

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

LAYANNA FREITAS DE OLIVEIRA

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DOS GENES KIR E SEUS
LIGANTES HLA EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE EM
BELÉM – PA

BELÉM
2009

LAYANNA FREITAS DE OLIVEIRA

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DOS GENES KIR E SEUS
LIGANTES HLA EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE EM
BELÉM – PA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade Federal do
Pará, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos.

BELÉM
2009

LAYANNA FREITAS DE OLIVEIRA

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DOS GENES KIR E SEUS
LIGANTES HLA EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE EM
BELÉM – PA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Biomedicina
da Universidade Federal do Pará, como
requisito parcial para a obtenção do grau
de Bacharel em Biomedicina.

Belém - PA, 15 de dezembro de 2009.

Banca Examinadora:

Prof^o Dr. Eduardo José Melo dos Santos - Orientador
ICB – UFPA

Prof^a. MSc. Maria de Fátima Lobato da Cunha Sauma
ICS – UFPA

Prof^o. Dr. Leonardo dos Santos Sena
UEPA

Prof^o MSc. Mauro Meira Leite - Suplente
ESAMAZ

*Aos meu pais **Alberto Souza de Oliveira** e **Ivanete Freitas de Oliveira**, pelo apoio e incentivo incondicionais, dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Toda minha gratidão primeiramente é dedicada ao Senhor, grande Deus Pai que sempre mostra sua presença nos momentos felizes e especialmente nas dificuldades, sua infinita bondade foi determinante na minha formação pessoal e acadêmica.

Obrigada meu pai e minha mãe, por estarem sempre por perto quando precisei, por dispor os ouvidos às minhas reclamações e preocupações, por TODO APOIO que tive em todos os sentidos. Vocês são muito especiais não só como pais, mas como pessoas. E obrigada irmã, pelas *diversas* ajudas, especialmente a grande amizade. Amo muito vocês três!!!

Ao Prof. Dr. Eduardo Santos, o melhor orientador do mundo, obrigada por compartilhar seu conhecimento, por ser tão atencioso com todo trabalho e com as angústias e ataques psicóticos que tens que ouvir em todas provas e dificuldades que enfrentamos, é isso que faz de você esse grande orientador amigo tão querido e respeitado por todos seus alunos. MUITO OBRIGADA!!

A toda minha querida *grande família*, muito unida e muito ouriçada, obrigada por tuuuudo!

Ao meu querido João, obrigada pelo carinho, amor, compreensão e tudo mais que possa ser agradecido.

Agradeço a minha segunda família do LGHM, vocês são muito importantes na minha vida, Maria Helena, Clayton, Paloma, Jana, Danuta, Bruna, (Carol, lê o próximo parágrafo) Larysse, Yukari e Ana Paula, agradeço pela amizade e apoio técnico-científico-emocional nunca recusado, vocês são incríveis! Obrigada aos caçulas: Jean e Andreza, sei que ainda vão me ajudar muito! Hehehe. Obrigada pela companhia.

Às minhas companheiras de equipe na graduação, obrigada por tantas gargalhadas e pelos incontáveis trabalhos realizados. Obrigada Carol, Dani e Ju pela amizade, espero que ela se estenda além da graduação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
Objetivos	9
2. METODOLOGIA	10
Delineamento Amostral	10
Genotipagem de Polimorfismos Genéticos	10
Análise Estatística	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4. CONCLUSÃO	15
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

		Página
Figura – 1	Deformidades articulares primárias nas mãos visualizada em radiografia simples (Fonte: http://unicamp.com.br).	1
Figura – 2	(a)Membrana sinovial sadia e (b) membrana sinovial de paciente com AR. (Adaptado de http://www.ff.up.pt).	3
Figura – 3	Genes KIR localizados na região dos LRC. (Fonte: www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html).	6
Figura – 4	Estrutura dos domínios dos receptores KIR: D0, D1 e D2. KIRs inibitórios possuem os motivos inibitórios baseados em tirosina e os estimulatórios um aminoácido básico. (Fonte: http://www.chori.org) .	7
Figura – 5	Perfil de genes KIR de um indivíduo em gel de poliacrilamida 4,8%(produto de PCR-SSP).	11
Figura – 6	Freqüências dos genes KIR nas amostras de pacientes e de controles.	12
Tabela – 1	Associação de KIR/HLA com doenças.	5

RESUMO

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença crônica e inflamatória causada por reação autoimune que tem etiologia desconhecida. A inflamação desencadeia-se na membrana sinovial. Várias células estão envolvidas diretamente na destruição da cartilagem articular e do osso subcondral, na liberação de citocinas e manutenção do estado inflamatório, entre elas os linfócitos TCD4+CD28- e *natural killer* (NK) que possuem Receptores Imunoglobulina-símilias de células NK (KIR) que têm como ligantes as moléculas HLA na superfície de células alvo. A associação de genes HLA de classe I bem como de genes não HLA devem ser estudadas, pois estes se localizam nas regiões envolvidas nos processos autoimunes, genes KIR e HLA são genes candidatos a predisposição a AR. O objetivo do trabalho foi investigar a associação dos genes KIR e seus ligantes HLA com a AR. A genotipagem de 13 genes KIR foi realizada por PCR-SSP para 150 controles e 50 pacientes pertencentes à população de Belém, seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida a 4,8%. As freqüências gênicas foram obtidas por contagem direta e a análise estatística realizada no programa BioEstat 5.0. Os grupos de ligantes HLA-C grupo 1 apresentou freqüências alélicas similares em pacientes e controles. *KIR2DS3* teve freqüência de 78% em pacientes e 34% em controles ($p < 0,0001$; OR= 6,88, IC 95%=3,3-14,6). *KIR3DS1* foi mais frequente em pacientes ($p = 0,0023$; OR=3,48; IC 95%=1,58-7,68). Os genes *KIR2DS4* e *KIR2DS5* também foram mais freqüentes em pacientes, mas perderam a significância após correção para múltiplos testes. A associação de *KIR3DS1* é secundária pois está em desequilíbrio de ligação com *KIR2DS3*. O gene *KIR2DS3* está associado com a AR, de acordo com valor de *Odds Ratio*, indivíduos com essa gene têm 6,88 mais chances de ter AR. Os resultados estão de acordo com a literatura, pois o gene *KIR2DS3* é ativatório e genótipos que estimulam a atividade de células NK conferem risco ao desenvolvimento de doenças autoimunes.

ABSTRACT

Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic and inflammatory disease caused by autoimmune responses and unknown etiology. The inflammation is started in the synovium membrane and some cells are involved directly in the destruction of the cartilage to articulate and the subcondral bone, in the release of cytokines and maintenance of the inflammatory state, between them $CD4^+CD28^{null}$.T-cells and natural killer (NK) that they show Immunoglobulin-like receptors of cells NK (KIR) in surface that link with HLA on the target cells. The association of genes HLA class I as well as of non-HLA genes should be studied, because they are locate in regions involved in autoimmunity, genes KIR and HLA are candidates genes to RA predisposition, because play role in cytolysis. The aim of this study is search association between KIR genes and their HLA ligands with RA pathogenesis. KIR genotypes were determined in 50 patients of RA and 150 healthy controls using the PCR-SSP method. Gene frequencies was obtained using direct count and the software BioEstat 5.0. The results show that the ligands group NK1 was not significantly different between patients (45%) and healthy individuals (47%). Gene *KIR2DS3* had frequency of 78% in patients and 34% in controls ($p < 0,0001$; OR= 6,88, IC 95%=3,3-14,6). *KIR3DS1* was predominant in patients ($p=0,0023$; OR=3,48; IC 95%=1,58-7,68). The *KIR2DS4* and *KIR2DS5* was not significantly after multiply testes correction. *KIR3DS1* have a secondary association because is in linkage disequilibrium with *KIR2DS3*. The *KIR2DS3* gene is associated with RA, the Odds Ratio value show that persons with this gene have 6,88 more chances to RA. This results are according with other works, because the *KIR2DS3* gene confers a activatory signal to NK cell and this genotypes confers risk to Rheumatoid Arthritis.

1. INTRODUÇÃO

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença crônica e inflamatória, causada por reação autoimune, com etiologia desconhecida e um curso clínico bastante variável. Essa reação afeta primariamente a membrana sinovial de pequenas articulações e tem como sintoma principal a rigidez matinal, a poliartrite e destruição articular a longo prazo (Rodríguez et al, 2002).

Em alguns pacientes, os sintomas iniciais consistem em fadiga, emagrecimento, mal-estar, febre baixa e dores musculares. Todavia, na maioria dos casos, a doença começa com manifestações articulares, simétricas, afetando, primariamente, as pequenas articulações das mãos e dos pés (Moreira & Carvalho, 1998; Figura 1). As grandes articulações (tornozelos, joelhos, quadris, cotovelos e ombros) geralmente são afetadas num estágio mais avançado de evolução da doença, podendo haver desde uma dificuldade de movimentação das articulações, devido à dor, a uma deformidade articular levando à perda total dos movimentos (Fugger, 2000). Além disso, é queixa freqüente dos pacientes a rigidez matinal, com uma melhora observada no decorrer do dia (Lee & Weinblatt, 2001).



Figura 1: Deformidades articulares primárias nas mãos visualizada em radiografia simples (Fonte: <http://unicamp.com.br>).

Somado às manifestações articulares, alguns pacientes desenvolvem manifestações extra-articulares como nódulos subcutâneos ou subperiósteos,

denominados nódulos reumatóides, inflamação pulmonar, vasculite, pericardite (Moreira & Carvalho, 1998; Sack & Fye, 2000). Podem ocorrer secura dos olhos e boca devido as inflamações nas glândulas lacrimais e salivares (“Síndrome seca” ou “Síndrome de Sjögren”). Pacientes com AR podem desenvolver vasculites que causam inflamações que afetam a pele, nervos e outros tecidos (Arthritis Foundation, 2000).

O diagnóstico de AR é feito de acordo com o preconizado pelo Colégio Americano de Reumatologia com associação de sintomas clínicos, resultados laboratoriais e radiológicos (Bértolo et al, 2007). Se quatro dos sete critérios estiverem presentes por mais de seis semanas, o paciente é diagnosticado com AR (Arnett et al, 1988). A pesquisa do Fator Reumatóide no sangue é um exame que tem sensibilidade de 40% a 80%, porém a especificidade é baixa porque também está presente em outras doenças reumáticas como o Lúpus e Síndrome de Sjögren, doenças infecciosas (sífilis, hanseníase, tuberculose, malária) e em indivíduos idosos. Outros exames são realizados em caso de dúvida, como o anti-CCP (antipeptídeo citrulinado cíclico) que tem maior especificidade e o Fator Anti-Nuclear (FAN), presente em 30% dos pacientes (Bértolo et al, 2007).

A artrite reumatóide afeta aproximadamente 1% da população em geral (Lee & Weinblatt, 2001), podendo iniciar-se em qualquer idade, porém é mais freqüente na faixa de 30 a 50 anos (Moreira & Carvalho, 1998). Ambos os sexos são acometidos, mas há predomínio do feminino na proporção de 2,5:1 (Lee & Weinblatt, 2001), mas essa proporção varia muito em diferentes populações, o trabalho de Barbosa, 2009 descreveu uma proporção de 8 mulheres para cada 1 homem na população de Belém, Pará. Estudos associam essa diferença a fatores hormonais (Lee, 2001) homens com artrite apresentam níveis menores de testosterona (Espector et al, 1989), porém em mulheres essa associação não é muito evidente, Brennan e Silman (1995) descrevem níveis menores de testosterona e sulfato de deidroepiandrosterona em mulheres com AR.

A inflamação, característica da doença, é desencadeada na membrana sinovial e várias células como linfócitos TCD4⁺CD28⁻, *Natural Killer* (NK), macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e produtos de suas atividades estão envolvidas diretamente na destruição da cartilagem articular e do osso subcondral, na liberação de citocinas e manutenção do estado inflamatório. Este tecido inflamatório presente na articulação recebe o nome de *Pannus* (Figura 2). A causa

ou início do processo inflamatório, bem como o modo que ele se perpetua não é totalmente conhecido (Fugger & Svejgaard , 2000). Pacientes com AR tem grande quantidade de células T $CD4^+$ e $CD28^-$, que estão envolvidas diretamente nas complicações vasculares da doença (Yen et al, 2006).

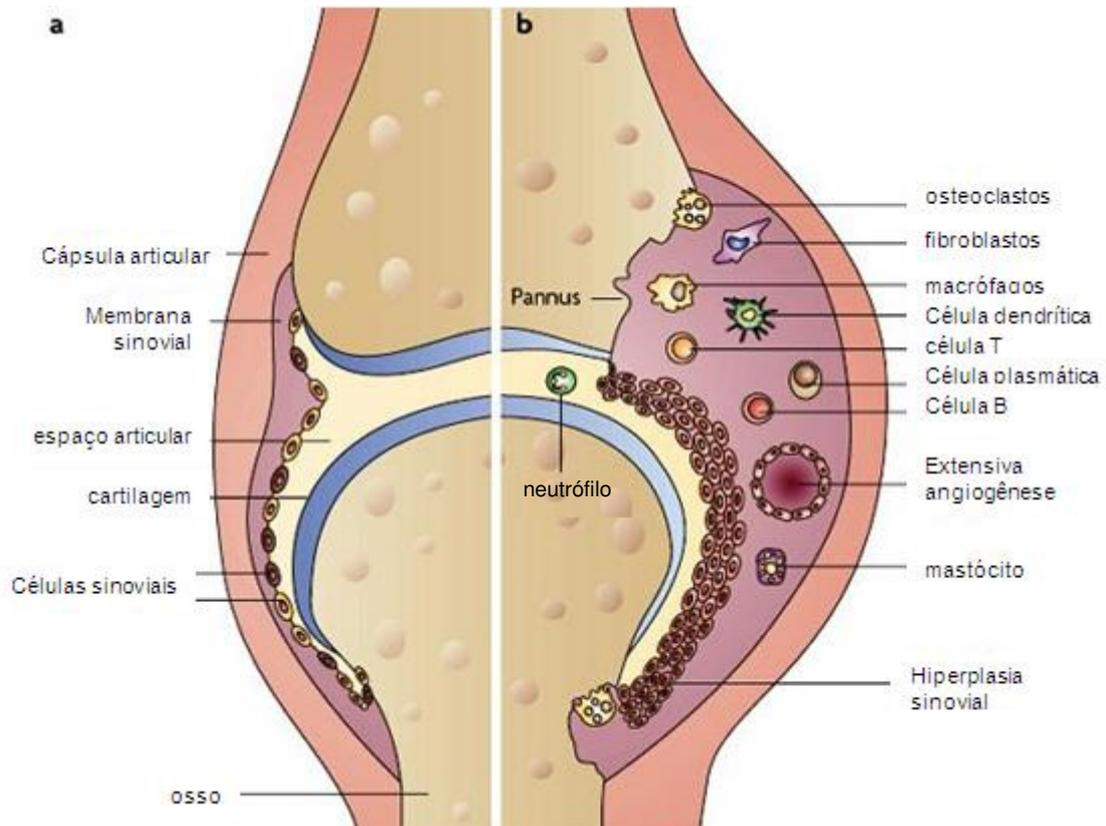


Figura 2: (a) Membrana sinovial sadia e (b) membrana sinovial de paciente com AR. (Adaptado de <http://www.ff.up.pt>)

Vários fatores genéticos e ambientais têm sido associados ao surgimento da AR, entretanto, nenhum dos dois emerge como necessário ou suficiente para o desenvolvimento da doença.

A busca por marcadores genéticos que possam elucidar a etiopatologia da doença, bem como sua evolução clínica, pode fornecer interessantes achados na explicação do mecanismo genético por trás desta patologia. Assim, os estudos podem ser agrupados em dois tipos principais: i) estudos de triagem genômica e ii) estudos em genes candidatos.

Os estudos de triagem genômica encontraram boas regiões candidatas, porém a região cuja associação foi mais consistente e constante em todas as

populações foi o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), no cromossomo 6. Algumas regiões são reproduzidas em vários estudos e têm genes candidatos bem caracterizados, entre eles a região 2q32-35 se destaca, onde estão contidos os genes *STAT4*, *CTLA4* e *SLC11A1* (antigo *NRAMP1*) que são genes consistentemente associados à AR e ao Lúpus Eritematoso Sistêmico que também é uma doença autoimune (Plenge et al 2005; Krishnam et al, 2006; Yen et al 2006; Remmers et al 2007).

Vários estudos evidenciam a associação da suscetibilidade à AR com polimorfismos em genes do MHC, especialmente *HLA-DRB1*, sendo alelos do grupo DR4 os mais comumente associados (Bongi et al, 2004; Horst-Bruinsma et al, 1999; Jawaheer et al, 2002; Ota et al, 2001; Reviron et al, 1999; Yen et al, 2002). No entanto outros autores sugerem uma segunda associação independente com genes de classe III (Singal et al, 1999) observaram associação primária de genes *HLA* de classe III, especificamente próxima do gene *TNF* no mesmo bloco de recombinação dos genes *HLA-B* e *C*.

Associação de AR com polimorfismos de genes *KIR* também foi descrita (Yen et al, 2006), porém é controversa (Majorczyk et al 2007; Middleton et al, 2007). No entanto, um aspecto que permanece concensual é a associação de polimorfismos do complexo *KIR* com manifestações extra-articulares da AR, particularmente a vasculite (Yen et al, 2001; Majorczyk et al 2007). A ativação ou inibição da atividade citolítica de células NK decorre da interação de seus receptores *KIR* com seus ligantes, moléculas codificadas por certos alelos *HLA-A*, *B*, *C* e *G* (Pahram, 2005). Os genes *KIR* têm sido associados com diversas doenças autoimunes e infecciosas. De modo geral, genótipos que levam a uma baixa inibição e alta ativação de células NK são benéficos em infecções virais, enquanto genótipos mais ativatórios conferem risco a doenças autoimunes (tabela 1).

Estudos em genes candidatos têm destacado primariamente genes envolvidos na resposta imune inata, adaptativa e inflamatória (Prokunina & Alarcon-Riquelme, 2004; Krishnan et al, 2006). Neste cenário, pode-se propor estudar genes candidatos, localizados em regiões previamente descritas e envolvidos nesses processos.

Tabela 1: Associação de *KIR/HLA* com doenças.

Doença	Associação KIR/HLA	Efeito
Infecção		
HIV	<i>KIR3DS1/Bw4-80I</i> <i>KIR3DS1</i>	Progressão lenta Risco reduzido de infecção
HCV	<i>2DL3/2DL3 - HLA-C1/C1</i> <i>3DS1 - HLA-Bw4</i>	Solução da Infecção Solução da Infecção
Citomegalovírus	Expressão de <i>KIR2DL1</i> em todas células NK	Infecção CMV recorrente
<i>M. tuberculosis</i> <i>P. falciparum</i>	<i>KIR2DL1</i> ; <i>KIR2DL3</i> <i>3DL2*002</i>	Susceptibilidade Resposta de células NK contra eritrócitos
Autoimunidade		
Artrite psoriática	<i>2DS1/2DS2</i> ; homozigoto <i>HLA-Cw</i>	Susceptibilidade
Vasculite reumatóide	<i>KIR2DS2/HLA-Cw03</i>	Susceptibilidade
Escleroderma	<i>KIR2DS2+ / 2DL2-</i>	Susceptibilidade
Espondiloartrite	expressão elevada <i>3DL2</i>	Pode contribuir para patologia

A associação de genes *HLA* de classe I bem como de genes não *HLA* devem ser estudadas, pois estes se localizam nas regiões envolvidas nos processos autoimunes. Sendo assim, os genes alvo do presente projeto são: treze genes para receptores imunoglobulina-símiles (*KIR*) de células *natural killer* (*NK*) e seus ligantes *HLA-C*.

O controle da ação de células *NK* é dependente principalmente da interação dos seus receptores *KIR* inibitórios e ativatórios com ligantes *HLA* de classe I correspondentes nas células alvo. Os receptores inibitórios impedem a ativação e ataque do próprio organismo por essas células (Boyton & Altmann, 2007).

O grupo de genes *KIR* é uma região de aproximadamente 150kb do cromossomo 19, localizados no Complexo de Receptores Leucocitários (*LRC*) possui um total de 17 genes ou pseudogenes (Figura 3).

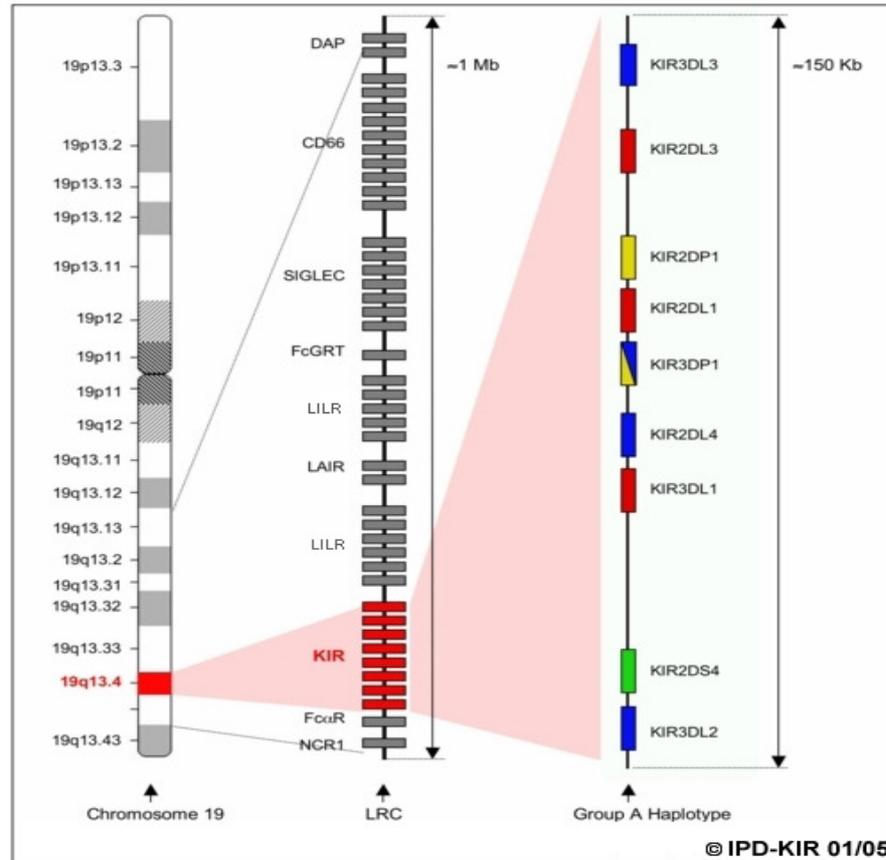


Figura 3: Genes *KIR* localizados na região dos LRC. (Fonte: www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html)

Os receptores KIR são caracterizados de acordo com a estrutura de seus domínios extracelulares: 2D para dois domínios ou 3D para três domínios; a presença de cauda intracitoplasmática longa com imunorreceptores com motivos inibitórios baseados em tirosina (ITIM) envia um sinal inibitório à ação das células NK (Bontadini et al, 2006). Por outro lado, caudas curtas não possuem ITIMs, mas sim um aminoácido modificado no domínio transmembrana, com a molécula acessória DAP-12, que apresenta um sinal ativatório através do imunorreceptor ativatório baseado em tirosina, ITAM (Bashirova et al, 2006; Figura 4). A nomenclatura dos genes é dada pelos domínios extracelulares mais a letra “L” para os receptores inibitórios e “S” para os ativatórios.

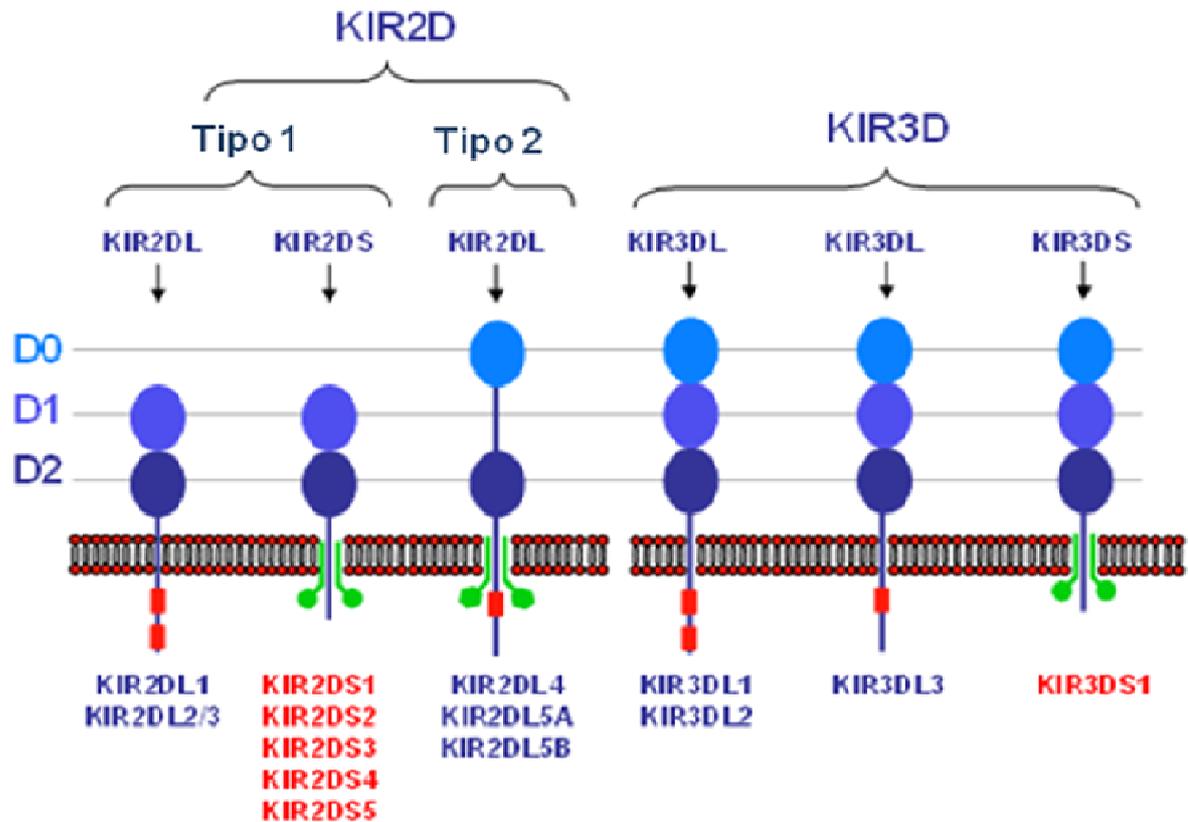


Figura 4: Estrutura dos domínios dos receptores KIR: D0, D1 e D2. KIRs inibitórios possuem os motivos inibitórios baseados em tirosina e os estimulatórios um aminoácido básico. (Fonte: <http://www.chori.org>)

A resposta da célula NK, resultado da interação de receptores KIR e ligantes HLA são fundamentais na resposta imune inata. Os ligantes HLA-C possuem um dimorfismo na posição 80 do domínio alfa-hélice, o grupo 1 possui uma asparagina nessa posição e interage com os receptores 2DL2, 2DL3 e 2DS2 (Kulkarni et al, 2008); o grupo 2 possui uma lisina e interage com os receptores 2DL1 e 2DS1. Receptores 3DL1 e possivelmente 3DS1 ligam com HLA-B; 2DL2 com HLA-A; 2DL4 com HLA-G e 2DS4 com HLA-Cw4 (Bashirova et al, 2006; Carrington & Martin, 2006).

Dos 13 genes *KIR* estudados, sete são inibitórios e seis são estimulatórios. No entanto, nem todos os indivíduos possuem todos os genes. O polimorfismo do complexo de genes KIR se dá, em boa parte, a diferentes combinações de genes por indivíduo, formando os haplogrupos de KIR. Os haplogrupos A e B são caracterizados de acordo com o site <http://www.allelefrequencies.net/default.asp>: se algum dos genes *KIR2DL2*,

KIR2DL5, *KIR3DS1*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* estiverem presentes no genótipo, o haplogrupo B está presente, seja em homozigose ou heterozigose, e o indivíduo é caracterizado como Bx. Se nenhum desses genes estiver presente no genótipo, o indivíduo é considerado homozigoto para o haplogrupo A.

A AR é uma das doenças autoimunes mais comuns conhecidas. Sua prevalência de 1% em populações humanas a torna um problema sério em saúde pública. Seu início se dá após os 30 anos, afetando indivíduos em sua fase mais produtiva, impactando o mercado de trabalho e onerando a seguridade social. Sua evolução crônica culmina frequentemente com invalidez parcial e causa comoção familiar e social (Lee & Weinblatt, 2001).

A expectativa de vida do paciente com AR é reduzida em até 7 anos e sua evolução acarreta comprometimento erosivo das articulações em 70% dos pacientes nos três primeiros anos, sendo as articulações dos pés as mais atingidas e havendo manifestações extra-articulares em até 30% dos pacientes (Lipsky, 1998).

Os genes escolhidos desempenham papéis importantes em funções reconhecidamente relacionadas à AR, como a imunidade inata e adaptativa, além de genes relevantes em processos inflamatórios e apoptóticos.

Além disso, a seleção dos marcadores para esse estudo também considerou sua localização em regiões cromossômicas já descritas como associadas, por triagem genômica em genealogias, em vários estudos independentes e em populações distintas.

Ainda considerando os aspectos funcionais dos genes escolhidos, as funções dos genes *HLA* e *KIR* estudados estão estreitamente relacionadas, visto que a atividade citolítica das células NK é regulada principalmente por KIR, que por sua vez depende de sua ligação com moléculas HLA-A, B, C e G. Assim, uma análise conjunta dos polimorfismos de genes *HLA* e *KIR* parece ser bastante promissora e bem mais completa.

OBJETIVO

Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo principal investigar a associação de polimorfismos do complexo de genes *KIR* e seus ligantes com a AR.

Objetivos específicos

1 - Descrever a variabilidade do dos genes *KIR* e seus ligantes HLA em pacientes e em controles representativos da população de Belém;

2 – Investigar a associação de polimorfismos dos genes supracitados, individualmente ou em combinações genótípicas, com o desenvolvimento da AR;

2. METODOLOGIA

DELINEAMENTO AMOSTRAL

Amostra controle: constituída de 150 indivíduos não aparentados, representativos da população de Belém, com idade superior a 40 anos e não portadores de AR.

Amostra de pacientes: constituída de 50 indivíduos diagnosticados clínica e laboratorialmente como portadores de AR, provenientes da Santa Casa de Misericórdia (Belém - PA) e consultórios particulares.

Coleta e processamento de amostras: O DNA foi extraído de amostras sangue venoso periférico através do método fenol-clorofórmio, por meio do protocolo descrito na literatura (Sambrook et al, 1989).

GENOTIPAGEM DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Genes *KIR*

A presença ou ausência de treze genes *KIR* foi investigada por PCR-SSP. Para a PCR, são utilizados 24 pares de *primer*, um *forward* e um *reverse* – com exceção do gene *KIR2DS1*, constituídos de dois *forwards* e um *reverse* – para a amplificação de 13 genes (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *K*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*). Para cada *locus* foram utilizados dois pares de *primers*, exceto *KIR2DS5*, para evitar falsos negativos pela presença de polimorfismos alélicos na região de hibridização dos *primers*. As seqüências dos *primers* e as condições de PCR foram as referidas por Martin et al (2002) fornecidas como suplemento em <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/169/6/2818/DC1>.

A visualização dos produtos de PCR foi feita em gel de poliacrilamida 4,8% corada com nitrato de prata (Figura 5).

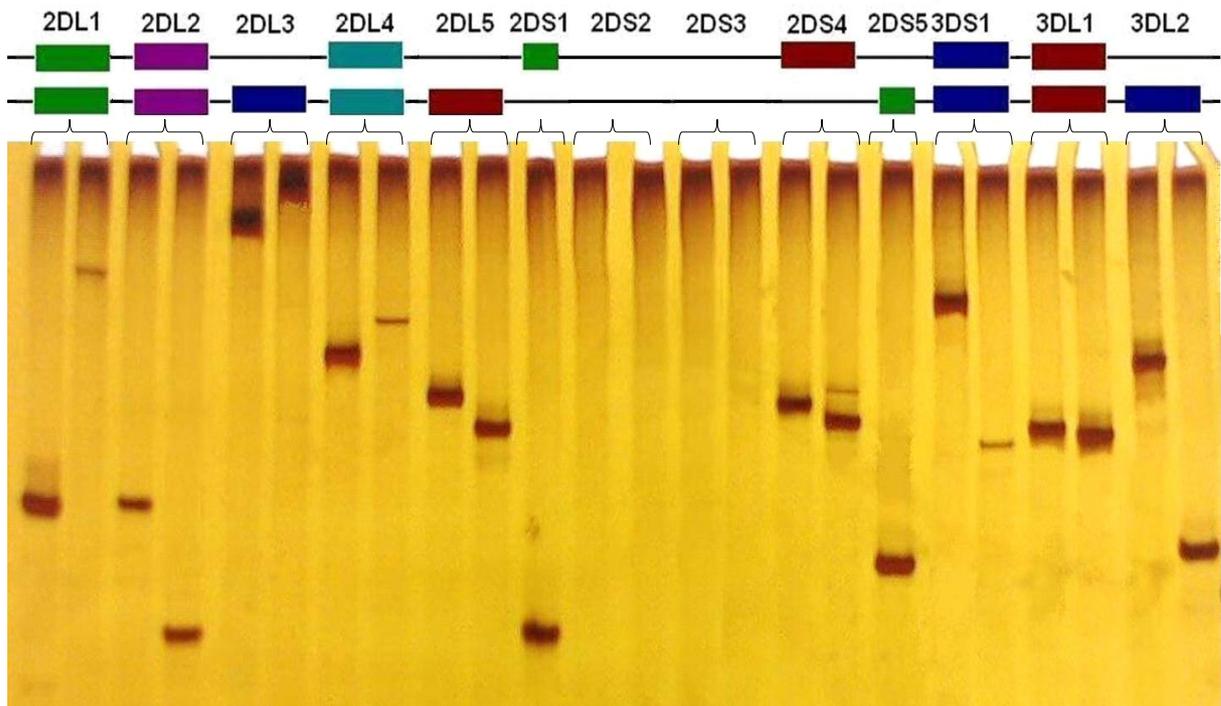


Figura 5: Perfil de genes *KIR* de um indivíduo em gel de poliacrilamida 4,8% (produto de PCR-SSP). As chaves determinam um gene, a presença de uma ou duas bandas nos poços significa que o indivíduo possui este gene, estando ele em um ou nos dois cromossomos.

Genes HLA-C

A genotipagem dos genes *HLA-C* será feita por PCR e eletroforese em gel de poliacrilamida a 4,8%, corado com nitrato de prata. As condições de PCR e seqüência de *primers* foi realizada de acordo com o descrito por Frohn et al. (1998).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As freqüências alélicas e fenotípicas foram obtidas por contagem direta. Estimativas de variabilidade genética (número de alelos e diversidade genética) foram obtidas de acordo com o descrito em Nei (1987).

A comparação entre as freqüências genotípicas das amostras de pacientes e controles foi feita por Qui-quadrado, através dos programas BioEstat 5.0 (Ayres, 2007) e Clump, usando simulação de Monte Carlo para se estimar o valor de p (Sham & Curtis, 1995).

O *Odds Ratio* foi estimado para os alelos estatisticamente significantes associados à AR.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os genes KIR estudados tiveram freqüências semelhantes entre pacientes e controles com exceção dos genes *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1*, que foram mais frequentes em pacientes. A figura 6 mostra a freqüência de cada gene *KIR* em pacientes e em controles.

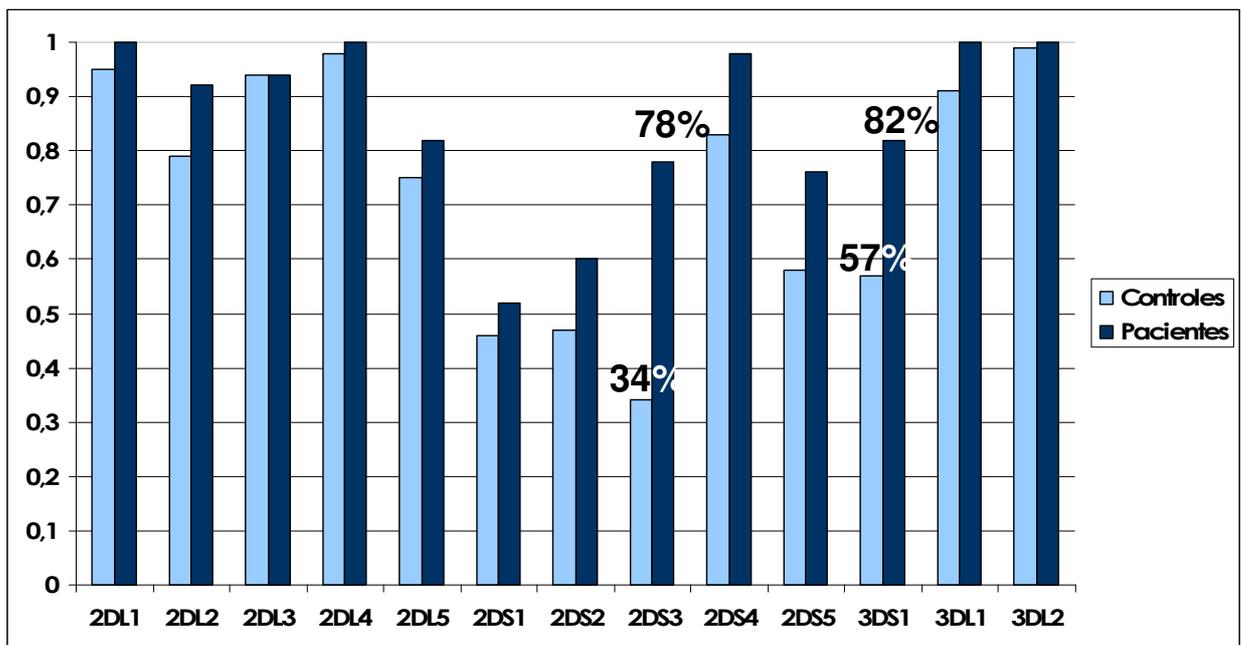


Figura 6: Freqüências dos genes *KIR* nas amostras de pacientes e de controles.

O gene *KIR2DS3* teve freqüência de 78% em pacientes e 34% em controles. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$; OR= 6,88, IC 95%=3,3-14,6).

O *KIR2DS5* também teve freqüência maior em pacientes (76%) que em controles (58%), a diferença significativa apresentou $X^2=5,18$ e $p=0,035$, assim como o gene *KIR3DS1* que teve freqüência de 82% em pacientes e 57% em controles ($p=0,0023$; OR=3,48; IC 95%=1,58-7,68).

O gene *KIR2DS4* teve freqüência de 98% em pacientes e 83% em controles, diferença significativa com valor de $p=0,0121$, OR=10,27 e IC95%=1,36-77,8, pode estar associado a Atrite Reumatóide dependendo da presença do ligante HLA-Cw4 (Yen et al, 2006). O trabalho de Yen et al. (2006) mostrou esse gene associado a AR na população de Taiwan.

Os ligantes HLA-C do grupo 1 apresentaram freqüências alélicas similares em pacientes (45%) e controles (47%). Um excesso de heterozigotos HLA-C1/2 foi observado em pacientes, mas isso pode ser espúrio e precisa ser confirmado com uma amostra maior.

A análise da presença conjunta dos genes *KIR2DL1*, *KIR2DS1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3* e *KIR2DS2* e dos seus respectivos ligantes HLA-C, não foi realizada pois não houve diferenças estatisticamente significantes das freqüências destes genes *KIR* em pacientes e em controles.

Após correção para múltiplos testes os valores de p dos genes *KIR2DS5* e *KIR2DS4* perderam a significância, permanecendo associados os genes *KIR2DS3* e *KIR3DS1*, porém a associação de *KIR3DS1* pode ser secundária devido desequilíbrio de ligação entre esses dois genes, sendo portanto a associação principal do gene *KIR2DS3* com artrite reumatóide.

De fato, *KIR2DS3* e *KIR3DS1* encontram-se em forte desequilíbrio de ligação, tanto em controles (qui-quadrado=10,077, GL=1; p=0,0028) quanto em pacientes (qui-quadrado=6,1881, GL=1; p=0,0368)

Não houve associação dos haplogrupos AA ou Bx com AR, no entanto, os genes encontrados associados, exceto *KIR2DS4*, constituem o haplogrupo B, que é mais estimulatório que o haplogrupo A. Assim, os resultados em conjunto parecem apontar para uma associação do haplogrupo B, ou seja, de uma tendência a uma maior ativação de células NK, com AR.

Existe uma deleção de 22pb no gene *KIR2DS4* que gera um receptor de membrana defeituoso que não induz a ativação celular (Maxwell et al, 2002), a detecção dessa variante não foi realizada neste estudo, para uma análise mais esclarecedora da associação do gene com a doença e da sua interação com o ligante HLA-Cw essa detecção seria necessária.

Várias doenças autoimunes têm sido associadas com os receptores KIR ativatórios. Complicações vasculares da AR foram associadas com a presença do receptor *KIR2DS2* e ausência de *KIR2DL2* na superfície de Linfócitos T CD4⁺CD28^{null} (Namekawa et al, 2000).

O trabalho de Majorczyk et al (2007) encontrou freqüências mais baixas dos genes *KIR2DS1* e *KIR3DS1* em pacientes com AR que não apresentavam erosão óssea.

Possivelmente, os genes encontrados associados neste trabalho, especialmente o *KIR2DS3*, estão associados à artrite reumatóide, pois codificam receptores com função ativadora das células *natural killer* e linfócitos T CD4⁺CD8^{null} que estão envolvidas na manutenção do estado inflamatório da AR, seja com atividade citolítica ou produção de prostaglandinas. Inferimos através do valor de *Odds Ratio* que indivíduos com gene *KIR2DS3* estão 6,88 vezes mais predispostos a artrite reumatóide.

Como pode ser visto em vários estudos há uma tendência a presença de genes estimulatórios predispor a doenças autoimunes, enquanto que a presença de genes inibitórios esta mais frequentemente associada a doenças infecciosas. Assim, nossos resultados corroboram essa tendência encontrada na literatura, com a presença de um genótipo mais ativatório conferindo melhor resposta em infecções e por outro lado, genótipos ativatórios conferindo suscetibilidade a doenças autoimunes, como mostrado por Kulkarni, 2008 e Boyton, 2007.

4. CONCLUSÃO

Os genes *KIR2DS3* e *KIR3DS1* estão associados com a predisposição a artrite reumatóide, possivelmente denotando uma relação entre maior atividade citolítica e AR, sendo a associação de *KIR3DS1* secundária devido desequilíbrio de ligação e a associação principal do gene *KIR2DS3* e indivíduos com esse gene têm aproximadamente sete vezes mais chances de desenvolver artrite reumatóide (OR=6,88).

A variabilidade do complexo de genes *KIR* foi semelhante em pacientes e controles.

Não foi encontrada associação dos haplogrupos AA e Bx com AR.

Os ligantes HLA-C tiveram freqüências semelhantes em pacientes e em controles.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNETT, F.C. The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v.31, p. 315-324, 1988.
- ARTHRITIS FOUNDATION. Rheumatoid Arthritis. Disponível em: www.arthritis.org (acesso em 02/12/09), 2000.
- BARBOSA, F.B. Associação da deleção del4/NRAMP1 com Artrite Reumatóide na população de Belém, Pará. Trabalho de Conclusão de Curso - Medicina, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.
- BASHIROVA, A.A. MARTIN, M.P. MCVICAR, D.W. CARRINGTON, M. The Killer Immunoglobulin-Like Receptor Gene Cluster: Tuning the Genome for Defese. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.** 7:277-300, 2006.
- BÉRTOLO, M., B. Atualização do consenso brasileiro no diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. **Rev Bras Reumatol**, v.47, p.151-159, 2007.
- BONGI S M. Shared-epitope HLA-DRB1 alleles and sex ratio in Italian patients with rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine.**71:24-28, 2004.
- BOYTON, R. J., ALTMANN, D. M. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. **Clin Exp Immunol.** July; 149(1): 1–8. 2007
- BONTADINI, A., TESTI, M., CUCCIA, M.C., MARTINETTI, M., CARCASSI, C., CHIESA, C., COSENTINI, E., DAMETTO, E., FRISON, S., IANNONE, A.M., LOMBARDO, C., MALAGOLI, A., MARIANI, M., MARIOTTI, L., MASCARETTI, L., MELE, L., MIOTTI, V., NESCI, S., OZZELLA, G., PIANCATELLI, D., ROMEO, G., TAGLIAFERRI, G., VATTA, S., ANDREANI, M., CONTE, G. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genes in the Italian Caucasian population. **Journal of Translational Medicine** 4:44, 2006
- BRENNAN, P., SILMAN, A. Why the gender difference in susceptibility to rheumatoid artnritis? **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 54, p. 694-695, 1995.
- CARRINGTON, M. MARTIN, M.P. The impact of Variation at the *KIR* Gene Cluster on Human Disease. **CTMI** 298:225-257, 2006.
- KULKARNI, S., MARTIN, M.P., CARRINGTON, M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. **Seminars in Immunology**, 20, 343–352, 2008.
- LEE, D.M. WEINBLATT, M.E. **Rheumatoid arthritis.** Lancet 358:903-911, 2001.

- FUGGER L. Joint-specific and systemic autoreactivity in the development of inflammatory arthritis. **Arthritis Research**, 2:2-4, 2000.
- FUGGER, L., SVEJGAARD, A. Association of MHC and rheumatoid arthritis HLA-DR4 and rheumatoid arthritis: studies in mice and men. **Arthritis Research**, v.2, p. 208-211, 2000.
- KRISHNAN S, CHOWDHURY B, TSOKOS GC. Autoimmunity in systemic lupus erythematosus: integrating genes and biology. **Semin Immunol**. 18:230-43, 2006
- LIPSKY, P.E. Artrite reumatóide. In: **Medicina Interna**. HARRISON. 14a ed. Mc Graw Hill. p. 1996-2004. Rio de Janeiro, 1998.
- MAJORCZYK E, PAWLIKA, LUSZCZEKW, NOWAK I, WISNIEWSKIA, JASEK M. Associations of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with complications of rheumatoid arthritis. **Genes Immun**; 8(8):678–83, 2007.
- MARTIN MP, NELSON G, LEE JH, PELLETT F, GAO X, WADE J, WILSON MJ, TROWSDALE J, GLADMAN D, CARRINGTON M. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating Killer Ig-like Receptor genes in the absence of specific HLA-C Alleles 1. **J Immunol**: 169:2818–22. Sequencia de primers disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/169/6/2818/DC1>, 2002.
- METOTREXATO, TOXICOLOGIA MECENÍSTICA.
http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g9_metotrexato/homepage.html. Acessado em 20/06/2009
- MIDDLETON D, MENCHACA L, ROOD H, KOMEROFSKY R. New Allele Frequency Database: <http://www.allelefreqencies.net>. **Tissue Antigens** 2003, 61, 403-407.
- MOREIRA C; CARVALHO MAP. **Noções Práticas de Reumatologia**. 2.ed. Belo Horizonte: Health,. p. 419-434. 1996.
- NAMEKAWA T, SNYDER MR, YEN JH, GOEHRING BE, LEIBSON PJ, WEYAND CM. Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4+CD28null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis. **J Immunol**; 165(2):1138–45. 2000
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, 1987.
- OTA, N. BRETT, T. J. MURPHY, T. L. FREMONT, D. H. MURPHY, K. M.:

- N-domain-dependent nonphosphorylated STAT4 dimers required for cytokine-driven activation. **Nature Immunol.** 5: 208-215, 2004.
- PARHAM P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. **Nat Rev Immunol.** 5:201-14,2005.
- PLENGE RM, PADYUKOV L, REMMERS EF, PURCELL S, LEE AT, KARLSON EW, WOLFE F, KASTNER DL, ALFREDSSON L, ALTSHULER D, GREGERSEN PK, KLARESKOG L, RIOUX JD. Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. **Am J Hum Genet.** 77:1044-1060, 2005
- PROKUNINA L, ALARCON-RIQUELME M. The genetic basis of systemic lupus erythematosus--knowledge of today and thoughts for tomorrow. **Hum Mol Genet.** 13 Spec No 1:R143-8, 2004.
- REMMERS, E. F. PLENGE, R. M. LEE, A. T. GRAHAM, R. R.; HOM, G. BEHRENS, T. W. DE BAKKER, P. I. W. LE, J. M. LEE, H.-S. BATLIWALLA, F. LI, W. MASTERS, S. L. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **New Eng. J. Med.** 357: 977-986, 2007.
- REVIRON D. HLA DRB1, DMA, and DMB gene polymorphisms in rheumatoid arthritis. **Human Immunology** 60:245-249, 1999.
- RODRÍGUEZ, M.R. GONZÁLEZ-ESCRIBANO, M.F. AGUILAR, F. VALENZUELA, A. GARCÍA, A. NÚÑEZ-ROLDÁN, A. Association of NRAMP1 promoter gene polymorphism with the susceptibility and radiological severity of rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, 59, p. 311-315, 2002.
- SACK KE E FYE KH. **Doenças Reumáticas.** In: Stites, D. P.; Terr, A. I.; Parslow, T.G. *Imunologia Médica.* 9.ed. Rio de Janeiro: Editora: Guanabara Koogan,. p.353-370. 2000.
- SAMBROOK J, FRITCH EF, MANIATIS T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.
- SINGAL DP, LI J, ZHU Y. Genetic basis for rheumatoid arthritis. **Arch Immunol Ther Exp.** 47: 307-311, 1999
- SHAM PC, CURTIS D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. **Annals of Human Genetics.** 59: 97-105, 1995.

SPECTOR, T.D. Free an serum testosterone levels in 276 males: A comparative study of rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis and healthy controls. **Clin Rheumatol**, v. 8, p. 37-41, 1989.

UNICAMP

http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/novembro2005/ju308pag03.html. Acessado em 25/06/2009.

WEYAND, C.M. GORONZY, J.J. Association of MHC and rheumatoid arthritis HLA polymorphisms in phenotypic variants of rheumatoid arthritis. **Arthritis Res**, 2:212-216, 2000.

YEN, J. -H., LIN, C. -H., TSAI, W. -C., WU, C. -C., OU, T. -T., HU, C. -J. AND LIU, H. -W. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene's repertoire in rheumatoid arthritis', **Scandinavian Journal of Rheumatology**, 35:2,124 — 127, 2006.

YEN JH, MOORE BE, NAKAJIMA T, SCHOLL D, SCHAID DJ, WEYAND CM, GORONZY JJ. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. **J Exp Med**. 21;193:1159-67, 2001