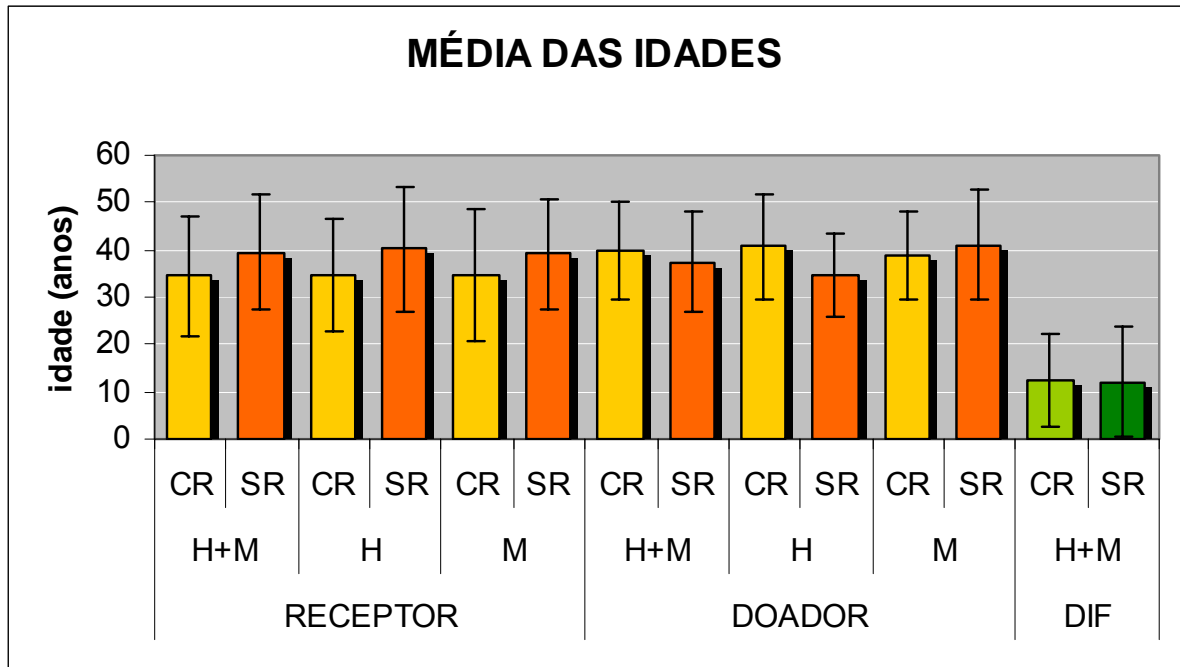


Gráfico 4. CR = duplas com rejeição; SR = duplas sem rejeição. H = homem, M = mulher e H+M = homens e mulheres. DIF = diferenças entre as idades de receptores e doadores.

Quanto ao grau de parentesco entre receptores e doadores, 76% dos transplantes foram realizados entre parentes de primeiro grau (65 transplantes), 7% entre parentes de segundo grau (7 transplantes) e 16% com doadores não relacionados (14 transplantes). Todos os demais transplantes foram realizados entre duplas onde os doadores eram consangüíneos mas o grau de parentesco não pode ser analisado por falta de dados. A relação entre o grau de parentesco da dupla receptor/doador e a presença de rejeição não demonstrou diferenças significantes entre os grupos com rejeição e os grupos sem ($\chi^2_2 = 1,62$; $0,50 > p > 0,30$). Os dados referentes ao grau de parentesco estão representados no gráfico 5.

GRÁFICO 5. Distribuição do grau de parentesco em relação à presença ou ausência de rejeição

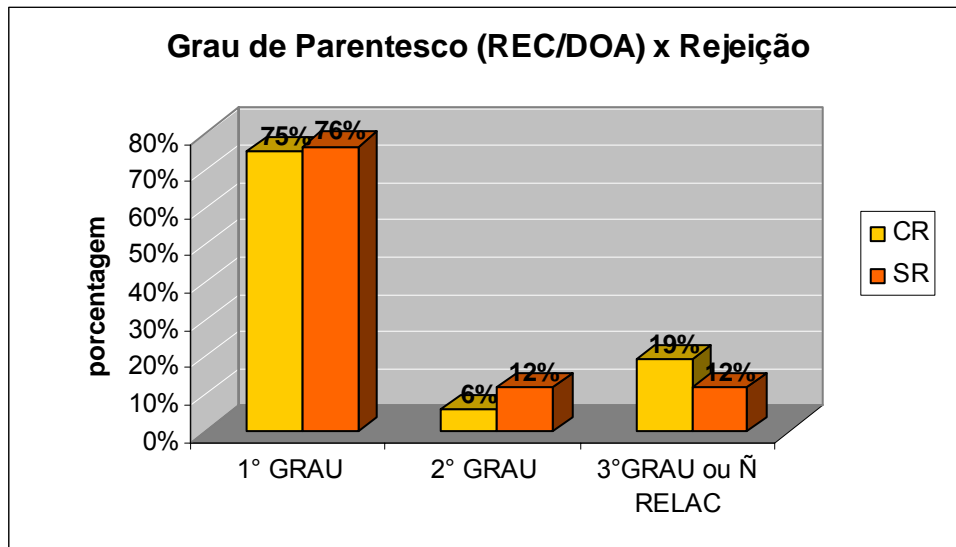


Gráfico 5. CR = grupo com rejeição; SR = grupo sem rejeição. Ñ relac = duplas receptor/doador sem parentesco.

6.2. FREQUÊNCIA DOS GENES *KIR*

As frequências da presença dos 16 genes *KIR* e as estimativas de p , q , p^2 , $2pq$ e q^2 são apresentadas na tabela 14. A comparação entre as frequências da presença dos genes nos grupos receptores e doadores não apresentou diferenças significativas ($p = 0,99$; $EP = 0,0005$) (TABELA 12).

No grupo dos receptores, os genes *KIR2D* que codificam moléculas KIR inibidoras como o 2DL1, estavam presentes em 98%, o 2DL2 em 49%, o 2DL3 em 90% e o 2DL5 em 50% dos indivíduos. O gene 2DL4 (conhecido como gene de “moldura”) esteve presente em 100% dos receptores. Os genes codificantes para moléculas inibidoras KIR3D, apresentaram frequências iguais a 92% para o loco 3DL1, para o gene de “moldura” 3DL2, a frequência da presença foi de 100%, enquanto para o gene 3DL3 (também gene de “moldura”) estava presente em 99% dos indivíduos analisados. Para o grupo de doadores, genes com dois domínios semelhantes à Ig que codificam proteínas ativadoras, tiveram a frequência de presença de 97% para o gene 2DL1, 47% para 2DL2, 89% para 2DL3 e 56% para 2DL5. Entre os doadores o gene 2DL4 estava presente em 97% dos indivíduos,

diferentemente dos 100% nos receptores. Os genes *KIR3D* apresentaram uma frequência de 92% do loco *3DL1*, 99% para *3DL2* e 100% para *3DL3* (sendo estes dois últimos genes, *framework* ou de moldura).

Os genes que codificam proteínas ativadoras do tipo *KIR2D* apresentaram, nos receptores, uma frequência de presença igual a 39% para o gene *2DS1*, 55% para *2DS2*, 29% para *2DS3*, 85% para *2DS4* e 30% para *2DS5*. Já os genes do tipo *KIR3D*, 40% dos receptores apresentaram o *3DS1*. Dentre os doadores, 41% apresentaram o gene *2DS1*, 54% o gene *2DS2*, 37% o *2DS3*, 81% o *2DS4* e 22% o *2DS5*. O gene *3DS1* obteve uma frequência de 40% também em doadores.

A frequência dos pseudogenes: *2DP1* é de 99% nos receptores e de 98% nos doadores, e do *3DP1* de 100% entre os receptores e de 98% nos doadores. A frequência da presença no grupo dos receptores foi comparada com o grupo de doadores e nenhuma diferença significativa foi encontrada ($p = 0,99$; $EP = 0,0005$) (TABELA 14).

Estas frequências foram ainda comparadas com dados populacionais disponíveis na literatura e obtidos de estudos realizados em: duas populações predominantemente caucasóides, uma francesa (DENIS et al., 2005), e outra inglesa (COOK et al., 2003); duas populações negróides, uma senegalesa (DENIS et al., 2005) e outra do Caribe (COOK et al., 2003); além de uma população oriental chinesa (JIANG et al., 2005) (TABELA 13).

Somente a comparação de nossos dados com aqueles referentes às populações da China e de Senegal apresentaram diferenças significativas tanto no grupo dos receptores ($p = 0,000001$; $EP = 0,000001$ e $p = 0,000001$; $EP = 0,000001$, respectivamente) (TABELA 14) quanto no grupo dos doadores ($p = 0,000001$; $EP = 0,000001$ e $p = 0,000001$; $EP = 0,000001$, respectivamente) (TABELA 15). As comparações entre as cinco populações para cada loco *KIR* entre os grupos de receptores e de doadores, foram analisadas separadamente (Tabelas 14 e 15, respectivamente).

TABELA 12. Frequência da presença dos genes *KIR* entre receptores e doadores (*continua*)

<i>KIR</i>	RECEPTORES (N=100)						DOADORES (N=100)					
	freq (N)	p (EP)	q (EP)	p ²	2pq	q ²	freq (N)	p (EP)	q (EP)	p ²	2pq	q ²
<i>2DL1</i>	0,98 (98)	0,86 (±0,02)	0,14 (±0,02)	0,74	0,24	0,02	0,97 (97)	0,83 (±0,03)	0,17 (±0,03)	0,68	0,29	0,03
<i>2DL2</i>	0,49 (49)	0,29 (±0,03)	0,71 (±0,03)	0,08	0,41	0,51	0,47 (47)	0,27 (±0,03)	0,73 (±0,03)	0,07	0,40	0,53
<i>2DL3</i>	0,90 (90)	0,68 (±0,03)	0,32 (±0,03)	0,47	0,43	0,10	0,89 (89)	0,67 (±0,03)	0,33 (±0,03)	0,45	0,44	0,11
<i>2DL4</i>	1,00 (100)	1,00 (±0,00)	0,00 (±0,00)	?	?	0,00	0,97 (97)	0,83 (±0,03)	0,17 (±0,03)	0,68	0,29	0,03
<i>2DL5</i>	0,50 (50)	0,29 (±0,03)	0,71 (±0,03)	0,09	0,41	0,50	0,56 (56)	0,34 (±0,03)	0,66 (±0,03)	0,11	0,45	0,44
<i>2DP1</i>	0,99 (99)	0,90 (±0,02)	0,10 (±0,02)	0,81	0,18	0,01	0,98 (98)	0,86 (±0,02)	0,14 (±0,02)	0,74	0,24	0,02
<i>2DS1</i>	0,39 (39)	0,22 (±0,03)	0,78 (±0,03)	0,05	0,34	0,61	0,41 (41)	0,23 (±0,03)	0,77 (±0,03)	0,05	0,36	0,59
<i>2DS2</i>	0,55 (55)	0,33 (±0,03)	0,67 (±0,03)	0,11	0,44	0,45	0,54 (54)	0,32 (±0,03)	0,68 (±0,03)	0,10	0,44	0,46
<i>2DS3</i>	0,29 (29)	0,16 (±0,03)	0,84 (±0,03)	0,02	0,27	0,71	0,37 (37)	0,21 (±0,03)	0,79 (±0,03)	0,04	0,33	0,63
<i>2DS4</i>	0,85 (85)	0,61 (±0,03)	0,39 (±0,03)	0,38	0,47	0,15	0,81 (81)	0,56 (±0,04)	0,44 (±0,04)	0,32	0,49	0,19
<i>2DS5</i>	0,30 (30)	0,16 (±0,03)	0,84 (±0,03)	0,03	0,27	0,70	0,22 (22)	0,12 (±0,02)	0,88 (±0,02)	0,01	0,21	0,78
<i>3DL1</i>	0,92	0,72	0,28	0,51	0,41	0,08	0,92	0,72	0,28	0,51	0,41	0,08

	(92)	(±0,03)	(±0,03)				(92)	(±0,03)	(±0,03)			
3DL2	1,00	1,00	0,00	?	?	0,00	0,99	0,90	0,10	0,81	0,18	0,01
	(100)	(±0,00)	(±0,00)				(99)	(±0,02)	(±0,02)			
3DL3	0,99	0,90	0,10	0,81	0,18	0,01	1,00	1,00	0,00	?	?	0,00
	(99)	(±0,02)	(±0,02)				(100)	(±0,00)	(±0,00)			
3DP1	1,00	1,00	0,00	?	?	0,00	0,98	0,86	0,14	0,74	0,24	0,02
	(100)	(±0,00)	(±0,00)				(98)	(±0,02)	(±0,02)			
3DS1	0,40	0,23	0,77	0,05	0,35	0,60	0,40	0,23	0,77	0,05	0,35	0,60
	(40)	(±0,03)	(±0,03)				(40)	(±0,03)	(±0,03)			

$p = 0,99$ (para as frequências absolutas de presença dos locos entre Receptores e Doadores)

Tabela 12. Os valores de p e q foram calculados partindo-se do princípio que a população segue as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para os genes p^2 , q^2 e $2pq$, são estimativas das frequências de heterozigotos e homozigotos calculados a partir da frequência do homozigoto para a ausência (q^2). O valor de p , pode ser calculado também pela fórmula de Bernstein. A porcentagem (%) apresentada é referente a frequência relativa da presença do gene. Os genes em negrito, são aqueles denominados genes de “moldura” (*framework*), virtualmente presentes em todos os indivíduos. O símbolo “?” está presente quando a frequência de homozigotos e heterozigotos não pode ser diferenciada.

TABELA 13. Comparação das freqüências da presença dos locos *KIR* entre o grupo receptor, o grupo doador e outras cinco populações (*continua*)

	Receptores (100)	Doadores (100)	Caucasóides Franceses ¹ (108)	Caucasóides Reino Unido ² (126)	Negróides Caribe ³ (54)	Negróides Senegal ⁴ (90)	Orientais Chineses ⁵ (104)
<i>KIR</i>	freq (N)	freq (N)	freq (N)	freq (N)	freq (N)	freq (N)	freq (N)
<i>2DL1</i>	0,98 (98)	0,97 (97)	0,97 (105)	0,93 (117)	0,91 (49)	1,00 (90)	0,99 (103)
<i>2DL2</i>	0,49 (49)	0,47 (47)	0,50 (54)	0,52 (66)	0,54 (29)	0,55 (50)	0,17 (18)
<i>2DL3</i>	0,90 (90)	0,89 (89)	0,91 (98)	0,93 (117)	0,91 (49)	0,90 (81)	0,99 (103)
<i>2DL4</i>	1,00 (100)	0,97 (97)	1,00 (108)	NT	NT	1,00 (90)	1,00 (104)
<i>2DL5</i>	0,50 (50)	0,56 (56)	0,47 (51)	0,40 (50)	0,33 (18)	0,52 (47)	0,37 (38)
<i>2DP1</i>	0,99 (99)	0,98 (98)	0,97 (105)	NT	NT	1,00 (90)	0,99 (103)
<i>2DS1</i>	0,39 (39)	0,41 (41)	0,36 (39)	0,17 (9)	0,17 (9)	0,13 (12)	0,34 (35)
<i>2DS2</i>	0,55 (55)	0,54 (54)	0,51 (55)	0,55 (69)	0,52 (28)	0,42 (38)	0,17 (18)
<i>2DS3</i>	0,29 (29)	0,37 (37)	0,31 (33)	0,25 (32)	0,24 (13)	0,24 (22)	0,13 (13)
<i>2DS4</i>	0,85 (85)	0,81 (81)	0,96 (104)	0,87 (110)	0,78 (42)	1,00 (90)	*
<i>2DS5</i>	0,30 (30)	0,22 (22)	0,27 (29)	0,33 (42)	0,30 (16)	0,30 (27)	0,23 (24)
<i>3DL1</i>	0,92 (92)	0,92 (92)	0,96 (104)	0,94 (118)	0,98 (53)	0,99 (89)	0,94 (98)
<i>3DL2</i>	1,00 (100)	0,99 (99)	1,00 (108)	NT	NT	1,00 (90)	1,00 (104)
<i>3DL3</i>	0,99 (99)	1,00 (100)	1,00 (108)	NT	NT	1,00 (90)	1,00 (104)
<i>3DP1</i>	1,00 (100)	0,98 (98)	0,97 (105)	NT	NT	1,00 (90)	*
<i>3DS1</i>	0,40 (40)	0,40 (40)	0,44 (48)	0,42 (53)	0,17 (9)	0,04 (4)	0,33 (34)

p_1	p_2	$p_1 = 1,00$ $p_2 = 0,99$	$p_1 = 0,99$ $p_2 = 0,57$	$p_1 = 0,24$ $p_2 = 0,07$	$p_1 = 0,00$ $p_2 = 0,00$	$p_1 = 0,00$ $p_2 = 0,00$
		¹ Denis et al., 2005			⁴ Denis et al., 2005	
		² Cook et al., 2003			⁵ Jiang et al., 2005	
		³ Cook et al., 2003				

Tabela 13. NT = loco não tipado; * o dado não pode ser analisado; p_1 = valor de p para comparação entre o grupo dos receptores e a população analisada; p_2 = valor de p para comparação entre o grupo dos doadores e a população analisada. Genes em negrito são aqueles denominados de genes de “moldura”.

TABELA 14. Comparação das freqüências da presença, loco por loco *KIR* entre o grupo receptores e outras cinco populações (*continua*)

	Receptores (100)	Caucasóides Franceses ¹ (108)	Caucasóides Reino Unido ² (126)	Negróides Caribe ³ (54)	Negróides Senegal ⁴ (90)	Orientais Chineses ⁵ (104)
<i>KIR</i>	% (N)	% (N)	% (N)	% (N)	% (N)	% (N)
<i>2DL1</i>	98 (98)			91 (49) $\chi^2=4,259$; $p<0,05$		
<i>2DL2</i>	49 (49)					17 (18) $\chi^2=23,215$; $p<0,001$
<i>2DL3</i>	90 (90)					99 (103) $\chi^2=8,164$; $p<0,01$
<i>2DL4</i>	100 (100)					
<i>2DL5</i>	50 (50)			33 (18) $\chi^2=3,950$; $p<0,05$		
<i>2DP1</i>	99 (99)					
<i>2DS1</i>	39 (39)		17 (9) $\chi^2=33,825$; $p<0,01$	17 (9) $\chi^2=8,152$; $p<0,01$	13 (12) $\chi^2=15,891$; $p<0,001$	
<i>2DS2</i>	55 (55)					17 (18) $\chi^2=31,519$; $p<0,001$
<i>2DS3</i>	29 (29)					13 (13) $\chi^2=8,489$; $p<0,001$
<i>2DS4</i>	85 (85)	96 (104) $\chi^2=16,838$; $p<0,001$			100 (90) $\chi^2=14,657$; $p<0,001$	
<i>2DS5</i>	30 (30)				99 (89) $\chi^2=4,982$; $p<0,05$	

3DL1	92 (92)		
3DL2	100 (100)		
3DL3	99 (99)		
3DP1	100 (100)		
3DS1	40 (40)	17 (9) $\chi^2=8,800;$ $p<0,01$	4 (4) $\chi^2=33,652;$ $p<0,001$

Tabela 14. Os espaços em branco significam que nenhuma diferença estatisticamente significante foi encontrada.

TABELA 15. Comparação das freqüências da presença, loco por loco *KIR* entre o grupo doadores e outras cinco populações (*continua*)

<i>KIR</i>	Doadores (100)	Caucasóides Franceses ¹ (108)	Caucasóides Reino Unido ² (126)	Negróides Caribe ³ (54)	Negróides Senegal ⁴ (90)	Orientais Chineses ⁵ (104)
	% (N)	% (N)	% (N)	% (N)	% (N)	% (N)
<i>2DL1</i>	97 (97)					
<i>2DL2</i>	47 (47)					17 (18) $\chi^2=20,703$; $p<0,001$
<i>2DL3</i>	89 (89)					99 (103) $\chi^2=9,729$; $p<0,01$
<i>2DL4</i>	97 (97)					
<i>2DL5</i>	56 (56)		40 (50) $\chi^2=5,961$; $p<0,02$	33 (18) $\chi^2=7,217$; $p<0,01$		37 (38) $\chi^2=7,771$; $p<0,01$
<i>2DP1</i>	98 (98)					
<i>2DS1</i>	41 (41)		17 (9) $\chi^2=37,093$; $p<0,001$	17 (9) $\chi^2=9,469$; $p<0,01$	13 (12) $\chi^2=18,027$; $p<0,001$	
<i>2DS2</i>	54 (54)					17 (18) $\chi^2=30,054$; $p<0,001$
<i>2DS3</i>	37 (37)					13 (13) $\chi^2=16,539$; $p<0,001$
<i>2DS4</i>	81 (81)	96 (104) $\chi^2=12,353$; $p<0,001$			100 (90) $\chi^2=19,000$; $p<0,001$	
<i>2DS5</i>	22 (22)					

3DL1	92 (92)		
3DL2	99 (99)		
3DL3	100 (100)		
3DP1	98 (98)		
3DS1	40 (40)	17 (9) $\chi^2=8,800;$ $p<0,01$	4 (4) $\chi^2=33,652;$ $p<0,001$

Tabela 15. Os espaços em branco significam que nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada.

Análises para comparação da distribuição das freqüências dos locos *KIR* entre receptores e doadores foram realizadas (TABELA 16). O primeiro teste, comparou o grupo de receptores com rejeição com seus respectivos doadores e não se observou nenhuma significância estatística na distribuição dos dados entre as amostras ($p = 0,99$; EP = 0,003). O mesmo resultado foi obtido quando da comparação entre receptores sem rejeição e doadores sem rejeição ($p = 0,99$; EP = 0,0002), e para receptores com rejeição e receptores sem rejeição ($p = 0,98$; EP = 0,004).

TABELA 16. Comparação das freqüências da presença dos locos *KIR* entre receptores e doadores com e sem rejeição

<i>KIR</i>	REC CR (59) freq (N)	DOA CR (59) freq (N)	REC SR (41) freq (N)	DOA SR (41) freq (N)
<i>2DL1</i>	0,98 (58)	0,95 (56)	0,98 (40)	1,00 (41)
<i>2DL2</i>	0,49 (29)	0,41 (24)	0,49 (20)	0,56 (23)
<i>2DL3</i>	0,92 (54)	0,92 (54)	0,88 (36)	0,85 (35)
2DL4	1,00 (59)	0,95 (56)	1,00 (41)	1,00 (41)
<i>2DL5</i>	0,51 (30)	0,53 (31)	0,49 (20)	0,61 (25)
<i>2DP1</i>	0,98 (58)	0,97 (57)	1,00 (41)	1,00 (41)
<i>2DS1</i>	0,44 (26)	0,42 (25)	0,32 (13)	0,39 (16)
<i>2DS2</i>	0,56 (33)	0,46 (27)	0,54 (22)	0,66 (27)
<i>2DS3</i>	0,24 (14)	0,31 (18)	0,37 (15)	0,46 (19)
<i>2DS4</i>	0,81 (48)	0,80 (47)	0,90 (37)	0,83 (34)
<i>2DS5</i>	0,36 (21)	0,19 (11)	0,22 (9)	0,27 (11)
<i>3DL1</i>	0,88 (52)	0,90 (53)	0,98 (40)	0,95 (39)
3DL2	1,00 (59)	1,00 (59)	1,00 (41)	0,98 (40)
3DL3	1,00 (59)	1,00 (59)	0,98 (40)	1,00 (41)
3DP1	1,00 (59)	0,97 (57)	1,00 (41)	1,00 (41)
<i>3DS1</i>	0,46 (27)	0,37 (22)	0,32 (13)	0,44 (18)

$p_1 = 0,99$
 $EP = 0,003$

$p_2 = 0,99$
 $EP = 0,0002$

$p_3 = 0,98$
 $EP = 0,004$

Tabela 16. Os genes em negrito são aqueles denominados de genes de “moldura”. p_1 = comparação entre Receptores com rejeição e doadores com rejeição; p_2 = comparação entre receptores e doadores sem rejeição; p_3 = comparação entre receptores com e sem rejeição. EP = erro padrão.

6.3. FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA E GENÓTIPOS ENCONTRADOS

A frequência dos haplótipos A e B foi analisada dentro dos grupos de receptores e de doadores (GRÁFICO 6). As frequências de cada haplótipo, juntamente com as comparações das suas frequências entre os grupos de receptores e doadores com e sem rejeição, são apresentadas na tabela 17. A comparação das frequências de cada haplótipo entre os receptores e doadores não demonstrou diferenças significativas ($p_1 = 0,68$; EP = 0,01). Também foram comparadas estas frequências em relação à presença ou a ausência da rejeição ao alotransplante, e nenhuma das três análises a seguir relacionadas mostrou significância: receptores com rejeição x doadores do grupo que apresentou rejeição ($p_2 = 0,10$; EP = 0,004); receptores sem rejeição x doadores do grupo sem rejeição ($p_3 = 0,35$; EP = 0,009) e receptores com rejeição x receptores sem rejeição ($p_4 = 0,18$; EP = 0,006).

GRÁFICO 6. Distribuição haplotípica entre receptores (N=100) e doadores (N=100)

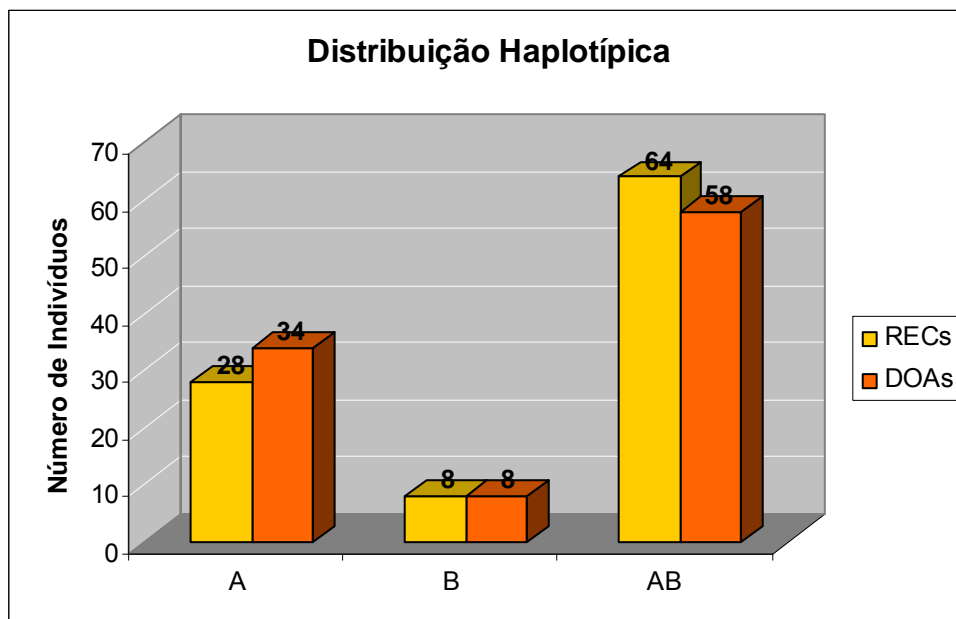


Gráfico 6. REC = receptores, DOA = doadores.

TABELA 17. Freqüência dos haplótipos dentro dos grupos receptor e doador

	REC (100)	DOA (100)	REC CR (59)	DOA CR (59)	REC SR (41)	DOA SR (41)
HAP	freq (N)	freq (N)	freq (N)	freq (N)	freq (N)	freq (N)
AA	0,28 (28)	0,34 (34)	0,24 (14)	0,42 (25)	0,34 (14)	0,22 (9)
BB	0,08 (8)	0,08 (8)	0,12 (7)	0,09 (5)	0,03 (1)	0,07 (3)
AB	0,64 (64)	0,58 (58)	0,64 (38)	0,49 (29)	0,63 (26)	0,71 (29)
	$p_1 = 0,68$; EP = 0,01		$p_2 = 0,10$; EP = 0,004		$p_3 = 0,35$; EP = 0,009	
	$p_4 = 0,18$; EP = 0,006					

Tabela 17. REC = receptores, DOA = doadores, CR = com rejeição, SR = sem rejeição. p_1 = comparação entre receptores e doadores (CR+SR). p_2 = comparação entre receptores com rejeição (REC CR) e doadores com rejeição (DOA CR). p_3 = comparação entre receptores sem rejeição (REC SR) e doadores sem rejeição (DOA SR). p_4 = comparação entre receptores com rejeição (REC CR) e sem (REC SR). EP = erro padrão.

Os perfis ou genótipos *KIR* tipados no presente estudo estão listados na tabela 18, juntamente com o número total de locos, freqüências absoluta e relativa dos locos dentro dos grupos de receptores e doadores, bem como o número de locos inibidores e ativadores. Os genótipos dos grupos de receptores e de doadores são apresentados numa mesma tabela a fim de uma melhor visualização e comparação entre os dois grupos. Dentre os 72 receptores com haplótipo BB ou AB, foram observados 35 diferentes perfil *KIR*, enquanto que entre os 67 indivíduos doadores observamos 39 diferentes genótipos. Os indivíduos com o haplótipo A (o qual não apresenta diferentes genótipos) não foram listados na tabela 18, sendo que 28 receptores e 33 doadores apresentaram tal haplótipo. Dentro de cada genótipo o número total de locos *KIR* varia, podendo ter um mínimo de 7 e um máximo de 16 genes. Se analisarmos apenas os locos ativadores, o número mínimo é de 0 e o máximo de 6 locos. Entretanto o número de genes inibidores que compõem um perfil é maior, podendo variar de 4 a 9 locos. Pelo fato do loco *2DS4*, dependendo das circunstâncias, apresentar função ativadora ou inibidora, a freqüência para o gene codificante da proteína *2DS4* foi incluída, quando presente, tanto no grupo de locos ativadores quanto no grupo de locos inibidores. Os dois genótipos mais freqüentes

entre os receptores, também o foram entre os doadores, ou seja, os genótipos 12 e 10, que apresentam 2 e 3 locos ativadores respectivamente, além de 8 e 9 locos inibidores, respectivamente.

TABELA 18. Distribuição dos genótipos entre receptores e doadores com os haplótipos B e AB (continua)

Genot	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DP1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DL1	3DL2	3DL3	3DP1	3DS1	HAP	NG	REC	freq	DOA	freq	ATIV	INIB
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	B	14	1	0,01	2	0,03	5	7
2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	B	13	1	0,01	1	0,01	4	7
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	B	13	1	0,01	1	0,01	4	7
4	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	B	8	0	0,00	1	0,01	0	6
5	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	B	12	0	0,00	1	0,01	4	6
6	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	B	12	0	0,00	1	0,01	4	6
7	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	B	7	0	0,00	2	0,03	3	4
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	AB	16	4	0,06	2	0,03	6	8
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	AB	14	1	0,01	2	0,03	4	8
10	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	AB	13	7	0,10	6	0,09	3	8
11	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	AB	15	4	0,06	3	0,04	5	8
12	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	AB	11	14	0,19	6	0,09	2	7
13	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	AB	14	0	0,00	2	0,03	5	7
14	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	AB	14	3	0,04	3	0,04	4	8
15	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	AB	14	2	0,03	1	0,01	4	8
16	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	AB	13	4	0,06	3	0,04	4	7
17	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	AB	10	1	0,01	2	0,03	2	6
18	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	AB	14	2	0,03	1	0,01	5	7
19	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	AB	13	0	0,00	1	0,01	5	6
20	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	AB	12	1	0,01	1	0,01	3	7
21	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	AB	12	0	0,00	1	0,01	3	7
22	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	AB	12	0	0,00	1	0,01	3	7
23	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	AB	11	0	0,00	1	0,01	2	7
24	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	AB	14	0	0,00	1	0,01	5	7
25	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	AB	13	0	0,00	1	0,01	3	8
26	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	AB	13	0	0,00	1	0,01	4	7
27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	AB	14	1	0,01	3	0,04	4	8
28	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	AB	12	0	0,00	1	0,01	3	7
29	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	AB	12	0	0,00	1	0,01	3	7
30	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	AB	10	0	0,00	1	0,01	1	7
31	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	AB	14	1	0,01	1	0,01	5	7
32	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	AB	13	0	0,00	1	0,01	4	7

33	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	AB	13	0	0,00	1	0,01	4	7
34	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	AB	13	0	0,00	1	0,01	3	8
35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	AB	15	1	0,01	3	0,04	5	8
36	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	AB	12	2	0,03	1	0,01	4	6
37	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	AB	13	3	0,04	2	0,03	4	7
38	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	AB	10	1	0,01	1	0,01	2	6
39	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	AB	12	2	0,03	2	0,03	3	7
40	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	B	12	1	0,01	0	0,00	4	6
41	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	AB	8	1	0,01	0	0,00	1	5
42	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	B	13	2	0,03	0	0,00	5	6
43	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	AB	11	1	0,01	0	0,00	2	7
44	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	B	11	1	0,01	0	0,00	3	6
45	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	B	11	1	0,01	0	0,00	4	5
46	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	AB	8	1	0,01	0	0,00	2	5
47	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	AB	12	1	0,01	0	0,00	2	8
48	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	AB	12	1	0,01	0	0,00	3	7
49	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	AB	10	1	0,01	0	0,00	2	6
50	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	AB	14	1	0,01	0	0,00	4	8
51	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	AB	11	1	0,01	0	0,00	3	6
52	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	AB	10	1	0,01	0	0,00	2	6
53	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	AB	15	1	0,01	0	0,00	6	7
Total indivíduos																		72	67					
Nº genótipos																		35	39					

Tabela 18. Os locos em negrito são aqueles denominados de genes de “moldura”. A cor verde representa a presença do gene e a cor vermelha a ausência deste. A cor amarela destaca a ausência do loco de “moldura” em alguns genótipos. HAP = haplótipo, NG = número de genes por genótipo, REC = receptores, DOA = doadores. ATIV = número de locos ativadores por genótipo, INIB = número de locos inibidores por genótipo. As maiores freqüências estão destacadas em negrito. A presença do loco 2DL4, que codifica uma molécula que aparenta possuir as duas funções de ativador e inibidor foi contabilizado, quando presente, tanto no número de locos ativadores, quanto no número de inibidores.

6.4. IDENTIDADE GENÉTICA PARA OS LOCOS *KIR* COM LIGANTES ESPECÍFICOS *HLA-Cw* ENTRE RECEPTORES E DOADORES

A identidade genética para os locos *KIR* pode ser definida como a presença ou ausência de um determinado loco no receptor e também no doador.

Verificou-se a identidade dos locos *KIR* inibidores e ativadores com ligantes *HLA-Cw* conhecidos. Sendo assim, os locos inibidores *2DL1*, *2DL2* e *2DL3*, e os locos ativadores *2DS1* e *2DS2*, foram analisados. Primeiramente, a análise da equivalência dos locos inibidores (TABELA 19) e ativadores (TABELA 20) entre duplas com e sem rejeição, foi realizada em separado.

Para os locos *KIR* inibidores com ligantes específicos *HLA-Cw*, a comparação dos diferentes níveis de identidade (identidade para os três locos, para pelo menos dois, para pelo menos um e sem nenhuma identidade) entre as duplas com e sem rejeição, mostrou que estes dois grupos são significativamente diferentes ($p = 0,03$; EP = 0,004) (TABELA 19). Tais análises de identidade para os locos inibidores tiveram os testes de contingência repetidos com redução do número de classes agrupando-se em: pelo menos uma identidade; pelo menos duas; identidade para todos os locos e nenhuma identidade. Mesmo assim o teste demonstrou significância ao comparar os grupos com e sem rejeição ($p = 0,006$; EP = 0,001) (estes dados não são mostrados na tabela 19).

TABELA 19. Identidade para locos *KIR* inibidores com ligantes específicos *HLA-Cw* entre duplas com e sem rejeição

INIBIDORES						
2DL1	2DL2	2DL3	Duplas CR	freq	Duplas SR	freq
E	E	E	24	0,41	27	0,66
N	N	N	2	0,03	0	0,00
E	E	N	5	0,08	1	0,02
E	N	E	25	0,42	9	0,22
N	E	E	1	0,02	0	0,00
N	N	E	0	0,00	0	0,00
N	E	N	0	0,00	2	0,05
E	N	N	2	0,03	2	0,05
total			59		41	
p = 0,029260; EP = 0,004541						

Tabela 19. E = dupla com identidade para a presença ou a ausência do loco; N = dupla sem identidade para a presença ou a ausência do loco. Duplas CR = duplas receptor/doador com episódio de rejeição; Duplas SR = duplas sem rejeição. EP = erro padrão.

Dentre os locos *KIR* ativadores com ligantes específicos *HLA-Cw* a comparação entre os grupos com e sem rejeição, também mostrou diferenças significativas ($p = 0,02$; EP = 0,002) (TABELA 20). A mesma análise com o número reduzido de classes (pelo menos um loco com identidade, identidade para todos os locos e nenhuma identidade) continuou a afirmar a significância entre os dois grupos (com e sem rejeição) ($p = 0,006$; EP = 0,001) (dados não mostrados na tabela 20).

TABELA 20. Identidade para os locos *KIR* ativadores com ligantes específicos *HLA-Cw* entre duplas com e sem rejeição

ATIVADORES						
2DS1	2DS2	Duplas CR	freq	Duplas SR	freq	
E	E	21	0,36	26	0,63	
N	N	14	0,24	2	0,05	
E	N	16	0,27	9	0,22	
N	E	8	0,14	4	0,10	
total		59		41		
p = 0,017440; EP = 0,001992						

Tabela 20. E = dupla com identidade para a presença ou a ausência do loco; N = dupla sem identidade para a presença ou a ausência do loco. Duplas CR = duplas receptor/doador com episódio de rejeição; Duplas SR = duplas sem rejeição. EP = erro padrão.

A tabela 21 apresenta os dados referentes à união das combinações de identidade para os locos inibidores (*2DL1*, *2DL2* e *2DL3*) e ativadores (*2DS1* e *2DS2*). Quando comparadas as combinações dos cinco locos, entre duplas com e sem rejeição, os dois grupos mostraram ser significativamente diferentes ($p=0,03$; $EP=0,01$).

TABELA 21. Identidade para os locos *KIR* ativadores e inibidores com ligantes específicos *HLA-Cw* entre duplas com e sem rejeição

INIBIDORES			ATIVADORES		CR	freq	SR	freq
<i>2DL1</i>	<i>2DL2</i>	<i>2DL3</i>	<i>2DS1</i>	<i>2DS2</i>				
E	E	E	E	E	14	0,24	23	0,56
E	E	E	N	N	2	0,03	0	0,00
E	E	E	E	N	1	0,02	1	0,02
E	E	E	N	E	7	0,12	3	0,07
N	N	N	E	E	1	0,02	0	0,00
N	N	N	N	N	0	0,00	0	0,00
N	N	N	E	N	0	0,00	0	0,00
N	N	N	N	E	1	0,02	0	0,00
E	E	N	E	E	4	0,07	1	0,02
E	E	N	N	N	1	0,02	0	0,00
E	E	N	E	N	0	0,00	0	0,00
E	E	N	N	E	0	0,00	0	0,00
E	N	E	E	E	1	0,02	0	0,00
E	N	E	N	N	9	0,15	1	0,02
E	N	E	E	N	15	0,25	8	0,20
E	N	E	N	E	0	0,00	0	0,00
N	E	E	E	E	1	0,02	0	0,00
N	E	E	N	N	0	0,00	0	0,00
N	E	E	E	N	0	0,00	0	0,00
N	E	E	N	E	0	0,00	0	0,00
N	N	E	E	E	0	0,00	0	0,00
N	N	E	N	N	0	0,00	0	0,00
N	N	E	E	N	0	0,00	0	0,00
N	N	E	N	E	0	0,00	0	0,00
N	E	N	E	E	0	0,00	1	0,02
N	E	N	N	N	0	0,00	0	0,00
N	E	N	E	N	0	0,00	0	0,00
N	E	N	N	E	0	0,00	1	0,02
E	N	N	E	E	0	0,00	1	0,02
E	N	N	N	N	2	0,03	1	0,02
E	N	N	E	N	0	0,00	0	0,00
E	N	N	N	E	0	0,00	0	0,00
total					59		41	
p = 0,030960; EP = 0,010566								

Tabela 21. E = dupla com identidade para a presença ou a ausência do loco; N = dupla sem identidade para a presença ou a ausência do loco. Duplas CR = duplas receptor/doador com episódio de rejeição; Duplas SR = duplas sem rejeição. EP = erro padrão. As combinações mais freqüentes entre os receptores e a mais freqüentes entre os doadores estão em negrito.

Foram testadas, dentro dos grupos com rejeição e sem, a presença dos locos *KIR* inibidores nos receptores e seus ligantes específicos nos doadores (condição essa que iremos denominar incompatibilidade *KIR*-Ligante). Para os locos inibidores *KIR*, diferenças significativas na compatibilidade entre os dois grupos CR e SR, não foram encontradas ($p = 0,78$; EP = 0,016) (TABELA 22).

TABELA 22. Incompatibilidade *KIR*-Ligante entre locos *KIR* inibidores do receptor e seu ligante *HLA-Cw* (grupo alélico com LYS-80 = G1 e grupo com ASN-80 = G2) do doador

	INIBIDORES			CR	freq	SR	freq
	2DL1	2DL2	2DL3				
Compatíveis	C	C	C	16	0,27	7	0,17
Incompatíveis	I	I	I	0	0,00	1	0,02
Pelo menos 2	C	C	I	0	0,00	0	0,00
	C	I	I	0	0,00	0	0,00
Pelo menos 1	I	C	C	24	0,41	22	0,54
	I	I	C	0	0,00	0	0,00
	I	C	I	0	0,00	0	0,00
	C	I	I	11	0,19	8	0,20
	N	N	N	2	0,03	1	0,02
	N	C	C	4	0,07	2	0,05
	C	N	N	1	0,02	0	0,00
	?	?	?	1	0,02	0	0,00
			total	59		41	

$p = 0,781640$; EP = 0,015774

Tabela 22. Comparação entre grupos com e sem rejeição quanto a incompatibilidade *KIR*-Ligante. C = doador possui o ligante para o *KIR* do receptor; I = doador não possui o ligante; N = não é possível verificar a compatibilidade devido a limitações na técnica de tipagem; ? = não há correspondência entre dados moleculares e sorológicos.

Com relação aos locos *KIR* ativadores, os grupos com rejeição e sem, também não demonstraram diferenças significativas entre si ($p = 0,76$; EP = 0,012) (TABELA 23).

TABELA 23. Incompatibilidade KIR-Ligante entre os locos *KIR* ativadores do receptor e seu ligante *HLA-Cw* (grupo alélico com LYS-80 = G1 e grupo com ASN-80 = G2) do doador

	ATIVADORES		CR	freq	SR	freq
	2DS1	2DS2				
Compatíveis	C	C	16	0,27	7	0,17
Incompatíveis	I	I	0	0,00	1	0,02
Pelo menos 1	C	I	11	0,19	8	0,20
	I	C	24	0,41	22	0,54
	N	N	2	0,03	1	0,02
	N	C	4	0,07	2	0,05
	C	N	1	0,02	0	0,00
	?	?	1	0,02	0	0,00
	total		59		41	

p = 0,758760; EP = 0,012341

Tabela 23. Comparação entre grupos com e sem rejeição quanto a incompatibilidade KIR-Ligante. C = doador possui o ligante para o *KIR* do receptor; I = doador não possui o ligante; N = não é possível verificar a compatibilidade devido a limitações na técnica de tipagem; ? = não há correspondência entre dados moleculares e sorológicos.

A amostra foi subdividida de acordo com o grau de incompatibilidade (*mismatches* ou MM) HLA entre as duplas receptor/doador: de zero a dois *mismatches* (0-2 MM); com três *mismatches* (3 MM); e de quatro a seis *mismatches* (4-6 MM). Essa divisão da amostra em grupos por incompatibilidade HLA tem como objetivo verificar se a identidade dos locos *KIR* entre receptores e doadores pode influenciar, ou não, na ocorrência dos episódios de rejeição, diminuindo a influência do HLA.

A distribuição em duplas receptor/doador com identidade para os genes *KIR* nos grupos com e sem rejeição (TABELA 24) dentro de grupos subdivididos pelo grau de incompatibilidade HLA (de zero a dois *mismatches* (0-2 MM); com três *mismatches* (3 MM); e de quatro a seis *mismatches* (4-6 MM)) (TABELA 25). Diferenças estatísticas somente foram observadas para os locos: *2DS1*, dentre as duplas com 0-2 MM ($\chi^2=4,047$; $0,05 > p > 0,02$; OR=5,67; IC95%=0,94-34,03) e duplas com 3 MM ($\chi^2=4,744$; $0,05 > p > 0,02$; OR=11,40; IC95%=0,61-211,97); e *2DS2* dentre duplas com 3 MM ($\chi^2=4,494$; $0,05 > p > 0,02$; OR=4,62; IC95%=1,06-20,16).

TABELA 24. Distribuição das identidades dos locos inibidores e ativadores *KIR* entre as duplas com e sem rejeição, com 0-2 MM, 3 MM e 4-6 MM (*Mismatches*) HLA

<i>Mismatches</i> HLA (A, B e DR)	INIBIDORES												ATIVADORES							
	2DL1				2DL2				2DL3				2DS1				2DS2			
	E		N		E		N		E		N		E		N		E		N	
	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR
0-2 MM	11	18	4	1	8	14	7	5	11	17	4	2	9	17	6	2	10	13	5	6
3 MM	31	12	0	1	16	9	15	4	28	11	3	2	22	13	9	0	13	10	18	3
4-6 MM	13	8	0	0	6	6	7	2	10	7	3	1	6	4	7	4	6	5	7	3
total	55	38	4	2	30	29	29	11	49	35	10	5	37	34	22	6	29	28	30	12

Tabela 24. Distribuição entre duplas com identidade (E) e sem identidade (N) para os locos *KIR*, dentre grupos com rejeição (CR) e sem rejeição (SR), estes grupos foram subdivididos de acordo com o grau de incompatibilidade HLA (de 0 a 2 *mismatches* (0-2), 3 *mismatches* (3) e de 4 a 6 *mismatches* (4-6)).

TABELA 25. Comparações das identidades dos locos inibidores e ativadores *KIR* entre as duplas com e sem rejeição, dentro dos grupos com 0-2 MM, 3 MM e 4-6 MM (*Mismatches*) HLA

<i>Mismatches</i> HLA (A, B e DR)		INIBIDORES						ATIVADORES			
		2DL1		2DL2		2DL3		2DS1		2DS2	
		CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR
0-2	E N	$\chi^2=3,061;$ 0,10>p>0,05		$\chi^2=1,520;$ 0,30>p>0,20		$\chi^2=1,503;$ 0,30>p>0,20		$\chi^2=4,047;$ 0,05>p>0,02 OR= 5,67 IC95%=0,94- 34,03		$\chi^2=0,012$ 0,95>p>0,90	
3	E N	$\chi^2=2,440;$ 0,20>p>0,10		$\chi^2=1,159;$ 0,30>p>0,20		$\chi^2=0,296;$ 0,70>p>0,50		$\chi^2=4,744;$ 0,05>p>0,02 OR= 11,40 IC95%=0,61- 211,97		$\chi^2=4,494$ 0,05>p>0,02 OR= 4,62 IC95%=1,06- 20,16	
4-6	E N	$\chi^2=1,513;$ 0,30>p>0,20		$\chi^2=1,683;$ 0,20>p>0,10		$\chi^2=0,359;$ 0,70>p>0,50		$\chi^2=0,029;$ 0,70>p>0,50		$\chi^2=0,531$ 0,50>p>0,30	

Tabela 25. Comparações entre duplas com identidade (E) e sem identidade (N) para cada loco *KIR*, dentro dos grupos com e sem rejeição, somente para as duplas com 0-2 *mismatches*; para duplas com 3 *mismatches* e duplas com 4-6 *mismatches*. Análises com resultado significativo (em negrito) foram submetidas ao OR (*Odds Ratio*). (1 grau de liberdade).

As distribuições das duplas KIR-Ligante compatíveis (onde o doador possui os ligantes *HLA-Cw* específicos para cada loco *KIR* do receptor) e KIR-Ligante incompatíveis (sem correspondência entre os locos *KIR* e seus ligantes foram subdivididos em grupos de acordo com seu grau de incompatibilidade HLA (0-2 MM; 3 MM e 4-6 MM) (TABELA 26). Nenhum dos cinco locos analisados (*2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DS1* e *2DS2*) apresentou diferenças estatisticamente significativas (TABELA 27), quando da comparação dos grupos acima relacionados.

TABELA 26. Distribuição das incompatibilidades KIR-Ligante entre as duplas com e sem rejeição, com 0-2 MM, 3 MM e 4-6 MM(*Mismatches*) HLA

<i>Mismatches</i> HLA (A, B e DR)	INIBIDORES												ATIVADORES							
	2DL1				2DL2				2DL3				2DS1				2DS2			
	C		I		C		I		C		I		C		I		C		I	
	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR
0-2	4	7	7	11	8	14	4	4	9	15	4	4	5	6	7	10	8	13	4	4
3	14	3	13	8	25	10	5	1	25	10	5	1	14	3	14	0	25	10	5	1
4-6	7	3	5	3	10	6	3	2	10	6	3	2	7	3	5	4	10	6	3	1
total	25	13	25	22	43	30	12	7	44	31	12	7	26	12	26	14	43	29	12	6

Tabela 26. Distribuição entre duplas compatíveis (C) e incompatíveis (I) para os locos *KIR* e seus ligantes *HLA-Cw*, dentre grupos com rejeição (CR) e sem rejeição (SR), estes grupos foram subdivididos de acordo com o grau de incompatibilidade HLA (de 0 a 2 *mismatches* (0-2), 3 *mismatches* (3) e de 4 a 6 *mismatches* (4-6)).

TABELA 27. Comparações das incompatibilidades KIR-Ligante entre as duplas com e sem rejeição, dentro dos grupos com 0-2 MM, 3 MM e 4-6 MM (*Mismatches*) HLA

<i>Mismatches</i> HLA (A, B e DR)		INIBIDORES						ATIVADORES			
		2DL1		2DL2		2DL3		2DS1		2DS2	
		CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR
0-2	C	$\chi^2=0,018;$ 0,90>p>0,80		$\chi^2=0,455;$ p=0,50		$\chi^2=0,389;$ 0,70>p>0,50		$\chi^2=0,050;$ 0,90>p>0,80		$\chi^2=0,338;$ 0,70>p>0,50	
	I										
3	C	$\chi^2=1,910;$ 0,20>p>0,10		$\chi^2=0,370;$ 0,70>p>0,50		$\chi^2=0,370;$ 0,70>p>0,50		$\chi^2=2,735;$ 0,10>p>0,05		$\chi^2=0,370;$ 0,70>p>0,50	
	I										
4-6	C	$\chi^2=0,113;$ 0,80>p>0,70		$\chi^2=0,010;$ 0,95>p>0,90		$\chi^2=0,010;$ 0,95>p>0,90		$\chi^2=0,425;$ 0,70>p>0,50		$\chi^2=0,010;$ 0,95>p>0,90	
	I										

Tabela 27. Comparações entre duplas compatíveis (C) e incompatíveis (I) para cada loco *KIR* no receptor e a presença de seu ligante *HLA-Cw* no doador, dentro dos grupos com e sem rejeição, somente para as duplas com 0-2 *mismatches*; para duplas com 3 *mismatches* e duplas com 4-6 *mismatches*.

7. DISCUSSÃO

7.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS DUPLAS RECEPTOR/DOADOR

Neste trabalho, pacientes renais e seus doadores eram predominantemente Caucasóides, o que pode ser reflexo do componente europeu introduzido durante a colonização do estado do Paraná, mais precisamente na região de Curitiba.

Quando testada a distribuição dos sexos, em pacientes renais (receptores) dentro dos grupos com e sem episódios de rejeição, esperava-se que uma proporção similar entre homens e mulheres (1:1) fosse observada. Para o grupo onde as duplas apresentaram rejeição, a distribuição entre homens e mulheres apresentou diferenças significativas ($\chi^2 = 4,898$; $p < 0,05$) (TABELA 6), existindo uma maior proporção de homens (64,41%) com rejeição do que mulheres (35,59%). Estudos epidemiológicos na área de transplante renal têm demonstrado que as taxas de aderência à medicação imunossupressora são distintas entre os sexos (DESENHAERYNK et al., 2007) Outros estudos demonstram uma taxa de não aderência a imunoterapia em 3-7% dos dias monitorados eletronicamente em pacientes adultos renais (NEVINS et al., 2001; FELDMAN et al., 1998; WENG et al., 2005). Desenhaerynk e colaboradores observaram que os homens foram significativamente mais não aderentes à medicação do que mulheres (OR=0,37; IC95%=0,20-0,68), este resultado foi comparado a outros 12 diferentes estudos na literatura, onde destes apenas um observou a situação inversa (DESENHAERYNK et al., 2007). A não aderência a imunossupressão é associada ao aumento do número de episódios de rejeição aguda e à conseqüente falha tardia do enxerto renal (HILBRANDS et al., 1995; DOBBELS et al., 2004; VLAMINCK et al., 2004). Uma outra explicação para uma maior proporção de homens com rejeição poderia estar vinculada a “Hipótese da Hiperfiltração de Brenner” (BRENNER et al., 1992). Essa hipótese leva em conta que o tamanho dos rins e a idade avançada do doador são fatores conhecidos de diminuição da massa funcional do rim (KWON et al., 2005). Sendo assim, um homem recebendo um rim de uma doadora mulher, possuiria uma massa funcional menor (assumindo que mulheres possuem rins menores que o

sexo masculino) e isso pode progredir para a falha do enxerto devido a hipertrofia dos néfrons a fim de compensar a sobrecarga de volume a ser filtrado, e eventualmente conduzindo este órgão a exaustão (TERASAKI et al., 1994).

A análise das médias de idade nos grupos com e sem rejeição mostraram diferenças significativas entre receptores (independentemente do sexo) ($t=2,00$; $p<0,04$) e entre doadores homens ($t=2,16$; $p<0,03$). Uma menor idade entre os receptores é apontada por Desenhaerynk e colaboradores como fator de risco para um maior não aderência à medicação imunossupressora ($OR=0,96$; $IC95\%=0,94-0,99$) e conseqüente aumento no número de episódios de rejeição aguda (DESENHAERYNK et al., 2007). Kwon e colaboradores observaram que a idade avançada de doadores é um fator de risco para a sobrevida a longo prazo do aloenxerto ($p<0,0000$) (KWON et al., 2005). Vários estudos relatam a rejeição aguda como sendo o principal fator para diminuição da sobrevida do órgão transplantado (JIN et al., 1996; KIM et al., 2004; PARK et al., 2004; AKIOKA et al., 2005). Entretanto, outros estudos não encontraram diferenças entre as médias de idade de doadores em relação a sobrevida do enxerto e relatam apenas uma diminuição relativa na taxa de filtração glomerular (De La Vega et al., 2004). Estudos relacionando diretamente o sexo e a idade do doador com a presença e a ausência de episódios de rejeição aguda não foram encontrados.

Diferentemente de alguns trabalhos que sugerem que diferenças entre as idades de receptores e doadores possuem uma forte influência na taxa de sobrevida do enxerto, a análise da média das diferenças das idades entre receptores e doadores (na época do transplante) não mostrou diferenças significativas em nosso estudo ($t=0,20$; $p>0,83$).

Os diferentes graus de parentesco entre receptores e doadores foram uniformemente distribuídos nos grupos com e sem rejeição ($0,50>p>0,30$), resultado este muito similar ao encontrado por Park e colaboradores (PARK et al., 2004).

7.2. FREQUÊNCIA DOS GENES *KIR*

Nota-se que as frequências de presença dos genes para moléculas inibidoras é superior à dos genes de moléculas ativadoras, isso tanto em receptores quanto em doadores. Em ambos os grupos (receptores e doadores) alguns locos *KIR* conhecidos como “genes de moldura”, apresentaram frequências distintas de 100%. Na literatura específica pode-se constatar que os genes de moldura estão virtualmente presentes em 100% dos haplótipos (VILCHES, et al., 2000; WILSON et al., 2000; TROWSDALE, et al., 2001; VILCHES, et al., 2002). No entanto, em nosso trabalho a frequência da presença destes locos variou entre 97 e 100%. Alguns estudos populacionais não realizam a tipagem para estes “genes de moldura” (COOK et al., 2003), talvez por possuírem uma frequência esperada de 100%.

A grande similaridade das distribuições de frequência dos *KIR* inibidores e ativadores, entre a população do Paraná e as populações Caucásoides da literatura (da França e do Reino Unido), podem refletir não só a predominância de caucásoides na amostra como o tipo de colonização ocorrida na região. A ocupação do estado se deu de forma paulatina, onde imigrantes de origem europeia (portugueses, italianos, alemães, poloneses e ucranianos) constituíram um dos componentes principais (caucásioide) na formação da população paranaense (MICHAELE, 1969). Outros componentes como o negróide, constituído por escravos trazidos da África, (pequeno no início da colonização, contudo crescente nos dias atuais) que mesmo sendo de suma importância foi estatisticamente demonstrado que a proporção deste componente em relação ao caucásioide é significativamente menor (CULPI & SALZANO, 1984; PROBST et al., 2000). O componente indígena da população do Paraná é formado por três tribos Guarani, Kaingang e Xetá. Todas elas sofreram uma drástica redução no tamanho populacional devido à colonização e atualmente sobrevivem em pequenas reservas no estado. A história da colonização do estado demonstra uma grande parcela de contribuição do componente caucásioide (europeu) na formação da população paranaense, contudo sugere também que outros componentes como o indígena e o negróide tenham grande importância na diversidade apresentada no estado.

7.3. HAPLÓTIPOS A e B

Em estudos anteriores a frequência de indivíduos AA foi de 42% na população caucasóide (TONEVA et al., 2001), 57% na população senegalesa (DENIS et al., 2005) e 58,7% na população chinesa (JIANG et al., 2005), enquanto que no presente estudo a frequência observada foi de 28% dos indivíduos AA no grupo dos receptores, já dentre os doadores esta frequência foi de 34% AA (TABELA 19). Esta ampla variação nas frequências observadas demonstra uma clara diferença na distribuição dos homozigotos AA entre caucasóides e outras etnias.

A comparação das frequências de cada haplótipo entre os receptores e doadores não demonstrou diferenças significativas ($p_1=0,68$; $EP=0,01$), também foram comparadas estas frequências em relação à presença ou a ausência da rejeição ao alotransplante, onde nenhuma das três análises mostrou significância, como se segue: receptores com rejeição x doadores com rejeição ($p_2=0,10$; $EP=0,004$); receptores sem rejeição x doadores sem rejeição ($p_3=0,35$; $EP=0,009$) e receptores com rejeição x receptores sem rejeição ($p_4=0,18$; $EP=0,006$). Isto sugere que devido à proximidade dos valores de p_2 e p_4 do valor de p de 0,05, o que significaria diferenças entre os dois grupos analisados estatisticamente significantes, seria interessante aumentar o tamanho amostral a fim de aumentar a confiabilidade estatística.

7.4. GENÓTIPOS

Próximo ao número de genótipos observado na população do Reino Unido (44 genótipos) (COOK et al., 2003), observamos 39 diferentes genótipos na população do presente estudo (TABLE 2). Os dois genótipos mais frequentes (genótipo 10 e 12, observados em 9% dos indivíduos), foram também observados em frequências relativamente altas na população caucasóide da França (13%) (DENIS et al., 2005), do Reino Unido (13%) (COOK et al., 2003) e de negróides de Senegal (17%) (DENIS et al., 2005). Outros genótipos com frequência alta nas populações caucasóides do Reino Unido (25%) e na população Afro-caribenha (27%), possuem uma frequência bastante

reduzida na amostra estudada (1%). No total a média de presença dos genes ativadores foi menor (3,62) do que a observada para genes inibidores (7,00) dentro dos genótipos encontrados. Estas médias estão próximas às da população da Finlândia (3,07 para os ativadores e 6,79 para os inibidores), de Guadeloupe (2,88 e 7,01) e francesa (2,84 para os ativadores). Toda essa diversidade e similaridade das freqüências dos genes, haplótipos e genótipos KIR encontradas no presente estudo demonstram a extensa miscigenação de etnias que forma a população paranaense.

7.5. IDENTIDADE GENÉTICA *KIR* E INCOMPATIBILIDADE KIR-LIGANTE

A morte de células autólogas mediada por células NK é prevenida pelo reconhecimento de grupos alélicos HLA próprios por receptores KIR inibidores co-expressos por células NK (RUGGERI et al., 2004A). A distribuição clonal dos receptores KIR dá origem a subpopulações de células NK que expressam exclusivamente um receptor KIR cujo reconhecimento do ligante cognato presente em uma célula alvo (própria ou não-própria) resultará na inibição funcional da célula NK. Entretanto, a ausência deste ligante resultará na sua ativação e a conseqüente lise da célula alvo (DUPONT & HSU, 2004).

No presente estudo, comparações referentes à identidade genética entre duplas receptor/doador, para os locos *KIR* com ligantes específicos *HLA-Cw* (*2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DS1* e *2DS2*) nos grupos com e sem rejeição demonstram que a distribuição da identidade genética das duplas para os locos inibidores ($p=0,029$; $EP=0,0045$) (TABELA 21), ativadores ($p=0,017$; $EP=0,0019$) (TABELA 22) e em conjunto (inibidores + ativadores) ($p=0,03$; $EP=0,010$) (TABELA 23) foi significativamente diferente. Dentre os locos inibidores, se analisarmos as freqüências das diferentes combinações de identidade KIR, verificamos que o grupo das duplas sem rejeição possui uma freqüência maior de indivíduos com os três locos com identidade (66%) do que o grupo com rejeição (41%). Diferentemente, a combinação onde os locos *2DL1* e *2DL3* possuem identidade e não a possuem para o loco *2DL2*, apresentou uma maior freqüência para as duplas com rejeição (42%) do que as duplas sem (22%). As duplas sem identidade para o loco *2DL2* possuem probabilidades 2,64 vezes maiores de apresentarem episódios de rejeição do que pares receptor/doador com identidade para este mesmo loco ($OR=2,64$; $IC95\%=1,12-6,22$). O mesmo foi observado durante a análise dos locos ativadores, onde duplas sem identidade para o gene *2DS1* têm probabilidades 3,47 vezes maiores de sofrerem rejeição do que duplas com identidade ($OR=3,47$; $IC95\%=1,26-9,56$), e 2,82 vezes mais probabilidades quando não possuíram identidade para o gene *2DS2* ($OR=2,82$; $IC95\%=1,20-6,66$). As duplas com rejeição apresentaram uma maior freqüência da combinação onde os dois locos (*2DS1* e *2DS2*)

possuem identidade (24%), do que as duplas sem rejeição (5%). O contrário é observado nas duplas sem rejeição, onde a combinação dos dois genes sem identidade possui uma maior frequência neste grupo (63%) quando comparada as duplas com rejeição (36%). Para os demais genes (*2DL1* e *2DL3*) a razão de risco relativo não foi significativa. Estes dados sugerem que os genes para os quais o risco relativo foi significativo (*2DL2*, *2DS1* e *2DS2*) possam ter uma maior contribuição no controle da aloreatividade mediada pelas células NK.

A fim de reduzir a influência da incompatibilidade *HLA* na análise da identidade dos genes *KIR* entre receptores e doadores e a ocorrência de episódios de rejeição, a amostra foi dividida segundo o grau de incompatibilidade *HLA* apresentado pela dupla (0-2 MM; 3 MM e 4-6 MM). A comparação das identidades dos genes *KIR*, dentre as duplas com 0-2 *mismatches*, entre os grupos com e sem rejeição (TABELA 27) mostrou diferenças significativas na distribuição das duplas somente para o loco ativador *2DS1* ($\chi^2=4,047$; $0,05 > p > 0,02$; OR=5,67; IC95%=0,94-34,03). Para as duplas com 3 MM essa mesma comparação (TABELA 23 e 24) mostrou diferenças significativas na distribuição das duplas somente para os locos ativadores *2DS1* ($\chi^2=4,744$; $0,05 > p > 0,02$; OR=11,40; IC95%=0,61-211,97) e *2DS2* ($\chi^2=4,494$; $0,05 > p > 0,02$; OR=4,62; IC95%=1,06-20,16). A análise de risco relativo para os diferentes locos somente mostrou significância para o loco *2DS2* dentre duplas com 3 MM *HLA*, o que significa que duplas deste grupo, sem identidade para o loco *2DS2*, possuem uma probabilidade de 4,62 vezes mais de apresentarem episódios de rejeição.

Outros estudos na literatura envolvendo genes *KIR* e transplantes objetivam suas análises na incompatibilidade KIR-Ligante, e não realizam comparações da identidade dos genes *KIR* entre as duplas receptor/doador, o que dificulta que os dados do presente trabalho sejam comparados com dados de outros estudos.

A incompatibilidade KIR-Ligante pode ser definida como a ausência no doador de grupos alélicos *HLA* de classe I reconhecidos pelos receptores *KIR* das células NK do receptor. Essa definição considera a hipótese de que a incompatibilidade KIR-Ligante poderia influenciar a aloreatividade anti-doador mediada por células NK do receptor e conseqüentemente alterar a taxa de sobrevivência do aloenxerto (HIEN TRAN et al., 2005).

Quanto à incompatibilidade KIR-ligante entre pacientes e seus doadores, os locos inibidores foram igualmente distribuídos entre os grupos com e sem rejeição ($p=0,78$; $EP=0,015$) (TABELA 24). O mesmo ocorreu para os locos ativadores ($p=0,75$; $EP=0,012$) (TABELA 25). A análise da incompatibilidade KIR-Ligante quando novamente realizada com a amostra subdividida quanto ao grau de incompatibilidade HLA (0-2 MM, 3 MM e 4-6 MM) (TABELA 28 e 29) também não mostrou diferenças nas distribuições das duplas entre os grupos com e sem rejeição para nenhum dos cinco locos analisados. Estes resultados estão de acordo com os resultados apresentados por Hien Tran e colaboradores, onde a análise multivariada de transplantados renais sugere uma ausência de efeito da incompatibilidade KIR-Ligante na variação da taxa de sobrevivência do aloenxerto (HIEN TRAN et al., 2005). Esta mesma observação foi relatada por Bishara e colaboradores em transplantes de células precursoras hematopoéticas HLA haploidênticos (BISHARA et al., 2004). Um estudo relacionando a atividade das células NK, em pacientes renais, com KIR e mismatches HLA, observaram que de 6 pacientes onde a citotoxicidade mediada por células NK após o transplante diminuiu, 4 destes não possuíam KIR ativadores que reconhecessem ligantes HLA I do doador. E dentre 15 pacientes onde esta citotoxicidade aumentou após o transplante, 10 possuíam pelo menos 1 KIR ativador com o correspondente ligante HLA I no doador (VAMPA et al., 2005). Estes dados sugerem um papel da incompatibilidade KIR-Ligante na aloreatividade anti-doador mediada por células NK. Na literatura, poucos trabalhos avaliam as relações dos genes *KIR* e seus ligantes em transplante renal. Grande parte dos estudos envolvendo genes *KIR* e transplante foram realizados em transplante de células precursoras hematopoéticas (DAVIES et al., 2002; GIEBEL et al., 2003; BISHARA et al., 2004; DUPONT & HSU, 2004; RUGGERI et al., 2004A, 2004B, 2005 e 2006; HOWE et al., 2005; FARAG et al., 2006) O papel da incompatibilidade KIR-Ligante em transplante de células precursoras hematopoéticas é analisado sob o enfoque da aloreatividade de células NK do doador contra células do receptor que não apresentam o ligante específico para estas células NK. Essa incompatibilidade KIR-Ligante direcionada para a Doença do Enxerto versus Paciente (GvHD, do inglês *Graft versus Host Disease*) neste tipo de transplante possui uma potencial atividade

antileucêmica (BISHARA et al., 2004; DUPONT & HSU, 2004; RUGGERI et al., 2004A, 2004B, 2005 e 2006; HOWE et al., 2005; FARAG et al., 2006). Alguns destes estudos têm sugerido que essa incompatibilidade KIR-Ligante que possa originar uma aloreatividade do doador contra o receptor, possa ser utilizada como uma ferramenta terapêutica contra a reincidência de Leucemia Mielóide Aguda (LMA), já que vários destes trabalhos apontam uma reduzida taxa de reincidência de LMA quando a dupla receptor/doador é KIR-Ligante incompatível no sentido da GvHD (falta do ligante HLA I no receptor para o KIR na célula NK do doador) (LEUNG, et al., 2004; RUGGERI et al., 2004, 2006). Isto sugere que a situação inversa também seja verdadeira no transplante renal, onde aloreações anti-doador mediadas por células NK do receptor poderiam estar destruindo as células do enxerto, contudo os poucos estudos não observaram variações na taxa de sobrevida do enxerto quando duplas com potencial aloreatividade NK na direção da rejeição foram comparadas (BISHARA et al., 2004).

Os dados apresentados neste trabalho sugerem um papel secundário da aloreatividade das células NK, modulada por interações dos receptores KIR e seus ligantes HLA-Cw, no processo de rejeição aguda ao aloenxerto renal. Entretanto, análises de identidade dos locos KIR entre receptores e doadores, indicam que a relação do número de receptores inibidores e ativadores entre receptores e doadores possa influenciar na ocorrência dos episódios de rejeição. Acredita-se que Isso se deva, em parte, a esta proporção do número de receptores inibidores sobre o número de receptores ativadores, e a receptores KIR cujo ligantes não são bem conhecidos, ou mesmo a outros receptores das células NK que modulam sua ação citolítica. Outros fatores como: a não aderência à medicação imunossupressora de alguns pacientes com conseqüente aloreação mediada por células T residuais e a ampla diversidade de protocolos de imunossupressão podem contribuir também para um aumento da ocorrência dos episódios de rejeição aguda ao aloenxerto renal.

A fim de colher subsídios que possam auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvendo o alorreatividade de células NK que possam contribuir para a ocorrência de episódios de rejeição, pretende-se dar continuidade ao presente trabalho. Perspectivas futuras pretendem:

- Analisar a identidade genética *KIR* para os locos inibidores e ativadores (não sendo um gene de moldura) aqui não analisados (*2DL5*, *2DL3*, *3DL1*, *2DS3*, *2DS4*, *2DS5* e *3DS1*), criando um modelo que possa explicar diferenças significativas observadas;

- Investigar a relação do número de locos *KIR* inibidores e locos *KIR* ativadores, entre receptores e doadores, a fim de investigar se: um menor número de locos inibidores e/ou um maior número de locos ativadores no grupo de receptores pode influenciar na presença da rejeição aguda a aloenxertos renais;

- Aprofundar o conhecimento das interações entre os receptores *KIR2DS* e seus ligantes *HLA-Cw*;

- Analisar a incompatibilidade *KIR*-Ligante para outros locos *KIR* com ligantes conhecidos (locos inibidores *KIR3DL1* com ligante específico *HLA-Bw4* e *KIR2DL4* com ligante *HLA-G*);

- Investigar a existência de Incompatibilidades *KIR*-Ligante entre a dupla receptor/doador que justificariam a ocorrência de episódios de rejeição;

- Avaliar o papel de outros receptores das células NK com ligantes *HLA* e relacionados, na ocorrência da rejeição aguda a aloenxertos renais;

8. CONCLUSÃO

A análise dos Perfis KIR nas amostras de pacientes transplantados renais e seus doadores, com e sem episódios de rejeição, permitiu as seguintes conclusões:

- Ambas amostras de receptores e de doadores (predominantemente caucasóides) possuem perfis *KIR* com frequências observadas diferentes daquelas observadas em populações negróides e orientais, previamente estudadas e disponíveis na literatura;
- Duplas onde não há identidade *KIR* entre receptores e doadores para o loco inibidor *KIR2DL2*, possuem uma probabilidade 2.64 vezes maior de ocorrência de episódios de rejeição aguda do que as duplas onde há identidade;
- A probabilidade de ocorrência de episódios de rejeição aguda é 3,47 vezes maior em duplas onde não há identidade *KIR* para o loco ativador *KIR2DS1* e 2,82 vezes maior em duplas onde não há identidade *KIR* para o loco ativador *KIR2DS2*;
- Considerando-se apenas as duplas HLA haploidênticas, a não identidade *KIR* para o loco *KIR2DS2* proporciona uma probabilidade 4,62 vezes maior na ocorrência de episódios de rejeição aguda;
- Não foi encontrada relação entre a incompatibilidade-KIR-Ligante para os locos *KIR* (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DS1* e *KIR2DS2*) e a ocorrência de episódios de rejeição aguda em pacientes transplantados renais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

AKIOKA, K.; TAKAHARA, S.; ICHIKAWA S. Factors predicting long-term graft survival after kidney transplantation: multicenter study in Japan. **World J Surg** 27: 2005.

ARAMBURU, J.; BALBOA, M. A.; RAMIREZ, A.; SILVA, A.; ACEVEDO, A. A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor- γ/δ +T lymphocytes. I. Inhibition of the IL-2 dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody. **J. Immunol.** 144:3238–47; 1990.

BAHRAM, S.; BRESNAHAN, M.; GERAGHTY, D. E.; SPIES, T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 91:6259–63; 1994.

BARTEN, R.; TORKAR, M.; HAUDE, A.; TROWSDALE, J.; WILSON, M. J. Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors. **Trends Immunol** 22:52–57; 2001.

BARTEN, R.; TROWDALE, J. The human Ly-49L gene. **Immunogenetics** 49:731–734; 1999.

BAUER, S.; GROH, V.; WU, J.; STEINLE, A.; PHILLIPS, J. H. Activation of natural killer cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. **Science** 85:727–30; 1999.

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

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

BERTONE, S.; SCHIAVETTI, F.; BELLOMO, R.; VITALE, C.; PONTE, M.; MORETTA, L.; MINGARI, M. C. Transforming growth factor- β -induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptors in human T lymphocytes. **Eur. J. Immunol** 29:23–29; 1999.

BISHARA, A.; DE SAINT, D.; WITT, C.C.; BRAUTBAR, C.; CHRISTIANSEN F.T.; OR, R.; NAGLER, A.; SLAVIN, S. The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically mismatched stem cell allografts may be masked by residual donor-alloreactive T cells causing GvHD. **Tissue Antigens** 63: 204-211; 2004.

BISHARA, A.; De SANTIS, D.; WITT, C. C.; BRAUTBAR, C.; CHRISTIANSEN, F. T.; OR, R.; NAGLER, A.; SLAVIN, S. The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically mismatched stem cell allografts may be masked by residual

donor-alloreactive T cells causing GVHD. **Tissue Antigens** 63: 204-211; 2004.

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

BOTTINO, C.; CASTRICONI, R.; PENDE, D.; RIVERA, P.; NANNI, M. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1(CD226) activating molecule. **J.Exp. Med.** 198:557–67; 2003.

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

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

BRENNER, B.M.; COHEN, R.A.; MILFORD, E.L. In renal transplantation, one size may not fit all. **J Am Soc Nephrol** 3: 162; 1992.

BROWN, M. H.; BOLES, K.; ANTON VAN DER MERWE, P.; KUMAR, V.; MATHEW, P. A.; BARCLAY, N. A. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. **J. Exp. Med.** 188:2083–90; 1998.

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

BUCKLEY, R. H. Transplantation immunology: Organ and bone marrow. **J ALLERGY CLIN IMMUNOL** 2003

BURNS, G. F.; TRIGLIA, T.; WERKMEISTER, J. A.; BEGLEY, C. G.; BOYD, A. W. TLiSA1, a human T lineage-specific activation antigen involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes and anomalous killer cells from their precursors. **J. Exp. Med.** 161:1063–78; 1985.

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

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

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

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

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

2003.

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

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

COLONNA, M.; NAVARRO, F.; BELLON, T.; LLANO, M.; GARCIA, P. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J. Exp. Med.* 186:1809–18; 1997.

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

COOK, M.A.; MOSS, P.A.H.; BRIGGS, D.C. The distribution of 13 killer-cell immunoglobulin-like receptor loci in UK blood donors from three ethnic groups. *European Journal of Immunogenetics* 30: 213-221; 2003.

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

CORREA, I.; RAULET, D. H. Binding of diverse peptides to MHC class I molecules inhibits target cell lysis by activated natural killer cells. *Immunity* 2:61–71; 1995.

COSMAN, D.; FANGER, N.; BORGES, L.; KIBIN, M.; CHIN, W. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 7:273–82; 1997.

COSMAN, D.; MULLBERG, J.; SUTHERLAND, C. L.; CHIN, W.; ARMITAGE, R. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14:123–33; 2001.

D'ANDREA, A.; CHANG, C.; FRANZ-BACON, K.; McCLANAHAN, T.; PHILLIPS, J. H.; LANIER, L. L. Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. *J Immunol* 155:2306–2310; 1995.

DANIELS, B. F.; KARLHOFER, F. M.; SEAMAN, W. E.; YOKOYAMA, W. M. A natural killer cell receptor specific for a major histocompatibility complex class I molecule. *J Exp Med* 180:687–692; 1992.

DAVIES, S.M.; RUGGIERI, L.; DE FOR, T. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. *Blood* 100: 3825; 2002.

DE LA VEGA, L.S.; TORRES, A.; BOHORQUEZ, H.E.; HEIMBACH, J.K.; GLOOR, J.M.; SCHWAB, T.R.; TALER, S.J.; NYBERG, S.L.; ISHITANI, M.B.; PRIETO, M.; VELOSA, J.A.; LARSON, T.S.; STEGALL, M.D.; COSIO, F.G.; TEXTOR, S.C.; GRIFFIN, M.D.

Patient and graft outcomes from older living kidney donors are similar to those from younger donors despite lower GFR. *Kidney Int* 66: 1654-1661; 2004.

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

DENIS, L.; SIVULA, J.; GOURRAUD, P.A.; KERDUDOU, N.; CHOUT, R.; RICARD, C.; MOISAND, J.P.; GAGNE, K.; PARTANEN, J.; BIGNON, J.D. Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Réunion. *Tissua Antigens* 66: 267-276; 2005.

DERRE, L.; CORVAISIER, M.; PANDOLFINO, M. C.; DIEZ, E.; JOTEREAU, F.; GERVOIS, N. Expression of CD94/NKG2-A on human T lymphocytes is induced by IL-12: implications for adoptive immunotherapy. *J. Immunol.* 168:4864-70; 2002.

DESENHAERYNK, K.; STEIGER, J.; BOCK, A.; SCHÄFER-KELLER, P.; KÖFER, S.; THANNBERGER, N.; DE GEEST, S. Prevalence and risk factors of non-adherence with immunosuppressive medication in kidney transplant patients. *American Journal of Transplantation* 7: 108-116; 2007.

DIEFENBACH, A.; JENSEN, E. R.; JAMIESON, A. M.; RAULET, D. H. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 413:165-71; 2001.

Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/dsra/integram.htm> Acesso em: Julho de 2006.

Disponível em: <http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?268> Acesso em: Julho de 2006.

DOBBELS, F.; DE GEEST, S.; VAN CLEEMPUT, J.; DROOGNE, W.; VANHAECKE, J. Effect of late medication non-compliance on outcome after heart transplantation: a 5-year follow-up. *J Heart Lung Transplant* 23: 1245-1251; 2004.

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

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

DUPONT, B.; HSU, K.C. Inhibitory killer Ig-like receptor genes and human leukocyte antigen class I ligands in haematopoietic stem cell transplantation. *Current Opinion in Immunology* 16: 634-643; 2004.

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

FAN, Q. R.; LONG, E. O.; WILEY, D. C. Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. *Nat Immunol* 2:452; 2001.

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

FAN, Q.R.; LONG, E.O.; WILEY, D.C. Crystal structure of the human natural killer inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. **Nat Immunol** 2: 452-460; 2001.

FARAG, S.; BACIGALUPO, A.; EAPEN, M.; HURLEY, C.; DUPONT, B.; CALIGIURI, M.A.; BOUDREAU, C.; NELSON, G.; OUDSHOORN, M.; VAN ROOD, F.; VELARDI, A.; MAIERS, M.; SETTERBOLM, M.; CONFER, D.; POSCH, P.E.; ANASETTI, C.; KAMANI, N.; MILLER, J.S.; WEIDORF, D.; DAVIES, S.M. The effect of kir ligand incompatibility on the outcome of unrelated donor transplantation: a report from the Center For International Blood and Marrow Transplant Research, the European Blood and Marrow Transplant Registry, and Dutch Registry. **Biology of Blood and Marrow Transplantation** 12: 876-884; 2006.

FELDMAN, H.I.; HACKETT, M.; BILKER, W.; STROM, B.L. Potential utility of electronic drug compliance monitoring in measures of adverse outcomes associated with immunosuppressive agents. **Pharmacoepidemiol Drug Saf** 8: 1-14; 1999.

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

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

GARNI-WAGNER, B. A.; PUROHIT, A.; MATHEW, P. A.; BENNETT, M.; KUMAR, K. A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. **J. Immunol.** 151:60–70; 1993.

GIEBEL, S.; LOCATELLI, F.; LAMPARELLI, T. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. **Blood** 102: 814; 2003.

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

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

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

HIEN TRAN, T.; MYTILINEOS, J.; SCHERER, S.; LAUX, G.; MIDDLETON, D.; OPELZ,

G. Analysis of KIR ligand incompatibility in Human Renal Transplantation. ***Transplantation*** 80: 1121-1123; 2005.

HILBRANDS, L.B.; HOITSMA, A.J.; KOENE, R.A. Medication compliance after renal transplantation. ***Transplantation*** 60: 914-920; 1995.

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

HOUCHINS, J. P.; YABE, T.; MCSHERRY, C.; BACH, F. H. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. ***J. Exp. Med.*** 173:1017–20; 1991.

HOWE, E.C.; WLODARSKI, M.; BALL, E.J.; RYBICKI, L.; MACIEJEWSKI, J.P. Killer immunoglobulin-like receptor genotype in immune-mediated bone marrow failure syndromes. ***Experimental Hematology*** 33: 1357-1362; 2005.

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

HSU, K. C.; LIU, X. R.; SELVAKUMAR, A.; MICKELSON, E.; O'RELLY, R. J.; DUPONT, B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. ***J Immunol*** 169:5118; 2002B.

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

JAN CHALUPNY, N.; SUTHERLAND, C. L.; LAWRENCE, W. A.; REIN-WESTON, A.; COSMAN, D. ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.*** 305:129–35; 2003.

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

JIANG, K.; ZHU, F.M.; LV, Q.F.; YAN, L.X. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population. ***Tissue Antigens*** 65: 556-563; 2005.

JIN, D.C.; YOON, Y.S.; KIM, Y.S. Factors on graft survival of living donor kidney transplantation in a single centre. ***Clin Transplant*** 10: 471; 1996.

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

KARLHOFER, F. M.; RIBAUDO, R. K.; YOKOYAMA, W. M. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49 IL-2-activated natural killer cells. ***Nature*** 358:66–70; 1992.

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

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

KHAKOO, S. I. et al. Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans. **Immunity** 12:687–698; 2000.

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

KIM, S.J.; LEE, H.H.; LEE, D.S. Prognostic factors affecting graft and patient survival in cadaveric and living kidney transplantation. **Transplant Proc** 36: 2038; 2004.

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

KUBIN, M. Z.; PARSHLEY, D. L.; DIN, W.; WAUGH, J. Y.; DAVIS-SMITH, T. Molecular cloning and biological characterization of NK cell activation-inducing ligand, a counterstructure for CD48. **Eur. J. Immunol.** 29:3466–77; 1999.

KWON, O.J.; KWAK, J.Y.; KANG, C.M. The impact of gender and age matching for long-term graft survival in living donor renal transplantation. **Transplantation Proceedings** 37: 726-728; 2005.

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

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

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

LANIER, L. L.; CORLISS, B.; PHILLIPS, J. H. Arousal and inhibition of human NK cells. **Immunol. Rev.** 155:145–54, 1997.

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

LATCHMAN, Y.; MCKAY, P. F.; REISER, H. Identification of the 2B4 molecule as a counter-receptor for CD48. **J. Immunol.** 161:5809–12; 1998.

LEUNG, W.; IYENGAR, R.; TURNER, V.; LANG, P.; BADER, P.; CONN, P.; NIETHAMMER, D.; HANDGRETINGER, R. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. **J Immunol** 172: 644-650; 2004).

LIAO, N. S.; BIX, M.; ZIJLSTRA, M.; JAENISCH, R.; RAULET, D. MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. **Science** 253:199–202; 1991.

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

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

LONG, E. O. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. **Annu Rev Immunol** 17:875–904; 1999.

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

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

MAKRIGIANNIS, A. P.; PAU, A. T.; SCHWARTZBERG, P. L.; McVICAR, D. W.; BECK, T. W.; ANDERSON, S. K. A BAC contig map of the Ly49 gene cluster in 129 mice reveals extensive differences in gene content relative to C57BL/6 mice. **Genomics** 79:437–444; 2002.

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

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

MARTIN, M. P.; BASHIROVA, A.; TRAHERNE, J.; TROWSDALE, J.; CARRINGTON, M. Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over. **J Immunol** 171:2192-2195; 2003.

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

MASSON, D.; JARRY, A.; BAURY, B.; BLANCHARDIE, P.; LABOISSE, C. Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma. **Gut** 49:236–40; 2001.

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

McENERY, P.; STABLEIN, D.; ARBUS, G.; TEJANI, A. Renal transplantation in children.

N Engl J Med 326:1727-32; 1992.

MICHAELE, F. A. S. Formação étnica do Paraná. In: EL-KHATIB, F. **História do Paraná** v.3 Curitiba: Editora Grafipar, 1969. p. 71-142

MIDDLETON, D.; WILLIAMS, F.; HALFPENNY, I. A. KIR genes. **Transplant Immunology** 14 :135 – 142; 2005.

MINGARI, M. C.; PONTE, M.; BERTONE, S.; SCHIAVETTI, F.; VITALE, C. HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin-15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 95:1172–77; 1998.

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

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

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

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

MORETTA, L.; ROMAGNANI, C.; PIETRA, G.; MORETTA, A.; MINGARI, M. C. NK-CTL, a novel HLA-E-restricted T cell subset. **Trends Immunol** 24:136-143; 2003.

NAKAJIMA, H.; CELLA, M.; LANGEN, H.; FRIEDLEIN, A.; COLONNA, M.; Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. **Eur. J. Immunol.** 29:1676–83; 1999.

NEVINS, T.E.; KRUSE, L.; SKEANS, M.A.; THOMAS, W. The natural history of azathioprine compliance after renal transplantation. **Kidney Int** 60: 1565-1570; 2001.

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

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

PARK, Y.H.; MIN, S.K.; LEE, J.N.; LEE, H.H.; JUNG, W.K.; LEE, J.S.; LEE, J.H.; LEE, Y.D. Risk factors on graft survival of living donor kidney transplantation. **Transplant**

Proc 36: 2023; 2004.

PERITT, D.; SESOK-PIZZINI, D. A.; SCHRETZENMAIR, R.; MACGREGOR, R. R.; VALIANTE, N. M. C1.7 antigen expression on CD8+ T cells is activation dependent: increased proportion of C1.7+CD8+ T cells in HIV-1-infected patients with progressing disease. **J. Immunol.** 162:7563–68 1999.

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

RAULET, D. H.; VANCE, R. E.; McMAHON, C. W. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. **Annu Rev Immunol** 19:291-330; 2001.

REYMOND N, IMBERT AM, DEVILARD E, FABRE S, CHABANNON C. DNAM-1 and PVRL1 regulate monocyte migration through endothelial junctions. **J. Exp. Med.** 199:1331–41; 2004.

RUGGERI, L.; CAPANNI, M.; MANCUSI, A.; AVERSA, F.; MARTELLI, M.F.; VELARDI, A. The impact of donor natural killer cell alloreactivity on allogeneic hematopoietic transplantation. **Transplant Immunology** 14: 203-206; 2005.

RUGGERI, L.; CAPANNI, M.; MANCUSI, A.; AVERSA, F.; MARTELLI, M.F.; VELARDI, A. Natural killer cells as a therapeutic tool in mismatched transplantation. **Best Practice & Research Clinical Haematology** 17: 427-438; 2004B.

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

RUGGERI, L.; MANCUSI, A.; URBANI, E.; BURCHIELLI, E.; PERRUCCIO, K.; AVERSA, F.; MARTELLI, M.F.; VELARDI, A. Natural killer cell recognition of missing self and haploidentical hematopoietic transplantation. **Seminars in Cancer Biology** 16: 404-411; 2006.

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

SAULQUIN, X.; GASTINEL, L.N.; VIVIER, E. Crystal structure of the human natural killer cell activator receptor KIR2DS2(CD158j). **J Exp Med** 197: 933-938; 2003.

SCOTT, J. L.; DUNN, S. M.; HILLAM, A. J.; WALTON, S.; BERNDT, M. C. Characterization of a novel membrane glycoprotein involved in platelet activation. **J. Biol. Chem.** 264:13475–82; 1989.

SELVAKUMAR, A.; STEFFENS, U.; DUPONT, B. NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains.

Tissue Antigens 48:285-94; 1996.

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

SELVAKUMAR, A.; STEFFENS, U.; PALANISAMY, N.; CHAGANTI, R. S.; DUPONT, B. Genomic organization and allelic polymorphism of the human killer cell inhibitory receptor gene KIR103. **Tissue Antigens** 49:564; 1997B.

SHIBUYA, A.; CAMPBELL, D.; HANNUM, C.; YSSEL, H.; FRANZ-BACON, K.

DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. **Immunity** 4:573–81; 1996.

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

SHIMIZU, Y.; DeMARS, R. Demonstration by class I gene transfer that reduced susceptibility of human cells to natural killer cell-mediated lysis is inversely correlated with HLA class I antigen expression. **European Journal of Immunology** 19:447; 1989.

SHUM, B. P.; FLODIN, L. R.; MUIR, D. G.; RAJALINGAM, R.; KHAKOO, S. I. Conservation and variation in human and common chimpanzee CD94 and NKG2 genes. **J. Immunol.** 168:240–52; 2002.

SIVORI, S.; PAROLINI, S.; FALCO, M.; MARCENARO, E.; BIASSONI, R. 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. **Eur. J. Immunol.** 30:787–93; 2000.

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

SNYDER, G.A.; BROOKS, A.G.; SUN, P.D. Crystal structure of the HLA-Cw3 allotype-specific killer cell inhibitory receptor KIR2DL2. **Proc Natl Acad Sci USA** 96: 3864-3869; 1999.

SPEISER, D. E.; COLONNA, M.; AYYOUB, M.; CELLA, M.; PITTET, M. J.; The activatory receptor 2B4 is expressed in vivo by human CD8⁺ effector $\alpha\beta$ T cells. **J. Immunol.** 167:6165–70; 2001.

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

TAHARA-HANAOKA S, SHIBUYA K, ONODA Y, ZHANG H, YAMAZAKI S. Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). **Int. Immunol.** 16:533–38; 2004.

TERASAKI, P.I.; KOYAMA, H.; CECKA, J.M. The hyperfiltration hypothesis in human

renal transplantation. **Transplantation** 57: 1450; 1994.

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

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

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

TOYAMA-SORIMACHI, N.; TAGUCHI, Y.; YAGITA, H.; KITAMURA, F.; KAWASAKI, A. Mouse CD94 participates in Qa-1- mediated self recognition by NK cells and delivers inhibitory signals independent of Ly-49. **J. Immunol.** 166:3771-79; 2001.

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

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

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

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

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

VALIANTE, N.M.; TRINCHIERI, G. Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes **J. Exp. Med.** 178:1397-406; 1993.

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

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

VILCHES, C.; PANDO, M. J.; RAJALINGAM, R.; GARDINER, C. M.; PARHAM, P.

Discovery of two novel variants of KIR2DS5 reveals this gene to be a common component of human KIR 'B' haplotypes. **Tissue Antigens** 56:453-6; 2000B.

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

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

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

VLAMINCK, H.; MAES, B.; EVERS, G. Prospective study on late consequences of subclinical non-compliance with immunosuppressive therapy in renal transplant patients. **Am J Transplant** 4: 1509-1513; 2004.

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

WENG, F.L.; ISRANI, A.K.; JOFFE, M.M. Race and electronically measured adherence to immunosuppressive medications after deceased donor renal transplantation. **J Am Soc Nephrol** 16: 1839-1848; 2005.

WESTGAARD, I. H.; BERG, S. F.; ORSTAVIK, S.; FOSSUM, S.; DISSEN, E. Identification of a human member of the Ly-49 multigene family. **Eur J Immunol** 28:1839-1846; 1998.

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

WILSON, M. J.; TORKAR, M.; TROWSDALE, J. Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene. **Tissue antigens** 49:574; 1997.

WITT, C. S.; DEWING, C.; SAYER, D. C.; UHRBERG, M.; PARHAM, P.; CHRISTIANSEN, F. T. Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. **Transplantation** 68:1784; 1999.

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

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

Immunogenetics 54:543; 2002.

ZAMBELLO, R.; DELLA CHIESA, M.; TRENTIN, L.; CAROLLO, D.; CASTRICONI, R.; CANNAS, G.; CARLOMAGNO, S.; FALCO, M.; CABRELLE, A.; LAMY, T. et al. Expression and functional and function of KIR and natural cytotoxicity receptors in NK-type lymphoproliferative diseases of granular lymphocytes (LDGL). **Blood** 102:1797-1805; 2003.

ANEXO I
TABELA DE SINÔNIMOS DOS LOCOS *KIR*

TABELA 1

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

ANEXO II
PROTOCOLOS DE TÉCNICAS

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA – MÉTODO SALTING OUT

1. Identificar tubos de 1,5mL tipo Eppendorf
2. Transferir 500 μ L de buffy-coat para cada tubo
3. Acrescentar 800 μ L de tampão de lise de células vermelhas (**RCLB 1X**)
4. Passar rapidamente no Vórtex
5. Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos
6. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o botão de células em 1mL de **RCLB 1X**, passar no Vórtex, centrifugar 13000 rpm por 2 minutos e desprezar o sobrenadante
7. **Repetir o passo 6** até que se obtenha um precipitado claro
8. Desprezar o último sobrenadante e adicionar: 80 μ L de **tampão da Proteinase K**, 40 μ L da **Proteinase K**, 20 μ L de **SDS a 20%** e 240 μ L de **água Milli-Q**. Homogeneizar em Vórtex
9. Incubar em banho-maria a 55 °C por 40 minutos. Agitar aos 20 minutos
10. Deixar atingir temperatura ambiente antes de prosseguir
11. Adicionar 100 μ L de solução saturada de **NaCl (6M)**. Agitar no vórtex
12. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos
13. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5mL com 100 μ L de **NaCl (6M)** e centrifugar novamente a 13000 rpm por 5 minutos
14. Transferir o sobrenadante para novo tubo de 1,5mL e acrescentar 800 μ L de **ETOH absoluto gelado** e inverter gentilmente várias vezes para precipitar o DNA
15. Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos
16. Desprezar o sobrenadante e adicionar 1mL de **etanol 70%**
17. Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos
18. Desprezar o sobrenadante e deixar secar a temperatura ambiente
19. Ressuspender o DNA em 50 μ L de **água Milli-Q**
20. Deixar em geladeira por pelo menos um dia para reidratar o DNA
21. Deixar em banho-maria por 30 minutos para dissolver bem
22. Homogeneizar
23. Proceder a leitura da Densidade Ótica ou armazenar a -20°C

Obs.: Antes dos procedimentos, deve-se efetuar a limpeza das bancadas com Álcool 70%. Após o término, nova limpeza com Hipoclorito 1% e Álcool 70%.

PROTOCOLO DE HIBRIDIZAÇÃO (PCR-SSOP)

1. Identificar uma placa de PCR nova para os 3 grupos de primers (G1, G2 e G3);
2. Pegar recipientes para Tampão de Lavagem, Tampão de Neutralização e Tampão de Desnaturação;
3. Pegar borracha para tampar a placa de PCR (na gaveta dentro de uma caixa);
4. Ligar termociclador no programa SSO 60°C;
5. Transferir 2,5µL de cada Dna amplificado para a nova placa de PCR (usando a pipeta multicanal da Eppendorf (possui ponteiras específicas));
6. Fechar placa com a borracha;
7. Pôr o Tampão de Desnaturação no seu recipiente (fica numa caixa sobre a bancada);
8. 1,25µL de Tampão de desnaturação em cada poço da placa (colocar gota na parede do poço – usar uma ponteira para todas as amostras);
9. Bater fraco na bancada para descer o reagente;
10. Tampar;
11. Agitar no vortex, dar um spin na centrífuga até 2000rpm (a coloração ficará mais rosa);
12. Incubar na bancada à temperatura ambiente por 10 MIN;
13. Devolver Tampão;
14. * Durante esse tempo de espera prepara-se as Beads;
15. Separar e identificar 3 tubos eppendorf, um para cada grupo de Beads (G1, G2 e G3);
16. Pegar papel alumínio para cobrir os eppendorfs com as Beads (na gaveta junto ao suporte);
17. 544µL do Tampão de Hibridização em cada um dos 3 eppendorfs (volume para 32 amostras);
18. Homogeneizar bem as Beads (aproximadamente 1 MIN cada, devido sua tendência de aglomerar (ficam na geladeira));
19. Dar uma flicada de leve para descer;
20. 64µL de cada Bead (cuidar a identificação das Beads (usar ponteiras com filtro));
21. Homogeneizar com a ponteira;
22. Deixar o mix de Beads em local escuro (na gaveta);
23. Guardar Tampão e Beads;
24. ** Dado o tempo de incubação, colocar o Tampão de Neutralização no recipiente;
25. Pegar isopor com gelo na terceira porta do freezer -80°;
26. 2,5µL de Tampão de Neutralização em cada poço (pôr gota na parede);
27. Bater de leve na bancada;
28. Fechar placa com a borracha e agitar no vortex com cuidado para não formar bolhas (verificar se todos os poços mudam de cor (para amarelo), não ficando, adicionar um pouco mais de volume de tampão diretamente no poço);
29. Deixar no gelo;
30. Guardar o Tampão de Neutralização;

31. 17,8 μ L do Mix de Beads em cada poço (cuidar identificação das Beads (retirar o alumínio a fim de pegar o volume com a ponta da ponteira, diminuindo assim o volume de reagente que fica por fora da pipeta));
32. Verificar se não faltou em nenhum poço e passar para a próxima Bead;
33. Tampar;
34. Agitar demoradamente no vortex (misturar bem);
35. Pôr no termociclador a 60°C por 15MIN (com a borracha de vedação do termo);
36. * Preparar o Tampão da SAPE;
37. Retirar da geladeira o tampão;
38. O volume para uma placa é de 2376 μ L, isso é dividido em dois eppendorfs com 1188 μ L cada (para isso usa-se 2 vezes o volume de 594 μ L na pipeta, devido sua limitação de volume);
39. Fechar e armazenar no escuro e à temperatura ambiente (na gaveta);
40. * Recongelar a placa com o produto amplificado;
41. * Colocar o Tampão de Lavagem no recipiente;
42. Passados os 15 minutos, retirar a placa do termociclador;
43. Rapidamente acrescentar 50 uL de Tampão de Lavagem em cada poço;
44. Centrifugar por 5 minutos;
45. Após o tempo, flicar de uma só vez na pia e deixar a placa virada sobre papel toalha;
46. Repetir os passos 43 ao 45 por mais duas vezes;
47. *Durante a última centrifugada:
48. Pegar o tampão da SAPE na gaveta;
49. Passar a SAPE no vortex (devagar), deixar o ambiente o mais escuro o possível;
50. Para 96 poços, passar um volume de 24uL de SAPE (divididos em dois tubos de Tampão de SAPE = 12 uL para cada)
51. Misturar com a própria pipeta;
52. Fechar os tubos e retorná-los para a gaveta;
53. Flicar a placa que estava centrifugando;
54. Homogeneizar a SAPE em vortex;
55. Transferir o volume de 23,7uL de Tampão + SAPE para cada poço da placa;
56. Verificar se todos os poços têm;
57. Fechar placa e passar no vortex por aproximadamente 20 segundos;
58. Pôr no termociclador à 60°C por 5 minutos;
59. Ao sair do termociclador, acrescentar 50uL de Tampão de Lavagem;
60. Centrifugar por 5 minutos;
61. * Desligar o termociclador;
62. Flicar a placa;
63. Colocar 50uL de Tampão de Lavagem;
64. Transferir para a placa do Luminex (de fundo em V);
65. Durante a transferência homogeneizar com a ponteira por pelo menos 20 vezes cada poço;
66. Pôr no aparelho para leitura;

ANEXO III
FOLHAS DE INTERPRETAÇÃO DO “KIT” DE TIPAGEM PARA *HLA-Cw*

WORKSHEET
Micro SSP™ HLA Class I C Locus Specific DNA Typing Tray, Lot #004

Name _____ Sample ID _____

C Locus		1/4/7/10					2/5/8/11					3/6/9/12													
		H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A								
Reaction Results (mark positive locations)																									
Approximate Product Size (bp)		750	150/225	150	275	250	200	100/275	175/225	125	150/175	125	200	175	150	250	100	200	200	125	200/250	175	225/250	100	150
Serology Equivalent	C Locus Allele Group																								
N.C.	Negative Control (betaglobin)																								
Cw1.C-	Cw*010201~03/06~05/10																								
C-	Cw*0104																								
C-	Cw*0105																								
C-	Cw*0109																								
Cw2.C-	Cw*020201~0203/03~04/07/09																								
Cw2	Cw*020204~0205																								
C-	Cw*0205																								
C-	Cw*0206																								
C-	Cw*0208																								
Cw10.C.-Cw3	Cw*030201~0202/0401~06/08~09																								
Cw9.C-	Cw*030301~0304/11/13																								
Cw3	Cw*0307/10																								
C-	Cw*0312																								
C-	Cw*0314/16																								
C-	Cw*0315/18																								
C-	Cw*0317																								
Cw4.C.-C*Blank*	Cw*04010101~0102/03/0401~09N/13~14																								
C-	Cw*0410/12																								
C-	Cw*0411																								
C-	Cw*0415																								
Cw5.C.-C*Blank*	Cw*050101~10.Cw*0810																								
Cw6.C-	Cw*0602~03/07~11																								
C-	Cw*0604/06																								
Cw6	Cw*0605																								
Cw7.C-	Cw*070101~03/05~10/13~29																								
Cw7.C-	Cw*070401~0402/11~12																								
Cw8.C-	Cw*080101~04/06~09/11																								
C-	Cw*0805																								
C-	Cw*0812																								
C-	Cw*120201~0202																								
C-	Cw*120203																								
C-	Cw*120301/0303/0402/06/11/13																								
C-	Cw*120302																								
C-	Cw*120401/05/07/12																								
C-	Cw*1208																								
C-	Cw*1209																								
B-.C-	Cw*1210/14;B*6702																								
C-	Cw*1215																								
C-	Cw*140201~0203/04~05																								
C-	Cw*1403																								
C-	Cw*150201~0202/08/13																								
C-	Cw*1503																								
C-	Cw*1504/0501~06/09																								
C-	Cw*1507																								
C-	Cw*1510																								
C-	Cw*1511																								
C-	Cw*1512																								
C-	Cw*160101~02																								
C-	Cw*160401																								
C-	Cw*1701~03																								
C-	Cw*1801~02																								
B*2	B*1573																								
B*27	B*270506																								
B-	B*4048																								

Primer Information
Micro SSP™ HLA Class I C Locus Specific DNA Typing Tray, Lot #004



Tray Pos.		Allele Specificity	5' Recognition Site	3' Recognition Site	Approx. Size (bp)	Prev. Lot #003	No. Test	Number of				R Value	Revision Information Changes: added(+), removed(-) deleted nomenclature(x) or New
								TP	FN	FP	TN		
1 4 7 10	H	Negative Control (betaglobin)	525(-)549	1248(-)1267	750	1H	5	4	0	0	1	1	
	G	Cw*010201~10	9-9	86K66	225	1G	98	22	0	0	74	1	New: Cw*010203
		Cw*120201~0202/08	99-99	135-135	150								
	F	Cw*010201~03/06~10; Cw*0205; Cw*0317; Cw*0602~11; Cw*0812; Cw*120301/0303~07/09/11~13/15; Cw*140201~05; Cw*160101~0401	98-W97	135-135	150	1F	95	51	0	0	44	1	Changes: Cw*1601~Cw*160101 New: Cw*010203, Cw*1215, Cw*160102
	E	Cw*020201~09; Cw*1511	15-S16	90A-91	275	1E	98	16	0	0	81	1	
	D	Cw*020201~07/09; Cw*030201~0202/0401~10/14/16~17; Cw*1403; Cw*150201~09/11/13	18---H-22	90A-91	250	1D	98	32	0	0	64	1	New: Cw*1513
	C	Cw*030201~13/15/17~18	129-129	173K173	200	1C	98	16	0	0	81	1	
	B	Cw*04010101~14; Cw*1801~02	97R-F99	113-N114	100	1B	98	26	0	0	70	1	
		Cw*030301~0304/11~13; Cw*1512	11A11	91R91	275								
	A	Cw*04010101~10/12~15; Cw*0605	42-P43	90-90	175	-	98	28	0	0	68	1	Changes: Cw*1601~Cw*160101 New: Cw*160102
Cw*160101~02		98-W97	156Q156	225									
2 5 8 11	H	B*6702; Cw*04010101~09N/13~15; Cw*0805; Cw*120201~0303/0402/06/08/10~11/13~15; Cw*1503	43P43	73A--V--78 / 73A--VS-78	125	2H	95	29	0	0	66	1	New: Cw*1215
	G	Cw*050101~10; Cw*0605; Cw*0810	33--Q35	80K--92	175	-	98	5	0	0	91	1	Changes: Cw*0501~Cw*050101 New: Cw*050102
		Cw*120203	98--99	135---137	150								
	F	Cw*0602~04/08~11; Cw*070401~0402/11~12; Cw*1801~02	46--47	73A73	125	2F	98	21	0	0	75	1	
	E	Cw*0104/09; Cw*0205; Cw*0602~03/07~11; Cw*120301~07/11~13/15; Cw*160401	98-W97	156W156	200	2E	98	26	0	0	70	1	New: Cw*1215
	D	Cw*070101~03/05~10/13~29	131--132	182A182	175	-	98	25	0	0	71	1	New: Cw*0728, Cw*0729
	C	Cw*080101~09/11~12	35Q35	77S-RN80	150	2C	98	9	0	0	87	1	
	B	Cw*0411; Cw*140201~05	959	80N80	250	2B	98	5	0	0	91	1	
A	Cw*1208; Cw*150201~10/12~13	43P43	86-Y87	100	-	98	7	0	0	89	1	New: Cw*1513	
3 6 9 12	H	Cw*160101~0401	98-W97	152-152	200	3H	98	9	0	0	87	1	Changes: Cw*1601~Cw*160101 New: Cw*160102
	G	Cw*160401	98-W97	152---W156	200	3G	95	1	0	0	94	1	
	F	Cw*1701~03	142-S143	170G170	125	3F	98	3	0	0	93	1	
	E	B*270606; Cw*010201~10	14--15	90A90	250	-	98	28	0	0	68	1	Changes: Cw*0501~Cw*050101 New: Cw*010203, Cw*050102
		Cw*050101~10; Cw*080101~12	35Q35	90A90	200								
	D	Cw*020201~0203/03~04/07~09	93--L95	138T--140	175	-	98	8	0	0	88	1	
	C	Cw*030201~06/08~09/11~14/16~17; Cw*1507	10-A-12	80N---84	250	-	98	20	0	0	76	1	
		Cw*070401~0402/11~12	93--F95	156D156	225								
	B	B*4048; Cw*0206; Cw*0312; Cw*1215; Cw*150201~03/07~08/10~13	115-L116	135-135	100	-	95	3	0	0	92	1	New: Cw*1215, Cw*1513
A	B*1573; Cw*0206; Cw*1215	115-L116	156W-A158	150	-	98	0	0	0	98	N/A	New: Cw*1215	

Notes

- 1 Betaglobin nucleotide position based on Fullerton, S.M., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91 (5), 1805-1809 (1994)
- 2 The QC summary of each primer mix is located in the shaded area. This information reflects the data available upon the initial release. For the QC information on a specific dotting please contact One Lambda, Inc.
- 3 Nomenclature includes HLA alleles listed in the January 2005 update of the IMGT database (Robinson J, et al., "IMGT/HLA database - a sequence database for the human major histocompatibility complex." Tissue Antigen (2000) 55,280-287). Complete update information is located at www.anthonynolan.com/HIG/index.html.

Revision Notes

- 1 The Prev. Lot column lists the location of primers that existed on a previous lot of the product. Revision changes to primer specificity are noted in the Specificity Changes column.
- 2 The allele list used for this document updated to reflect the January 2005 nomenclature list.