

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR  
E DO DESENVOLVIMENTO**

Cíntia Callegari Coêlho

**ASSOCIAÇÃO DE GENES *KIR* AO LÚPUS ERITEMATOSO  
SISTÊMICO EM SANTA CATARINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof. Dra. Ilíada Rainha de Souza.

Florianópolis  
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

C672a Coelho, Cíntia Callegari

Associação de genes KIR ao lúpus eritematoso sistêmico em Santa Catarina [dissertação] / Cíntia Callegari Coelho ; orientadora, Iliada Rainha de Souza. - Florianópolis, SC, 2011.

126 p.: il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Imunidade celular. 2. Receptores KIR. 3. Lupus eritematoso sistêmico - Santa Catarina. 4. Células matadoras naturais. I. Souza, Iliada Rainha de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

CDU 576

## Folha de assinaturas



## AGRADECIMENTOS

É difícil dar créditos a todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa dissertação. Contudo, existem algumas pessoas que se fizeram imprescindíveis, às quais eu sou especialmente grata:

Meus pais, que deram todo o suporte físico e emocional que eu precisei e ainda mais, sempre mais. Meu irmão, que mesmo longe sempre me acompanha de perto. O apoio incondicional que esse trio me dá foi o que me fez chegar até aqui.

Prof. Dra. Ilíada Rainha de Souza, minha mestra e orientadora nesses últimos sete anos. Sua paixão pela profissão me incentiva e me motiva a continuar nesse caminho. Muita conversa, dedicação, carinho e paciência renderam não apenas esse trabalho, mas muitas lições que levarei para a vida toda.

Dra. Andrea Rita Marrero e Dra. Yara Costa Netto Muniz, que além de integrarem a banca examinadora, colaboraram com a finalização deste estudo e fizeram um trabalho primoroso de revisão, transmitindo-me muita calma e confiança neste momento crítico.

Os demais membros da banca examinadora, Dr. José Artur Bogo Chies, Dra. Elayne Pereira e Dr. Márcio Alvarez Silva por gentilmente aceitarem o convite para integrar esta banca e garantirem valiosas contribuições ao meu trabalho.

A Dra. Maria Luiza Petlz-Erler por ceder as amostras controle e reagentes indispensáveis para a execução deste trabalho e ao Me. Danillo Gardenal Augusto pela ajuda e recomendações durante a análise de dados.

Meus colegas de laboratório, por proporcionarem um ambiente de trabalho tão agradável que por vezes parecia ser minha segunda casa. Conheci colegas, mantenho grandes amigos.

Os amigos queridos que, de longe ou de perto, de alguma forma se fizeram presentes durante todo o tempo, mesmo quando eu estava muito ocupada (e muito ausente) realizando esse trabalho. Conversas, conselhos, viagens, filmes, cafés, bons momentos que ficam na memória e tornam cada um de vocês tão especial.

Agradeço ainda aos órgãos financiadores deste trabalho: CAPES e FAPESC.

Por fim, mas não menos importante, os voluntários que doaram um pouco do seu tempo e do seu sangue para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcutá





## RESUMO

A autoimunidade resulta da falha do sistema imune em distinguir o próprio do não-próprio ou do próprio alterado e desde os primeiros estudos sobre as doenças autoimunes percebeu-se um forte componente genético. O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica que pode atingir múltiplos órgãos e acomete preferencialmente mulheres em idade reprodutiva. Os receptores KIR, expressos principalmente nas células NK, promovem o equilíbrio entre a auto-tolerância e a citotoxicidade tendo um papel importante no controle da resposta imune. Os objetivos deste trabalho foram identificar as frequências dos genes *KIR* na população de Santa Catarina e realizar um estudo de associação desses genes ao LES. O perfil genotípico de 167 pacientes e 228 controles foi determinado através de PCR-SSP de 12 locos (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1* e *KIR2DP1*). A frequência de presença de cada gene foi calculada e a frequência gênica, estimada. O teste de OR (*odds ratio*) foi utilizado para investigar a associação desses genes ao LES. Dos genes que codificam receptores inibidores, o mais presente nos casos foi *KIR2DL1* e nos controles, *KIR3DL1*. Os genes *KIR2DL2* e *KIR2DL5* foram os menos presentes no grupo de casos e controles, respectivamente. Dentre os genes de receptores ativadores, *KIR2DS4* foi mais presente tanto nos casos como nos controles, e *KIR2DS3* o menos presente. Seis genes apresentaram associação ao LES: *KIR2DL2* (OR 2,781,  $p = 0,001$ ), *KIR2DL5* (OR 0,290,  $p < 0,001$ ), *KIR2DP1* (OR 0,340,  $p = 0,048$ ), *KIR2DS1* (OR 0,437,  $p < 0,001$ ), *KIR2DS5* (OR 4,300,  $p < 0,001$ ) e *KIR3DS1* (OR 0,562,  $p = 0,009$ ). Foi observada a ocorrência de 102 perfis genotípicos, sendo que 30 são inéditos e a frequência do haplogrupo A foi de 17,6% em casos e 9,5% em controles. Desta forma, pode-se afirmar que os genes *KIR* estão associados ao LES.

Palavras-chave: autoimunidade, genes KIR, lúpus eritematoso sistêmico, células *natural killer*



---

**ABSTRACT**

Autoimmunity results from the failure of the immune system distinguishing self from non-self or altered self and since the first studies about the autoimmune diseases it was observed a strong genetic component in it. Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory disease that can affect multiple organs and strikes preferably women in reproductive age. KIR receptors, expressed mainly in NK cells promote the balance between auto-tolerance and cytotoxicity, with an important role in the control of immune response. The objectives of this work were to identify the *KIR* gene frequencies in the population of Santa Catarina and to perform an association study of these genes to SLE. The genotypic profile of 167 patients and 228 controls was determined through PCR-SSP of 12 *loci* (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1* e *KIR2DP1*). The frequency of presence of each gene was calculated and the genic frequency was estimated. The OR (odds ratio) test was used to investigate the association of these genes to SLE. Among the genes coding for inhibitory receptors, the most present one in the cases was *KIR2DL1*, and in controls, *KIR3DL1*. *KIR2DL2* and *KIR2DDL5* were the least present in the cases and controls, respectively. Among the genes encoding activating receptors, *KIR2DS4* was the most present in both groups and *KIR2DS3* the least present. Six *loci* presented an association to SLE: *KIR2DL2* (OR 2.781,  $p = 0.001$ ), *KIR2DL5* (OR 0.290,  $p < 0.001$ ), *KIR2DP1* (OR 0.340,  $p = 0.048$ ), *KIR2DS1* (OR 0.437,  $p < 0.001$ ), *KIR2DS5* (OR 4.300,  $p < 0.001$ ) and *KIR3DS1* (OR 0.562,  $p = 0.009$ ). It was observed the occurrence of 102 genotypic profiles, being 30 of them so far unpublished and the frequency of the haplogroup A is 17.6% in cases and 9.5% in controls. Hence, one can state that the *KIR* genes are associated to SLE.

Keywords: autoimmunity, KIR genes, systemic lupus erythematosus, natural killer cells



---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura e nomenclatura de moléculas KIR. Os domínios extracelulares estão representados acima da membrana (MC) e as caudas citoplasmáticas, abaixo. Caudas longas (L) e curtas (S) e o número de domínios extracelulares (D) definem o nome do gene 27

Figura 2: Representação do cromossomo 19, indicando o complexo de receptores leucocitários e a localização dos genes *KIR*, tendo como exemplo um haplótipo do haplogrupo A 28

Figura 3: Estrutura de 9 éxons de um gene *KIR*. A organização éxon-íntron se relaciona intimamente com o domínio funcional que ele codifica. Os retângulos azuis representam éxons e as linhas representam introns. Líder = sequência líder; D0 = domínio D0; D1 = domínio D1; D2 = domínio D2; Haste = sequência de ligação entre os domínios extracelulares e a região transmembranar; TM = região transmembranar; CIT = cauda citoplasmática 29

Figura 4: Organização dos domínios dos receptores KIR. Domínios semelhantes a imunoglobulinas D0, D1 e D2 estão representados em cinza, azul e verde, respectivamente. KIR inibidores possuem o motivo inibidor ITIM nos seus domínios citoplasmáticos, e KIR ativadores e KIR2DL4 tem um resíduo de aminoácido positivamente carregado no domínio transmembranar 31



**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na genotipagem dos genes *KIR* pela técnica de PCR-SSP e tamanho do fragmento amplificado, em pares de bases 40

Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na comparação das técnicas de genotipagem dos genes *KIR* através de PCR-SSP e tamanho do fragmento amplificado, em pares de bases (MARTIN e CARRINGTON, 2008). As letras A e B referem-se a diferentes pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar fragmentos diferentes do mesmo gene 43

Tabela 3: Distribuição de sexo, idade e ancestralidade em pacientes com LES (casos) e indivíduos saudáveis (controles) e o valor do  $\chi^2$  do teste de homogeneidade entre as duas populações amostradas. 44

Tabela 4: Genótipos identificados para presença ou ausência de 12 locos *KIR* e estimativa das frequências gênicas ( $f$ ) para pacientes com LES (casos) e indivíduos saudáveis (controles) e cálculos de associação ( $OR$ ) entre a presença ou ausência dos genes e o desenvolvimento do LES, seguidos de valores de IC 95% e  $p$ . 46

Tabela 5: Distribuição da presença dos genes *KIR* entre diferentes populações. 47

Tabela 6: Frequência dos perfis genotípicos encontrados nas amostras de pacientes com LES (casos) e indivíduos saudáveis (controles) e número de identificação dos genótipos segundo Gonzalez-Galarza *et al.* (2011)<sup>a</sup>. Retângulos pretos indicam presença do gene e retângulos brancos indicam ausência do gene. 50

Tabela 7: Frequência inferida dos haplogrupos A e B em pacientes com LES (casos) e indivíduos saudáveis (controles). 54

Tabela 8: Resultados obtidos a partir da genotipagem dos genes *KIR* utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de Martin e Carrington, 2008. Na terceira linha está apresentada a proporção de resultados concordantes com a genotipagem realizada com os iniciadores de Vilches *et al.*, 2007 (adotados no presente estudo). As letras A e B referem-se a diferentes pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar fragmentos diferentes do mesmo gene. Fundo cinza indica resultado diferente do obtido anteriormente.



## LISTA DE ABREVIATURAS

CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CTL	linfócito T citotóxico, do inglês <i>cytotoxic T lymphocyte</i>
CRP	proteína C-reativa, do inglês <i>C-reactive protein</i>
CYT	cauda citoplasmática
D0, D1, D2	domínios da molécula KIR
DAP12	proteína adaptadora que contém ITAM
dl	deletado, do inglês <i>deleted</i>
DL	desequilíbrio de ligação
DNA	ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético, do inglês <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
<i>f</i>	frequência
FcεRI-γ	proteína adaptadora que contém ITAM
GALC	gene galactosilceramidase
HIV	vírus da imunodeficiência humano, do inglês <i>human immunodeficiency virus</i>
HU	Hospital Universitário
IC	Intervalo de confiança
ITAM	motivo de ativação baseado em tirosina de um imunoreceptor, do inglês <i>immunoreceptor tyrosin-based activatory motif</i>
ITIM	motivo de inibição baseado em tirosina de um imunoreceptor, do inglês <i>immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif</i>
Kb	quilobase
KIR	receptor das células <i>natural killer</i> semelhante a imunoglobulina, do inglês <i>killer-cell immunoglobulin-like receptor</i>
LRC	complexo de receptores leucocitários, do inglês <i>leukocyte receptor complex</i>
LES	lúpus eritematoso sistêmico
MHC	complexo principal de histocompatibilidade, do inglês <i>major histocompatibility complex</i>
n	número amostral

<i>NDN</i>	gene necdin homólogo
NETI	Núcleo de Estudos da Terceira Idade
NK	do inglês <i>natural killer</i>
<i>OR</i>	<i>odds ratio</i>
<i>p</i>	probabilidade
pb	pares de bases
<i>PCR</i>	reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
SNP	polimorfismo de um único nucleotídeo, do inglês <i>single nucleotide polymorphism</i>
<i>SSOP</i>	sonda de sequência específica, do inglês <i>sequence specific oligonucleotide probe</i>
<i>SSP</i>	oligonucleotídeo iniciador de sequência específica, do inglês <i>sequence specific primer</i>
TM	região transmembranar

---

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Sistema imune e autoimunidade	21
1.2 Lúpus eritematoso sistêmico	22
1.3 Células NK	23
1.4 Os receptores KIR e os genes que os codificam	25
1.4.1 <i>Nomenclatura e função</i>	26
1.4.2 <i>Os genes KIR</i>	28
1.4.3 <i>Os haplogrupos KIR</i>	30
1.4.4 <i>Os receptores KIR</i>	30
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Aspectos éticos	37
4.2 Obtenção das amostras	37
4.3 Processamento e conservação das amostras	38
4.4 Extração e quantificação de DNA	38
4.5 Genotipagem	38
4.7 Análise e tratamento dos dados	41
4.8 Comparação de técnicas	42
5. RESULTADOS	44
5.1 Caracterização da amostra	44
5.2 Genótipos e análise de associação	45
5.3 Perfis genotípicos	50
5.4 Comparação de técnicas	54
6. DISCUSSÃO	60

6.1 Caracterização da amostra	60
6.2 Genótipos e análise de associação	61
6.3 Perfis genotípicos	65
6.4 Comparação de técnicas	67
7. CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	85
Anexo A: Questionário aplicado a pacientes com lúpus eritematoso sistêmico	87
Anexo B: Termo de consentimento livre e esclarecido e declaração de consentimento dos pacientes	95
Anexo C: Questionário aplicado a indivíduos controles	101
Anexo D: Termo de consentimento livre e esclarecido e declaração de consentimento dos controles	109
Anexo E: Protocolo de extração de DNA	115
Anexo F: Protocolo de amplificação dos fragmentos dos genes <i>KIR</i>	119
Anexo G: Compilação de genes <i>KIR</i> previamente associados a doenças autoimunes, tipo de associação, número amostral, população estudada e oligonucleotídeos iniciadores utilizados	123

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Sistema imune e autoimunidade

O sistema imune defende o corpo contra uma miríade de patógenos, incluindo bactérias, vírus e parasitas, uma tarefa que requer que as células desse sistema tenham um repertório muito grande de receptores para assegurar que os patógenos sejam reconhecidos. Esse reconhecimento leva à expansão clonal dos linfócitos patógeno-específicos, que direta ou indiretamente eliminam o patógeno invasor. Um pré-requisito para este processo é o reconhecimento do próprio e do não-próprio ou do próprio alterado. Os receptores são gerados num processo randômico, e células com receptores com afinidade demasiada ou muito fraca pelos ligantes são eliminadas por mecanismos de seleção. As células que escaparem desse mecanismo podem levar ao desenvolvimento de autoimunidade, e dependendo do perfil de expressão do antígeno, as células autorreativas podem induzir doenças autoimunes órgão-específicas ou sistêmicas (GRIESEMER, SORENSON e HARDY, 2010; JÄGER e KUCHROO, 2010).

A autorreatividade em si é um aspecto normal do processo fisiológico de inflamação tecidual, enquanto que a característica da autoimunidade patológica (doença autoimune) é a persistência de autoreatividade causada pelo suprimento contínuo de sinais de perigo (estruturas liberadas ou produzidas pelas células ou tecidos submetidos a estresse ou morte celular anormal que induzem a ativação de células apresentadoras de antígeno), ou seja, autoreatividade crônica (TVEITA, 2010).

A autoimunidade causa diversas doenças no homem e estima-se que afete de 5 a 8% da população humana. A etiologia da maioria das doenças autoimunes humanas continua obscura, e o conhecimento sobre esses processos imunológicos ainda é um grande desafio para os pesquisadores (OLIVER e SILMAN, 2009).

As doenças autoimunes podem ser sistêmicas ou órgão-específicas. Por exemplo, a formação de complexos imunes circulantes compostos de antígenos próprios e de anticorpos específicos tipicamente produz doenças sistêmicas, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES). Em contraste, respostas com

autoanticorpos ou células T contra antígenos próprios com distribuição tecidual restrita levam a doenças órgão-específicas, como o diabetes melito tipo I e a esclerose múltipla (revisado por JÄGER e KUCHROO, 2010).

Os principais elementos que contribuem para o desenvolvimento da autoimunidade são a suscetibilidade genética e os fatores ambientais, como as infecções. Eles colaboram para a quebra da auto-tolerância e promovem o influxo de linfócitos autorreativos e sua ativação, resultando em lesão tecidual (FIERABRACCI, 2011).

Desde os primeiros estudos sobre as doenças autoimunes em pacientes e animais, percebeu-se que elas têm forte componente genético, e estudos com gêmeos corroboram essa evidência (CRISWELL, 2008).

Algumas disfunções autoimunes podem compartilhar genes envolvidos na sua etiologia e também os mesmos mecanismos-base (ALARCÓN-SEGOVIA *et al.*, 2005; GREGERSEN e BEHRENS 2006). A maioria das doenças autoimunes é poligênica, e os indivíduos afetados herdam múltiplos polimorfismos genéticos que contribuem para a suscetibilidade a doenças, sugerindo que estes influenciam mecanismos gerais da imunorregulação e auto-tolerância (DIEUDÉ, 2009).

O LES é considerado o protótipo das doenças autoimunes, tanto pela sua heterogeneidade clínica, que resulta em manifestações extremamente variáveis da doença bem como suas consequências, quanto pela variação em termos de autoanticorpos produzidos (CRISWELL, 2008).

## **1.2 Lúpus eritematoso sistêmico**

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica que pode atingir múltiplos órgãos e acomete preferencialmente mulheres jovens. As suas manifestações clínicas são extremamente variadas, tanto na apresentação inicial como no curso da doença. Dentre os sintomas, a principal característica é o acometimento da pele, com aparecimento de eritema malar em forma de borboleta, eritemas pelo corpo, além de inflamações nas articulações, pulmões, rins, coração e membranas serosas. Apresenta uma evolução crônica, caracterizada por períodos de atividade inflamatória e posterior remissão da mesma (RAHMAN e ISENBERG, 2008).

A doença é caracterizada pela ativação de células B policlonais e a produção de autoanticorpos contra diversas proteínas nucleares, mais especificamente, dupla fita de DNA, que levam a dano tecidual através da formação e deposição de imunocomplexos autoanticorpo-autoantígeno (RAHMAN e ISENBERG, 2008; HARLEY *et al.*, 2009).

Embora possa ocorrer em qualquer idade, a doença é mais frequente entre os 20 e 45 anos, durante o período reprodutivo, sendo que o sexo feminino é cerca de 10 vezes mais afetado que o masculino (RAHMAN e ISENBERG, 2008; OLIVER e SILMAN, 2009; GONZÁLEZ *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos realizados nos Estados Unidos mostram uma prevalência de LES variando de 1 caso para 2.000 até 1 para 10.000 habitantes. Um estudo realizado com a população brasileira indica incidência de 8,7 casos a cada 100.000 habitantes (VILAR e SATO, 2002; SATO *et al.*, 2002; SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2008; FAUCI *et al.*, 2009).

Não obstante a causa do LES seja desconhecida, admite-se que fatores genéticos, hormonais e ambientais participem do desencadeamento desta doença (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2008; ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MEN, 2011).

O componente genético no desenvolvimento desta doença se tornou evidente em estudos com gêmeos, quando se verificou concordância na presença de LES entre 24% e 69% para gêmeos monozigóticos e 2% a 9% para gêmeos dizigóticos. Além disso, 10 a 20% dos pacientes têm um parente de primeiro grau afetado pela mesma doença (CRISWELL, 2008; DIEUDÉ, 2009; HEWAGAMA e RICHARDSON, 2009).

Foi verificado, em pacientes com lúpus, deficiência de células *natural killer* (NK), tanto pelo número reduzido quanto pela diminuição de função dessas células, entretanto, ainda não está claro se essa diminuição é uma causa ou um sintoma da doença (CARRINGTON e MARTIN, 2006).

### 1.3 Células NK

Células *natural killer* são uma subpopulação de linfócitos que reconhecem e extinguem células infectadas por vírus, outros patógenos intracelulares e células neoplásicas através da

produção de citocinas e quimiocinas. Elas representam 5 a 25% da população de linfócitos circulantes e têm um papel fundamental na regulação das respostas imunes, influenciando tanto a imunidade inata quanto a adaptativa (PARHAM *et al.*, 2010; VIVIER *et al.*, 2011).

O reconhecimento das células-alvo pelas células NK é distinto daquele dos fagócitos, outra classe de células efetoras da imunidade inata. Enquanto os receptores dos fagócitos se ligam diretamente a determinantes antigênicos de um organismo invasor e desenvolvem uma resposta imunológica que leva a morte desta célula, as células NK interagem com células do próprio organismo que estejam infectadas ou malignamente transformadas, por isso elas tem um sistema elaborado de identificação do próprio e do não-próprio, ou próprio alterado, por intermédio dos seus receptores (BASHIROVA *et al.*, 2006; CHEENT e KHAKOO, 2009).

Células NK não expressam receptores antígeno-específicos que requerem rearranjos gênicos somáticos, como fazem as células T e B, mas são reguladas por uma gama de receptores de superfície codificados germinalmente, com funções tanto ativadoras quanto inibidoras, expressos de forma estocástica e variegada, resultando em vários subgrupos de células NK de função distinta. Ainda não está claro se a heterogeneidade reflete subpopulações de células NK ou diferentes estágios na sua ativação ou maturação (MORETTA e MORETTA, 2004; PERRICONE *et al.*, 2008; CHEENT e KHAKOO, 2009; ORR e LANIER, 2010; SCHLEINIZ *et al.*, 2010).

Os receptores expressos pelas células NK reconhecem moléculas do MHC (*major histocompatibility complex* – complexo principal de histocompatibilidade) de classe I ou moléculas estruturalmente relacionadas a essas. A interação entre os receptores e os ligantes durante o desenvolvimento dessas células gera um equilíbrio que impede que células NK maduras destruam células saudáveis do corpo. Por outro lado, de acordo com a hipótese conhecida como “*missing-self*” (LJUNGGREN *et al.*, 1991), quando a expressão do MHC de classe I é perturbada por infecções, transformações malignas ou outras formas de estresse, os receptores inibitórios não são estimulados pelos seus ligantes, tornando as células afetadas suscetíveis à destruição pelas células NK (VILCHES e PARHAM, 2002; BRODIN, KÄRRE e HÖGLUND, 2009; PARHAM *et al.*, 2010).



Apesar de geralmente serem classificadas como células do sistema imune inato devido à ausência de rearranjo cromossômico, as células NK exibem muitas características associadas com a imunidade adaptativa, incluindo a expansão clonal de linfócitos antígeno-específicos, a geração de células de memória que persistem após o encontro com o antígeno cognato e a habilidade de montar uma resposta secundária (ORR e LANIER, 2010). Além do seu efeito citotóxico e antiviral, as células NK não são apenas erradicadoras, mas também reguladoras da resposta imune adaptativa, interagindo e provendo sinais estimuladores para os componentes desse sistema, incluindo células T. Essa interação implica em um papel importante na imunidade e no potencial envolvimento em uma vasta gama de doenças, incluindo infecções, cânceres e especialmente doenças autoimunes, uma vez que as células NK tenham receptores com perfil de forte ativação do sistema imune (CARRINGTON e MARTIN, 2006). Soma-se a isso o fato de que alterações na função citotóxica das células NK são frequentemente observadas em pacientes de doenças autoimunes ou outras condições inflamatórias (PERRICONE *et al.*, 2008; FLODSTRÖM-TULLBERG *et al.*, 2009).

As doenças autoimunes são iniciadas a partir de uma série de acontecimentos, incluindo a liberação de auto-antígenos do órgão-alvo, a interação do antígeno com células T e B nos órgãos linfoides secundários e finalmente, o direcionamento de células do sistema imune para o tecido ou órgão-alvo e sua subsequente destruição. As células NK podem agir nessas três etapas, uma vez que são mediadoras do dano inicial do alvo, levando à liberação de auto-antígenos ou modulando a resposta imunológica (FLODSTRÖM-TULLBERG *et al.*, 2009).

#### **1.4 Os receptores KIR e os genes que os codificam**

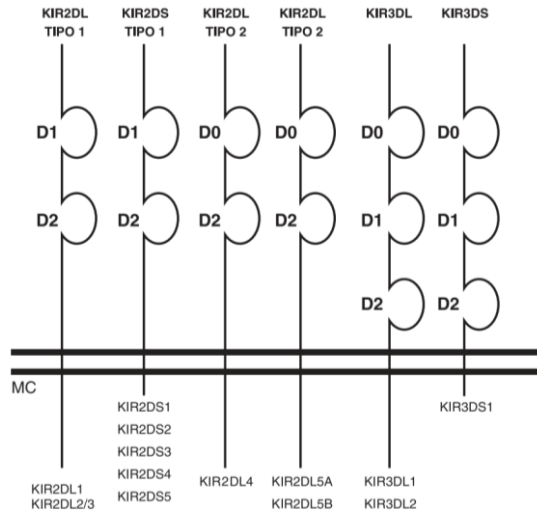
A sigla KIR foi proposta pela primeira vez em 1996 e significava receptores inibidores de células *natural killer* (*killer-cell inhibitory receptors*) (LONG, COLONNA e LANIER, 1996). Quando se descobriu que as moléculas KIR também podiam ativar as células NK, a sigla foi mantida, porém o nome mudado para receptores das células NK semelhantes a imunoglobulinas (*killer-cell immunoglobulin-like receptors*) (ROBINSON *et al.*, 2010).

Os KIR são membros de um grupo de moléculas reguladoras encontradas em um subconjunto de células linfóides, expressos principalmente nas células NK, apesar de também serem encontrados nos linfócitos T, reafirmando seu papel na imunidade adaptativa (KHAKOO e CARRINGTON, 2006; BARROW e TROWSDALE, 2008; BERGEN e KONING, 2010). Foram identificados pela sua habilidade de conceder especificidade na citólise mediada pelas NK (KINDT, GOLDSBY e OSBORNE, 2008) e promovem o equilíbrio entre a auto-tolerância e a citotoxicidade (BASHIROVA *et al.*, 2006), tendo um papel importante no controle da resposta imune. Este fato poderia explicar a associação observada entre certos genes *KIR* e o lúpus eritematoso sistêmico, a artrite reumatoide e a artrite psoriática bem como no controle da progressão do HIV (CARRINGTON e NORMAN, 2003; CARRINGTON e MARTIN, 2006; KHAKOO e CARRINGTON, 2006; PELLET *et al.*, 2007; GRAHAM *et al.*, 2009).

Os receptores KIR são codificados pela família de genes *KIR*, composta por 14 genes e 2 pseudogenes, com uma diversidade substancial em relação aos locos e alelos, que são expressos de forma clonal e estocástica, gerando um repertório de células NK que apresentam diferentes combinações de KIR no mesmo indivíduo (CHEENT e KHAKOO, 2009).

### 1.4.1 Nomenclatura e função

A nomenclatura dos receptores KIR se baseia na estrutura da molécula proteica, que consiste no número de domínios extracelulares semelhantes à imunoglobulina (dois ou três) e no tamanho da cauda citoplasmática, sendo L para caudas longas (do inglês *long*) e S para caudas curtas (do inglês *short*) (JOBIM e JOBIM, 2008) (figura 1).

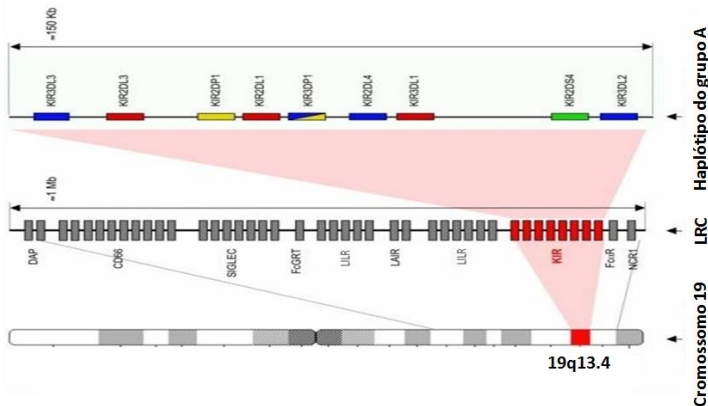


**Figura 1: Estrutura e nomenclatura de moléculas KIR. Os domínios extracelulares estão representados acima da membrana (MC) e as caudas citoplasmáticas, abaixo. Caudas longas (L) e curtas (S) e o número de domínios extracelulares (D) definem o nome do gene (JOBIM e JOBIM, 2008).**

Em geral, moléculas com caudas citoplasmáticas longas promovem sinais de inibição por estarem associadas a motivos inibitórios (ITIMs – *immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif*), enquanto aquelas com caudas curtas promovem sinais de ativação através da interação de um resíduo de aminoácido positivamente carregado na região transmembranar do receptor com um resíduo de aminoácido negativamente carregado na região transmembranar da proteína adaptadora DAP12, a qual carrega um motivo ativador (ITAM – *immunoreceptor tyrosin-based activation motif*). O receptor KIR2DL4 é uma exceção, pois parece produzir tanto sinais de inibição, devido à presença de um ITIM na sua cauda citoplasmática, quanto de ativação, através da interação com uma proteína acessória semelhante à DAP12, Fc $\epsilon$ RI- $\gamma$ , que envia sinal estimulatório para a célula através do seu ITAM (CARRINGTON e NORMAN, 2003; KIKUCHI-MAKI, CATINA e CAMPBELL, 2005; PARHAM, 2005; BARROW e TROWSDALE, 2008; CHEENT e KHAKOO, 2009; PARHAM *et al.*, 2010).

### 1.4.2 Os genes *KIR*

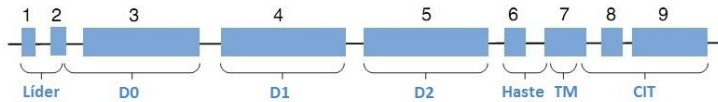
Os locos *KIR*, que contêm uma família de genes polimórficos e altamente homólogos, estão na região 19q13.4, estendendo-se por aproximadamente 150kb dentro do complexo de receptores leucocitários (LRC – do inglês *leukocyte receptor complex*) (figura 2). O tamanho de cada gene varia de 10 a 16Kb de comprimento e são separados entre si por uma sequência de aproximadamente 2kb (CARRINGTON e NORMAN, 2003; CARRINGTON e MARTIN, 2006).



**Figura 2: Representação do cromossomo 19, indicando o complexo de receptores leucocitários e a localização dos genes *KIR*, tendo como exemplo um haplótipo do haplogrupo A (ROBINSON *et al.*, 2010).**

A estrutura básica de um gene *KIR* é composta por 9 éxons e está representada esquematicamente na figura 3. De maneira geral, os genes *KIR* apresentam alta homologia entre si, e o alinhamento das sequências nucleotídicas mostra apenas polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs* – do inglês *single nucleotide polymorphism*) entre os genes na maioria das áreas alinhadas. Apesar do alto grau de similaridade, de 85 a 99% (SINGLE *et al.*, 2008), os genes *KIR* e seus alelos codificam proteínas que tem características diversas em termos de ligantes, expressão na superfície celular, sinalização intracelular e dobramento da proteína. Além disso, a diversidade das sequências nucleotídicas nas regiões regulatórias afeta a

capacidade transcricional de alguns genes e alelos (BASHIROVA *et al.*, 2006).



**Figura 3: Estrutura de 9 éxons de um gene *KIR*. A organização éxon-intron se relaciona intimamente com o domínio funcional que ele codifica. Os retângulos azuis representam éxons e as linhas representam introns. Líder = sequência líder; D0 = domínio D0; D1 = domínio D1; D2 = domínio D2; Haste = sequência de ligação entre os domínios extracelulares e a região transmembranar; TM = região transmembranar; CIT = cauda citoplasmática (adaptado de BASHIROVA *et al.*, 2006).**

Os éxons 1 e 2 codificam o peptídeo-sinal e os dois primeiros aminoácidos do polipeptídeo maduro. Os éxons 3, 4 e 5 codificam domínios semelhantes a imunoglobulina, D0, D1 e D2, respectivamente. O éxon 6 codifica uma haste que conecta o domínio D2 à região transmembranar codificada pelo éxon 7, enquanto a cauda citoplasmática é codificada pelos éxons 8 e 9 (figura 3) (VILCHES e PARHAM, 2002).

Os *KIR* se situam em um segmento de DNA que passou por expansões e contrações ao longo do tempo, e uma análise dos haplótipos *KIR* sugere uma história de duplicação gênica e permuta desigual na região (CARRINGTON e NORMAN, 2003). Acredita-se que os receptores ativadores tenham surgido por duplicação e conversão gênica dos receptores inibidores e seu papel inicial era se ligar a moléculas semelhantes a HLA de classe I codificadas por vírus, permitindo à célula NK eliminar células infectadas (ABI-RACHED e PARHAM, 2005; ORR e LANIER, 2010; BERGEN e KONING, 2010;).

As mudanças de inibidor para ativador envolvem apenas de cinco a sete alterações nucleotídicas, introduzindo um resíduo de aminoácido carregado na região transmembranar que se liga ao DAP12 e elimina os ITIMs. Como esses receptores derivam dos *KIR* inibitórios com especificidade para HLA de classe I, ao menos alguns dos *KIR* ativadores (*KIR* 2DS1, 2DS4) mantêm essa especificidade (BERGEN e KONING, 2010).

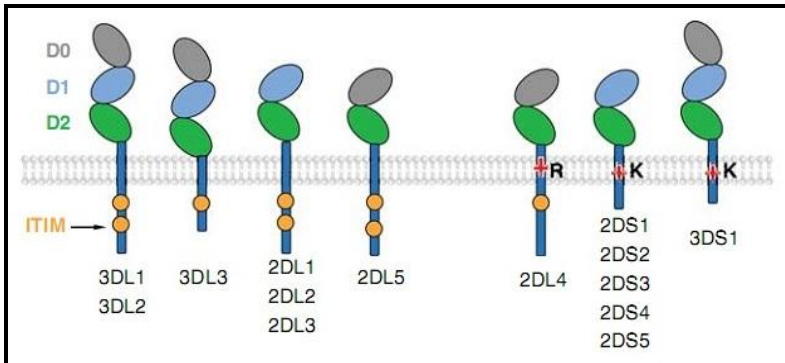
### 1.4.3 Os haplogrupos *KIR*

Os haplótipos *KIR* podem ser distinguidos de acordo com os genes que apresentam e apesar de variarem em número e tipo de genes presentes, os locos *KIR2DL4*, *KIR3DP1*, *KIR3DL2*, e *KIR3DL3* estão presentes em praticamente todos os haplótipos na margem das regiões centromérica e telomérica, sendo por isso chamados genes moldura. Todos os outros existem em apenas uma fração dos demais haplótipos (CARRINGTON e NORMAN, 2003).

O número de genes *KIR* presentes em um haplótipo (combinação de genes encontrada em um cromossomo) varia de 7 a 12. Baseado no conteúdo gênico, os haplótipos foram divididos em dois grupos, A e B. A principal característica do haplogrupo A é possuir apenas um gene que codifica um receptor ativador, *KIR2DS4*. Ele possui sete locos gênicos: *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DS4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* e *KIR3DL3* e dois pseudogênicos: *KIR2DP1* e *KIR3DP1*. O haplogrupo B contém os demais haplótipos, que apresentam pelo menos um dos seguintes genes: *KIR2DL2*, *KIR2DL5*, *KIR3DS1*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5*, além daqueles presentes no haplogrupo A (ROBINSON *et al.*, 2010; GONZALEZ-GALARZA *et al.*, 2011). A diferença funcional mais relevante entre os dois haplogrupos parece ser o número de receptores ativadores presentes, maior no haplogrupo B. Vale ressaltar que existe um alelo nulo de *KIR2DS4*, caracterizado pela deleção de 21 pares de bases na região transmembranar, que leva à ausência de receptores ativadores na maioria dos indivíduos com haplogrupo A (CARRINGTON e NORMAN, 2003; SINGLE *et al.*, 2008).

### 1.4.4 Os receptores *KIR*

Similaridades estruturais e de sequência através de moléculas *KIR* distintas definem três tipos de domínios semelhantes a imunoglobulinas (*Ig-like*), denominados D0, D1 e D2. Todas as moléculas *KIR3D* tem a configuração D0-D1-D2. As moléculas *KIR2D* tem D1-D2 (tipo 1) ou D0-D2 (tipo 2) (BASHIROVA *et al.*, 2006) (figura 4).



**Figura 4: Organização dos domínios dos receptores KIR. Domínios semelhantes a imunoglobulinas D0, D1 e D2 estão representados em cinza, azul e verde, respectivamente. KIR inibidores possuem o motivo inibidor ITIM nos seus domínios citoplasmáticos, e KIR ativadores e KIR2DL4 tem um resíduo de aminoácido positivamente carregado no domínio transmembranar (BASHIROVA *et al.*, 2006).**

Cada gene *KIR* inibidor codifica um receptor que se liga a um conjunto de moléculas de antígeno leucocitário humano (HLA) -A, -B ou -C, que são expressas em todas as células nucleadas. Através dessa ligação, o receptor transmite um sinal inibitório via ITIM, que inibe a ativação da célula NK e assim, previne o ataque a tecido HLA-positivo. Células infectadas por vírus e células cancerosas geralmente perdem a expressão de HLA de classe I, podendo então ser eliminadas pelas células NK (BERGEN e KONING, 2010).

As células NK precisam diferenciar células saudáveis de células infectadas ou transformadas de acordo com a prevalência de sinais inibidores sobre sinais ativadores, mediados por receptores KIR (CARRINGTON e NORMAN, 2003).





## 2. JUSTIFICATIVA

Levando em consideração a importância dos mecanismos de regulação da resposta imune para o equilíbrio entre a resposta a antígenos estranhos e a tolerância a antígenos próprios, sugere-se a investigação de moléculas que estejam diretamente relacionadas a estes eventos. Além disso, foi verificado que pacientes acometidos por doenças autoimunes têm menor número de células NK, além de função reduzida delas (CARRINGTON e MARTIN, 2006).

Os receptores das células NK foram associados a doenças infecciosas (KHAKOO *et al.*, 2004), cânceres (CARRINGTON *et al.*, 2005; LOPEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2005a e LOPEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2005b), diabetes tipo 1 (van der SLIK *et al.*, 2003), artrite psoriática (MARTIN *et al.*, 2002; NELSON *et al.*, 2004), vasculite reumatoide (YEN *et al.*, 2001), entre outras.

Pelo fato de as moléculas KIR serem expressas nessas células e poderem tanto ativar quanto inibir a resposta imune, elas provavelmente têm um papel importante no controle desse processo, o que poderia explicar a possível associação entre a presença ou ausência de certos genes *KIR* no lúpus eritematoso sistêmico.

Este estudo caso-controle também colabora com a pesquisa de marcadores moleculares para o LES, podendo contribuir para melhorar o diagnóstico e, talvez, a detecção de novos alvos terapêuticos para essa doença.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Identificar as frequências dos genes *KIR* na população de Santa Catarina e realizar um estudo de associação desses genes ao lúpus eritematoso sistêmico.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Otimizar a técnica de PCR-SSP para a genotipagem dos genes *KIR* no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE).
  - Identificar o perfil gênico de cada indivíduo com LES e do grupo controle.
  - Calcular a frequência da presença de cada gene *KIR* em casos e controles.
  - Estimar, assumindo o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, as frequências dos genes *KIR* em casos e controles.
  - Calcular a frequência dos haplogrupos A e B descritos para os genes *KIR* em casos e controles.
  - Avaliar o papel dos diferentes genes *KIR* no LES através de um estudo de associação caso-controle.
  - Comparar as frequências de presença dos genes *KIR* observadas no presente estudo com demais populações verificadas na literatura.



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos éticos**

Este trabalho faz parte de um projeto mais amplo, coordenado pela Dra. Ilíada Rainha de Souza, intitulado “Genética da Autoimunidade: polimorfismos em Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatoide em pacientes de Santa Catarina”, aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina, parecer de número 172/06, de 26/06/2006.

### **4.2 Obtenção das amostras**

As coletas foram realizadas pela equipe do grupo de pesquisa Genética Humana Aplicada, cadastrado no CNPq, do qual faz parte a autora deste trabalho.

A amostra constitui-se de 167 pacientes com LES atendidos pelo Hospital Universitário (HU) - UFSC, no período de agosto de 2005 a agosto de 2010, diagnosticados pelos reumatologistas da Instituição, com ou sem sobreposição do LES com outras doenças autoimunes. Todos os pacientes encontrados no ambulatório nos períodos de coleta foram convidados a participar da pesquisa, não havendo outros fatores de seleção além da presença de LES. O grupo controle é composto por 228 indivíduos coletados no HU - UFSC, no Hospital Florianópolis e no Núcleo de Estudos da Terceira Idade (NETI) da UFSC. Os critérios de seleção foram: não existir histórico familiar nem evidência de doença autoimune (de acordo com relato durante entrevista) e gênero, predominantemente feminino, para acompanhar o grupo de casos.

Os dados familiares e epidemiológicos dos pacientes foram obtidos durante entrevista, através de questionários estruturados (ANEXO A). Após a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO B) e da entrevista, foram coletados cerca de 8 ml de sangue periférico para extração de DNA e obtenção de dados genéticos. Os dados familiares e epidemiológicos dos controles foram obtidos de maneira similar (ANEXOS C e D), bem como o consentimento esclarecido e a coleta de sangue. Dos dados familiares e epidemiológicos adquiridos, foram utilizados neste trabalho para caracterização da amostra: gênero, idade e

ancestralidade, em pacientes e indivíduos controles. Para este estudo, a ancestralidade foi determinada de acordo com as características fenotípicas observadas pelo entrevistador.

### **4.3 Processamento e conservação das amostras**

Cada indivíduo recebeu um número de identificação que foi utilizado para todos os procedimentos e análises moleculares e que permite acessar todos os dados genéticos e epidemiológicos disponíveis para cada amostra no banco de dados do LAPOGE.

As amostras de sangue contendo EDTA foram centrifugadas a 3000 rotações por minuto (rpm) (centrífuga *excelsa II* modelo 206BL para 8 tubos de 8 a 15ml) durante 20 minutos, para separação das hemácias, do plasma e dos leucócitos (*buffy coat*), os quais foram utilizados para extração de DNA genômico. Após a separação dos componentes do sangue, eles foram transferidos para microtubos e estocados à temperatura de -20°C.

### **4.4 Extração e quantificação de DNA**

Para a extração de DNA genômico das amostras foi empregada a técnica descrita por Sambrook, Fritsch e Maniatis (2001), que utiliza TRITON-X e Proteinase K (ANEXO E). Após a extração, o DNA passou a integrar um Banco de DNA do LAPOGE.

Posteriormente foi realizada a quantificação do DNA através da absorbância medida em 260nm e 280nm em espectrofotômetro (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 2001). A partir daí, alíquotas das amostras foram diluídas para a concentração de uso de 20µg/ml.

### **4.5 Genotipagem**

A determinação do perfil genotípico de cada indivíduo foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase através de oligonucleotídeos iniciadores de sequência específica (PCR-SSP – *polymerase chain reaction – sequence specific primer*) e cada gene *KIR* foi amplificado individualmente (tabela 1) (VILCHES *et al.*, 2007). Posteriormente, a determinação da presença ou ausência dos genes em cada indivíduo foi feita

através da amplificação ou não do fragmento correspondente a cada gene verificada por eletroforese dos produtos das PCR.

Como controle da reação de PCR, visando evitar falso-negativos, além da amplificação dos fragmentos dos genes *KIR*, ocorreu a amplificação simultânea de um fragmento do gene *NDN* (*necdin homologue*) ou *GALC* (*galactosylceramidase*) (ALVES, RAJALINGAM e CANAVEZ, 2008).

Os protocolos detalhados da amplificação dos fragmentos podem ser encontrados no ANEXO F.

A visualização dos fragmentos em forma de bandas foi realizada em gel de agarose 2% em presença do corante fluorescente GelRed™. As imagens dos géis foram capturadas pelo fotodocumentador DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro através do software GelCapture™ e analisadas posteriormente.

Para todas as análises foram incluídos controles positivos e negativos genotipados pela técnica de PCR-SSOP ou PCR-SSP cedidos pela Prof. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler, coordenadora do Laboratório de Genética Molecular Humana, do departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

Partindo do princípio de que os genes moldura (*KIR3DL3*, *KIR3DP1*, *KIR2DL4* e *KIR3DL2*) estão presentes em todos os indivíduos (CARRINGTON e NORMAN, 2003), eles não foram genotipados neste trabalho, embora se saiba da existência de haplótipos variantes para a presença desses genes (BASHIROVA et al., 2006).

**Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na genotipagem dos genes *KIR* pela técnica de PCR-SSP e tamanho do fragmento amplificado, em pares de bases (VILCHES *et al.*, 2007).**

Gene	Oligonucleotídeo iniciador direto (5'-3')	Oligonucleotídeo iniciador reverso (5'-3')	Tamanho do fragmento
<i>KIR2DL1</i>	3TTGGTCAGATGTCATGTTTGAA	3CTGCCAGGTCTTGCG	142
<i>KIR2DL2</i>	AAACCTTCTCTCTCAGCCCA	3CCCTGCAGAGAACCTACA	142
<i>KIR2DL3</i>	AGACCCTCAGGAGGTGA	3AGGAGACAACCTTGGATCA	156
<i>KIR2DL5</i>	ATCTATCCAGGGAGGGGAG	3ATAGGGTGAGTCATGGAG	147
<i>KIR3DL1*</i>	3CATYGGTCCCATGATGCT	3CACGATGTCCAGGGGA	108
	TCCATCGGTCCCATGATGTT		109
<i>KIR2DP1</i>	3GACACTTTGCACCTCAC	3GGAGCTGACAACCTGATG	141
<i>KIR2DS1*</i>	TCTCCATCAGTCGCATGAG	3GTCACTGGGAGCTGAC	96
	TCTCCATCAGTCGCATGAA		96
<i>KIR2DS2</i>	TGCACAGAGGGGAAGTA	3CCTGCAAGGTCTTGCA	110
<i>KIR2DS3</i>	AAACCTTCTCTCTCAGCCCA	3CATCTGTAGGTTCCCTCT	213
<i>KIR2DS4</i>	3GTTCAGGCAGGAGAGAAT	3TGGAATGTTCCGKKGATG	111
<i>KIR2DS5</i>	AGAGAGGGGACGTTTAACC	3TGATAGGGGGAGTGAGT	147
<i>KIR3DS1*</i>	3ATCGGTTCCATGATGCG	3CACGATGTCCAGGGGA	107
	3ATCAGTTCATGATGCG		107
<i>VDN</i>	3GCTGCACCTGAGGCTAA	3CCCCAAAAGAACTCGTATTC	335
<i>SALC</i>	TTACCCAGAGCCCTATCGTCT	3TCTGCCATCACCACCTATT	352

\*Para este gene foram desenhados dois oligonucleotídeos iniciadores diretos para amplificação de diferentes alelos.



## 4.7 Análise e tratamento dos dados

### 4.7.1 Homogeneidade da amostra

Os parâmetros idade, sexo e ancestralidade de casos e controles foram submetidos a um teste de homogeneidade, através do  $\chi^2$ .

### 4.7.2 Genótipos e análise de associação

A frequência de presença de cada gene foi calculada por contagem direta. Uma vez que a ausência de um gene *KIR* é recessiva, no procedimento de tipagem os heterozigotos e os homozigotos apresentam o mesmo resultado. As frequências gênicas foram estimadas através da extração da raiz quadrada da frequência genotípica observada dos indivíduos de genótipo nulo (fórmula de Bernstein), considerados como homozigotos recessivos, partindo-se do princípio que a amostra encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (GOURRAUD *et al.*, 2005; SINGLE *et al.*, 2008).

Com base em tabelas de contingência 2x2 foi verificada a associação de determinados genótipos com a suscetibilidade ao LES através do teste *odds ratio* (OR) ou razão de chances, adotando-se Intervalo de Confiança (IC) de 95% e considerando-se  $p = 0,05$  como o limite de significância. A OR foi calculada segundo a fórmula  $OR = (ad)/(bc)$  (WOOLF, 1955), sendo *a* e *b* as frequências absolutas de casos e controles que apresentam o fator de risco e *c* e *d*, as frequências de casos e controles que não apresentam o fator de risco.

A OR pode ser compreendida como a razão das probabilidades e é comumente utilizada em estudos epidemiológicos para descrever o dano provável que pode ser causado pela exposição a um fator de risco. Quando o valor da *odds ratio* é maior que 1 e o intervalo de confiança não inclui o número 1, pode-se dizer que esta característica é um fator de risco; quando o valor da *odds ratio* for menor que 1 e o intervalo de confiança não incluir o 1, este pode ser considerado fator de proteção. Para este teste foi utilizado o software EpiMax Table Calculator (HEALTH DECISION STRATEGIES, 2011).

Para os cálculos de associação, foram considerados fatores de risco ao desenvolvimento do LES, a presença de genes que

codificam receptores ativadores das células NK (aqueles denominados com S, que devem estimular a resposta imune) e a ausência de genes que codificam receptores inibidores (aqueles com L, que devem diminuir a resposta das células NK).

#### 4.7.3 Perfis genotípicos

Os perfis genotípicos foram tabulados e sua descrição prévia foi conferida no banco de dados *The Allele Frequency Net Database, Allele, haplotype and genotype frequencies in World Wide Populations* (GONZALEZ-GALARZA *et al.*, 2011). A partir da frequência de genótipos homozigotos para o haplogrupo A, inferiu-se a frequência dos haplogrupos A e B, utilizando-se a fórmula de Bernstein, citada anteriormente.

### 4.8 Comparação de técnicas

Os indivíduos que apresentaram perfil genotípico único nesta população, ou seja, aqueles em que apenas um indivíduo mostrou determinada combinação de genes, foram genotipados novamente pela técnica de PCR-SSP com um 1 ou 2 conjuntos diferentes de oligonucleotídeos iniciadores, apresentados na tabela 2 (MARTIN e CARRINGTON, 2008), com o propósito de comparação dos resultados obtidos. Quando utilizados 2 pares de iniciadores para um mesmo gene, eles amplificam regiões em éxons diferentes.

**Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na comparação das técnicas de genotipagem dos genes *KIR* através de PCR-SSP e tamanho do fragmento amplificado, em pares de bases (MARTIN e CARRINGTON, 2008). As letras A e B referem-se a diferentes pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar fragmentos diferentes do mesmo gene.**

Gene	Oligonucleotídeo iniciador direto (5'-3')	Oligonucleotídeo iniciador reverso (5'-3')	Tamanho do fragmento
<i>KIR2DL1</i>	5TTGGTCAGATGTCATGTTTGAA	3GTCCCTGCCAGGTCTTGCG	146
<i>KIR2DL2A</i>	5TGGCCACCCAGGTCG	3GACCGATGGAGAAGTTGGCT	173
<i>KIR2DL2B</i>	5AGGGGGAGGCCCATGAAT	3CGAGTTTGACCACTCGTAT	151
<i>KIR2DL3</i>	5TCCTTCATCGCTGGTGCTG	3GGCTCTGGTCCATTACAA	518
<i>KIR2DL5A</i>	5CGCTGTGGTGCCTCG	3ACCACTCAATGGGGGAGC	214
<i>KIR2DL5B</i>	3GCAGCTCCAGGAGCTCA	5GGTCTGACCACTCATAGGGT	191
<i>KIR3DL1A</i>	5GCTGTGGTGCCTCGA	3GTGTGAACCCCGACATG	191
<i>KIR3DL1B</i>	5CCTGGTCAAATCAGGAGAGAG	3GTAGGTCCTGCAAGGGCAA	186
<i>KIR2DP1A</i>	5TCTGCCTGGCCAGCT	3TGTGAACCCCGACATCTGTAC	205
<i>KIR2DP1B</i>	5CATCGGTCCCATGATGG	3ACTGGGAGCTGACAACCTGATG	89
<i>KIR2DS1*</i>	5TTCTCCATCAGTCGCATGAA	3AGAGGGTCACTGGGAGCTGAC	102
	5TTCTCCATCAGTCGCATGAG		96
<i>KIR2DS2A</i>	5TCTGCACAGAGAGGGGAAGTA	3GGTCACTGGGAGCTGACAA	175
<i>KIR2DS2B</i>	5GGGCCCCACGGTTT	3GTCACTCGAGTTTGACCACTCA	240
<i>KIR2DS3</i>	5TATGACATGTACCATCTATCCAC	3AAGCAGTGGGTCACTTGAC	190
<i>KIR2DS4A</i>	5TGCCCTCCCAGGTCA	3CTGTAGGTTCTGAAAGGACAG	204
<i>KIR2DS4B</i>	5TTCAGGCAGGAGAGAAT	3TTTGACCACTCGTAGGGGAC	198/219
<i>KIR2DS5</i>	5GATGGGGTCTCCAAGGG	3CCAGAGGGTCACTGGGC	126
<i>KIR3DS1</i>	5CTGGTCAAATCAGGAGAGAG	3TCCCTGCAAGGGCAC	180

\*Para este gene foram desenhados dois oligonucleotídeos iniciadores diretos para amplificação de diferentes alelos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterização da amostra

Todos os 394 indivíduos que compõem a amostra (167 casos e 227 controles) residem em Santa Catarina. Os fatores epidemiológicos considerados no teste de homogeneidade estão apresentados na tabela 3.

**Tabela 3: Distribuição de sexo, idade e ancestralidade em pacientes com LES (casos) e indivíduos saudáveis (controles) e o valor do  $\chi^2$  do teste de homogeneidade entre as duas populações amostradas.**

Fatores epidemiológicos	Casos	Controles	$\chi^2$	<i>p</i>
<b>exo</b>	<b>(n = 151)</b>	<b>(n = 216)</b>		
Feminino	97,35% (147)	94,91% (205)	1,354	0,224
Masculino	2,65% (4)	5,09% (11)		
<b>idade</b>	<b>(n = 151)</b>	<b>(n = 213)</b>		
Até 25	19,21% (29)	16,90% (36)	53,077	<0,001
26-35	20,53% (31)	8,45% (18)		
36-45	32,45% (49)	16,90% (36)		
46-55	21,85% (33)	21,60% (46)		
Mais de 55	5,96% (9)	36,15% (77)		
<b>ancestralidade</b>	<b>(n = 138)</b>	<b>(n = 203)</b>		
Europeia	76,81% (106)	87,68% (178)	5,624	0,060
Africana	18,84% (26)	10,84% (22)		
Ameríndia	4,35% (6)	1,48% (3)		

A variação do número de indivíduos (n) é devida a dados não informados.

## 5.2 Genótipos e análise de associação

Os resultados obtidos através da genotipagem dos genes *KIR* para os indivíduos amostrados podem ser vistos na tabela 4. O número de amostras (n) difere entre os genes devido à não amplificação de algumas amostras para eles.

Dos genes que codificam receptores inibidores, o mais presente nos casos foi *KIR2DL1*, com 98,18% e nos controles *KIR3DL1*, 96,40%. E os genes *KIR2DL2* (77,58%) e *KIR2DL5* (53,54%) os menos presentes no grupo de casos e controles, respectivamente

Dentre os genes de receptores ativadores, *KIR2DS4* é o mais presente tanto nos casos (87,19%) como nos controles (88,05%). E *KIR2DS3* o menos presente (39,26% e 31,98%, respectivamente).

Ainda na tabela 4, pode-se observar o resultado da análise de associação entre a presença ou ausência dos genes *KIR* ao LES. Dos 12 locos estudados, dois apresentaram OR maiores que 1 ( $p < 0,05$ ), sendo que um codifica um receptor inibidor das células NK (*KIR2DL2*) e outro um receptor ativador (*KIR2DS5*); quatro apresentaram OR menores que 1 ( $p < 0,05$ ): um gene que codifica um receptor inibidor (*KIR2DL5*), dois que codificam receptores ativadores (*KIR2DS1* e *KIR3DS1*) e um pseudogene (*KIR2DP1*).

As frequências de presença dos genes *KIR* observadas em diversas populações podem ser vistas na tabela 5. O grupo controle foi considerado representativo da população de Santa Catarina.

**Tabela 4: Genótipos identificados para presença ou ausência de 12 locos *KIR* e estimativa das frequências gênicas (*f*) para pacientes com LES (casos) e indivíduos saudáveis (controles) e cálculos de associação (*OR*) entre a presença ou ausência dos genes e o desenvolvimento do LES, seguidos de valores de IC 95% e *p*.**

Loco	Casos n (%)				Controles n (%)				OR	IC 95%	<i>p</i>
	n	presença	ausência	<i>f</i>	n	presença	ausência	<i>f</i>			
<i>KIR2DL1</i>	165	162 (98,18)	3 (1,82)	0,865	227	218 (96,03)	9 (3,97)	0,801	0,449	0,095 - 1,840	0,357
<i>KIR2DL2</i>	165	128 (77,58)	37 (22,42)	0,526	227	209 (92,07)	18 (7,93)	0,718	2,781	1,470 - 5,301	0,001
<i>KIR2DL3</i>	164	153 (93,29)	11 (6,71)	0,741	227	207 (91,19)	20 (8,81)	0,703	0,744	0,323 - 1,689	0,568
<i>KIR2DL5</i>	164	131 (79,88)	33 (20,12)	0,551	226	121 (53,54)	105 (46,46)	0,318	0,290	0,178 - 0,472	<0,001
<i>KIR3DL1</i>	164	158 (96,34)	6 (3,66)	0,809	222	214 (96,40)	8 (3,60)	0,810	1,016	0,306 - 3,302	1,000
<i>KIR2DP1</i>	165	160 (96,97)	5 (3,03)	0,826	226	207 (91,59)	19 (8,41)	0,710	0,340	0,109 - 0,993	0,048
<i>KIR2DS1</i>	163	83 (50,92)	80 (49,08)	0,299	226	159 (70,35)	67 (29,65)	0,455	0,437	0,281 - 0,679	<0,001
<i>KIR2DS2</i>	164	83 (50,61)	81 (49,39)	0,297	225	114 (50,67)	111 (49,33)	0,298	0,998	0,654 - 1,523	1,000
<i>KIR2DS3</i>	163	64 (39,26)	99 (60,74)	0,221	222	71 (31,98)	151 (68,02)	0,175	1,375	0,882 - 2,144	0,170
<i>KIR2DS4</i>	164	143 (87,19)	21 (12,81)	0,642	226	199 (88,05)	27 (11,95)	0,654	0,924	0,482 - 1,775	0,922
<i>KIR2DS5</i>	167	113 (67,66)	54 (32,34)	0,431	223	73 (32,73)	150 (67,27)	0,180	4,300	2,741 - 6,758	<0,001
<i>KIR3DS1</i>	165	92 (55,76)	73 (44,24)	0,335	227	157 (69,16)	70 (30,84)	0,445	0,562	0,362 - 0,871	0,009

n: número amostral; %: número relativo; *f*: frequência gênica; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade; PG: pseudogene

**Tabela 5: Distribuição da presença dos genes *KIR* entre diferentes populações.**

População	n	2DL1	2DL2	2DL3	2DL5	3DL1	2DP1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1	Ref.
<b>AMÉRICAS</b>														
Brasil														
Santa Catarina	228 <sup>a</sup>	0,960	0,921	0,912	0,535	0,964	0,916	0,703	0,507	0,320	0,880	0,327	0,692	1
Curitiba (PR)	153	0,973	0,575	0,818	0,497	0,918	0,947	0,409	0,586	0,316	0,951	0,329	0,363	2
Paraná	289	0,972	0,471	0,893	0,526	0,941	0,969	0,408	0,471	0,226	0,938	0,346	0,391	3
Porto Alegre (RS)	115	0,974	0,652	0,852	0,522	0,957	0,974	0,383	0,591	0,339	0,957	0,287	0,417	4
Sudeste	55	1,000	0,491	0,854	0,364	0,873		0,454	0,473	0,291	0,382	0,327	0,364	5
Belo Horizonte (MG)	90	0,967	0,522	0,944	0,589	0,967		0,378	0,533	0,389	0,956	0,322	0,400	6
Rio de Janeiro	166	0,970	0,560	0,873	0,614	0,964		0,416	0,566	0,313	0,952	0,404	0,386	6
Belém (PA)	347	0,963	0,750	0,902	0,700	0,930	0,970	0,430	0,424	0,331	0,873	0,542	0,560	7
Amazônia - ameríndios	40	0,930	0,650	0,800	0,850	0,650		0,880	0,580	0,100	0,780	0,900	0,700	8
Argentina														
Euro-descendentes	402	0,960	0,560	0,870	0,560	0,950	0,960	0,460	0,550	0,290	0,950	0,360	0,420	9
Ameríndios Wichí	101	0,840	0,620	0,840	0,530	0,890	0,840	0,460	0,610	0,030	0,890	0,520	0,540	9
Ameríndios Chiriguano	54	0,910	0,440	0,870	0,590	0,870	0,910	0,570	0,410	0,060	0,870	0,560	0,570	9





População	n	2DL1	2DL2	2DL3	2DL5	3DL1	2DP1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1	Ref.
Gabão	54	1,000	0,648	0,796	0,722	1,000	1,000	0,185	0,574	0,352	1,000	0,333	0,074	22
Gana	41	0,927	0,537	0,854	0,561	1,000		0,049	0,561	0,341	0,976	0,220	0,049	6
Senegal	90	1,000	0,555	0,900	0,520	0,990	1,000	0,130	0,420	0,240		0,300	0,040	22
Ásia														
China	123	0,992	0,480	1,000	0,553	1,000		0,496	0,317	0,211	1,000	0,366	0,431	23
Índia	224	0,959	0,496	0,835	0,678	0,852	0,848	0,393	0,353	0,295	0,727	0,545	0,518	24
Taiwan	96	0,656	0,521	0,823		0,938		0,458	0,448	0,250	0,594		0,344	25

Ref. = referências:

1: presente estudo; 2: AUGUSTO, 2009; 3: FRANCESCHI *et al.*, 2008; 4: SALIM *et al.*, 2010; 5: MORGUN *et al.*, 2004; 6: HOLLENBACH *et al.*, 2010; 7: PEDROZA *et al.*, 2011; 8: EWERTON *et al.*, 2007; 9: FLORES *et al.*, 2007; 10: CONESA *et al.*, 2010; 11: MARTIN *et al.*, 2002; 12: DU *et al.*, 2007; 13: GUTIERREZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2006; 14: FIALHO *et al.*, 2009; 15: LISTI *et al.*, 2010; 16: ORDOÑEZ *et al.*, 2009<sup>b</sup>; 17: MOMOT *et al.*, 2004; 18: DEMANET e VERHEYDEN, 2004; 19: van der SLIK *et al.*, 2003; 20: SHASTRY *et al.*, 2008; 21: MAJORCZYK *et al.*, 2007<sup>b</sup>; 22: WAUQUIER *et al.*, 2010; 23: HOU *et al.*, 2010; 24: FARIDI *et al.*, 2009<sup>b</sup>; 25: YEN *et al.*, 2006

n = número amostral

<sup>a</sup>o número amostral difere entre os genes, variando de 222 a 227.

<sup>b</sup>genotipados com os mesmos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho.

Células em branco indicam que o gene não foi tipado no trabalho citado.

### 5.3 Perfis genotípicos

Os perfis genotípicos obtidos das amostras de casos e controles podem ser observados na tabela 6. Foram encontrados 58 perfis diferentes no grupo dos casos e 71 no grupo dos controles, sendo que 27 destes são compartilhados entre os grupos. Dentre os perfis listados, 30 (29,41%) constituem-se perfis inéditos, diferentes dos descritos no banco de dados *Allele Frequencies* (GONZALEZ-GALARZA *et al.* 2011).

**Tabela 6: Frequência dos perfis genotípicos encontrados nas amostras de pacientes com LES (casos) e indivíduos saudáveis (controles) e número de identificação dos genótipos segundo Gonzalez-Galarza *et al.* (2011)<sup>a</sup>. Retângulos pretos indicam presença do gene e retângulos brancos indicam ausência do gene.**

perfil	KIR2DS2	KIR2DL2	KIR2DL3	KIR2DL5	KIR2DS3	KIR2DS5	KIR2DP1	KIR2DL1	KIR3DS1	KIR3DL1	KIR2DS1	KIR2DS4	Casos (n = 160)	Controles (n = 214)	ID <sup>a</sup>
1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0,00% (16)	3,07% (13)	6
2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	7,50% (12)	7,94% (17)	18
3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	6,87% (11)	1,40% (3)	2
4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	6,87% (11)	0	25
5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	3,75% (6)	3,54% (14)	19
6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	3,75% (6)	0	20
7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	3,12% (5)	3,14% (11)	3
8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	3,12% (5)	2,34% (5)	5
9 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	2,50% (4)	0,93% (2)	1
10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	2,50% (4)	0,47% (1)	-
11	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	2,50% (4)	0,47% (1)	382
12	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	2,50% (4)	0	31
13	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1,87% (3)	0,93% (2)	80
14	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1,87% (3)	0,47% (1)	-
15	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1,87% (3)	0	193
16	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1,87% (3)	0	38
17	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1,87% (3)	0	44

perfil	KIR2DS2	KIR2DL2	KIR2DL3	KIR2DL5	KIR2DS3	KIR2DS5	KIR2DP1	KIR2DL1	KIR3DS1	KIR3DL1	KIR2DS1	KIR2DS4	Casos (n = 160)	Controles (n = 214)	ID <sup>a</sup>
18													1,25% (2)	3,61% (12)	7
19													1,25% (2)	3,74% (8)	4
20													1,25% (2)	1,87% (4)	73
21													1,25% (2)	0,47% (1)	176
22													1,25% (2)	0,47% (1)	21
23													1,25% (2)	0	200
24													1,25% (2)	0	33
25													1,25% (2)	0	-
26													1,25% (2)	0	69
27													1,25% (2)	0	79
28													1,25% (2)	0	-
29													1,25% (2)	0	-
30													1,25% (2)	0	112
31													1,25% (2)	0	22
32													1,25% (2)	0	93
33													0,62% (1)	3,54% (14)	-
34													0,62% (1)	1,67% (10)	336
35													0,62% (1)	1,87% (4)	13
36													0,62% (1)	1,40% (3)	70
37													0,62% (1)	0,93% (2)	-
38													0,62% (1)	0,93% (2)	-
39													0,62% (1)	0,47% (1)	76
40													0,62% (1)	0,47% (1)	68
41													0,62% (1)	0,47% (1)	64
42													0,62% (1)	0,47% (1)	58
43													0,62% (1)	0,47% (1)	9
44 <sup>b</sup>													0,62% (1)	0	195
45													0,62% (1)	0	-

perfil	KIR2DS2	KIR2DL2	KIR2DL3	KIR2DL5	KIR2DS3	KIR2DS5	KIR2DP1	KIR2DL1	KIR3DS1	KIR3DL1	KIR2DS1	KIR2DS4	Casos (n = 160)	Controles (n = 214)	ID <sup>a</sup>
46													0,62% (1)	0	-
47													0,62% (1)	0	27
48													0,62% (1)	0	8
49													0,62% (1)	0	-
50													0,62% (1)	0	51
51													0,62% (1)	0	12
52													0,62% (1)	0	104
53													0,62% (1)	0	190
54													0,62% (1)	0	81
55													0,62% (1)	0	268
56													0,62% (1)	0	-
57													0,62% (1)	0	-
58													0,62% (1)	0	-
59													0	8,4% (18)	-
60													0	2,80% (6)	188
61													0	2,34% (5)	328
62													0	1,87% (4)	90
63													0	0,93% (2)	16
64													0	0,93% (2)	94
65													0	0,93% (2)	-
66													0	0,93% (2)	192
67													0	0,93% (2)	11
68													0	0,47% (1)	-
69													0	0,47% (1)	74
70													0	0,47% (1)	423
71													0	0,47% (1)	204
72													0	0,47% (1)	-
73													0	0,47% (1)	-

perfil	KIR2DS2	KIR2DL2	KIR2DL3	KIR2DL5	KIR2DS3	KIR2DS5	KIR2DP1	KIR2DL1	KIR3DS1	KIR3DL1	KIR2DS1	KIR2DS4	Casos (n = 160)	Controles (n = 214)	ID <sup>a</sup>
74													0	0,47% (1)	-
75													0	0,47% (1)	14
76													0	0,47% (1)	43
77													0	0,47% (1)	207
78													0	0,47% (1)	-
79													0	0,47% (1)	15
80													0	0,47% (1)	57
81													0	0,47% (1)	56
82													0	0,47% (1)	-
83													0	0,47% (1)	71
84													0	0,47% (1)	-
85													0	0,47% (1)	-
86													0	0,47% (1)	-
87													0	0,47% (1)	233
88													0	0,47% (1)	167
89													0	0,47% (1)	159
90													0	0,47% (1)	-
91													0	0,47% (1)	242
92													0	0,47% (1)	-
93													0	0,47% (1)	-
94													0	0,47% (1)	383
95													0	0,47% (1)	337
96													0	0,47% (1)	61
97													0	0,47% (1)	-
98													0	0,47% (1)	-
99													0	0,47% (1)	339
100													0	0,47% (1)	29
101													0	0,47% (1)	381

perfil	KIR2DS2	KIR2DL2	KIR2DL3	KIR2DL5	KIR2DS3	KIR2DS5	KIR2DP1	KIR2DL1	KIR3DS1	KIR3DL1	KIR2DS1	KIR2DS4	Casos (n = 160)	Controles (n = 214)	ID <sup>a</sup>
.02													0	0,47% (1)	184

<sup>a</sup> ID = número de identificação do genótipo segundo Gonzalez-Galarza *et al.* (2011), através do *site* allelefrequencies.com

<sup>b</sup> Genótipos correspondentes ao haplogrupo A em homozigose

A frequência de indivíduos homozigotos para o haplogrupo A nos casos é de 3,2% (quatro indivíduos com perfil 9 e um indivíduo com perfil 44) e de 0,9% (dois indivíduos com o perfil 9) nos controles. Com base nisso, foi possível inferir a frequência dos haplogrupos A e B na população, como exposto na tabela 7.

**Tabela 7: Frequência inferida dos haplogrupos A e B em pacientes com LES (casos) e indivíduos saudáveis (controles).**

haplogrupo	Casos (160)	Controles (214)
A	0,176	0,095
B	0,824	0,905

## 5.4 Comparação de técnicas

Setenta e três indivíduos foram genotipados com o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores sugerido por Martin e Carrington (2008) (tabela 8). Os resultados apresentaram discordância tanto quando comparados entre os dois pares de iniciadores propostos para o mesmo gene pelo trabalho citado, como também em relação aos iniciadores adotados no presente estudo (até 28,80% no gene *KIR2DL2*, por exemplo). O único gene que obteve concordância de 100% ao comparar os resultados foi *KIR2DL1*.



Gene	2DL1		2DL2		2DL3		2DL5		2DP1		2DS1		2DS2		2DS3		2DS4		2DS5		3DL1		3DS1	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
UP 053	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
UP 058	+		-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
UP 067	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
UP 070	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
UP 075	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
UP 083	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
UP 086	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
UP 088	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
UP 089	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
UP 099	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
UP 108	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
UP 117	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
UP 118	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
UP 124	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
UP 126	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
UP 129	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+



Gene	2DL1	2DL2		2DL3	2DL5		2DP1		2DS1	2DS2		2DS3		2DS4		2DS5	3DL1		3DS1	
		A	B		A	B	A	B		A	B	A	B	A	B		A	B		
UP 145	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
UP 148	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
UP 150	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
UP 155	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
UP 182	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
UP 188	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
ONT 004	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ONT 008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
ONT 014	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
ONT 019	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
ONT 020	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
ONT 023	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
ONT 027	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
ONT 037	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ONT 044	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
ONT 046	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Gene	2DL1		2DL2		2DL3		2DL5		2DP1		2DS1		2DS2		2DS3		2DS4		2DS5		3DL1		3DS1	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
ONT 052	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
ONT 053	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
ONT 056	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
ONT 059	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ONT 065	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
ONT 071	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ONT 072	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ONT 080	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ONT 089	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ONT 090	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ONT 091	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONT 094	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ONT 097	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ONT 123	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONT 148	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
ONT 149	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+

Gene	2DL1		2DL2		2DL3		2DL5		2DP1		2DS1		2DS2		2DS3		2DS4		2DS5		3DL1		3DS1	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
ONT 164	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
ONT 170	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONT 178	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
ONT 185	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
ONT 186	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
ONT 203	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
ONT 204	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
ONT 206	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
ONT 208	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
ONT 210	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
ONT 212	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONT 215	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
ONT 238	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONT 244	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
MAC 16	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+): presença do gene; (-): ausência do gene

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Caracterização da amostra

Ambas as amostras são compostas predominantemente por mulheres (tabela 3). O predomínio de mulheres no grupo de pacientes corrobora a diferença de gênero existente entre os indivíduos afetados pelo LES. A diferença de gênero também aparece no grupo controle para evitar o viés em relação aos dados que diferem entre os sexos (não analisados neste trabalho).

Apesar da literatura descrever uma proporção de cerca de 10 mulheres para cada homem, na média global (OLIVER e SILMAN, 2009; DIEUDE, 2009; PETRI *et al.*, 2010; SHAPIRA, AGMON-LEVIN e SHOENFELD, 2010) na população estudada essa proporção é quase quatro vezes mais elevada, 36:1. Um estudo com pacientes brasileiros de Natal (RN) mostrou a proporção de 7,6:1 (VILAR e SATO, 2002), porém apresenta um pequeno número amostral ( $n = 43$ ), que pode representar um viés no resultado obtido, uma vez que o erro é inversamente proporcional ao número amostral. Outro estudo brasileiro, com a população de Belém (PA) apresentou proporção de 21:1 (PEDROZA *et al.*, 2011). Informações sobre as populações relacionadas à população brasileira são escassas, mas um estudo realizado na Espanha condiz com a média global citada anteriormente (LOPEZ *et al.*, 2003). Por apresentar esse resultado discrepante não se pode extrapolar o resultado de nenhum dos trabalhos para o restante da população brasileira, sendo indicada a realização de mais estudos desse tipo em outras populações, de outras regiões do país, pois as diferenças podem ser devidas à estrutura populacional distinta das regiões brasileiras que apresentam padrões de miscigenação diversos (MARRERO *et al.*, 2007), podendo ser um interferente nos dados epidemiológicos.

Em relação à idade, os casos encontram-se na faixa etária esperada para a manifestação da doença, que se dá predominantemente durante o período reprodutivo (20 a 45 anos) (RAHMAN e ISENBERG, 2008; OLIVER e SILMAN, 2009; GONZÁLEZ *et al.*, 2010), e os controles são mais velhos ( $\chi^2$

53,077,  $p < 0,001$ ), com o predomínio de mulheres com mais de 55 anos. A explicação para isso é o fato de que essas amostras foram obtidas em um grupo de voluntários do Hospital Florianópolis e no Núcleo de Estudos da Terceira Idade da UFSC. Apesar disso, esse não foi considerado um viés para este estudo, visto que indivíduos mais velhos diminuem a chance de que haja no grupo controle pessoas que ainda poderão desenvolver LES, uma vez que passaram da idade de manifestação da doença, garantindo assim a ideia de o grupo controle é composto de pessoas não afetadas pela doença.

Quanto à ancestralidade, nos dois grupos predominam euro-descendentes (76,81% em casos e 87,68% em controles), informação que se assemelha à proporção descrita para o estado de Santa Catarina (87%) (INSTITUTO NACIONAL DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2009). Também foram registrados indivíduos afro e ameríndio-descendentes na amostra (18,84% e 4,35% nos casos e 10,84 e 1,48% nos controles, respectivamente), enquanto o censo do IBGE encontra valores de 12,7 e 0,3% para o Estado. Sendo assim, há uma variação entre as proporções, que poderia ser explicada pela diferente metodologia utilizada, sendo no presente estudo a observação das características fenotípicas pelo entrevistador e para o censo do IBGE a autodeclaração. É interessante destacar registros anteriores da literatura que mostram maior incidência de LES em afro-americanos e em afro-caribenhos quando comparados com euro-descendentes (OLIVER e SILMAN, 2009), embora essa diferença não tenha sido significativa neste estudo.

## 6.2 Genótipos e análise de associação

Quatro locos com associação de proteção ao LES foram encontrados (tabela 4): *KIR2DS1* (OR 0,437,  $p < 0,001$ ), *KIR3DS1* (OR 0,562,  $p = 0,009$ ), *KIR2DP1* (OR 0,340,  $p = 0,048$ ) e *KIR2DL5* (OR 0,290,  $p < 0,001$ ).

Uma tabela com uma compilação de dados de estudos prévios utilizados nesta discussão está disponível no ANEXO G.

O gene *KIR2DS1* havia sido previamente associado ao lúpus em uma relação de predisposição à doença na população chinesa (OR 4,540,  $p < 0,001$ ) (HOU *et al.*, 2010), resultado contrário ao encontrado no presente estudo, onde este gene

apresentou associação de proteção à doença. Na população canadense, se concomitantemente o indivíduo apresentasse o gene *KIR2DS2*, também foi encontrada associação de suscetibilidade ao LES (19% em casos e 14% em controles) (PELLET *et al.*, 2007). No presente estudo, o gene *KIR2DS2* não apresentou qualquer associação ao lúpus (OR 0,998,  $p = 1,000$ ).

Além disso, o gene *KIR2DS1* foi amplamente estudado e associado a predisposição a outras doenças autoimunes, como psoríase (LUSZCZEK *et al.*, 2004; SUZUKI, *et al.*, 2004; HOLM *et al.*, 2005) e artrite psoriática (MARTIN *et al.*, 2002).

A relação de proteção ao LES apresentada pelo gene *KIR2DS1* neste estudo pode refletir uma peculiaridade da população quanto a frequência gênica, ou desequilíbrio de ligação (DL) com outro gene, como será discutido posteriormente. Soma-se a isso o fato de que, em comparação com os KIR inibidores, a função e os ligantes dos KIR ativadores permanecem pouco compreendidos (PARHAM *et al.*, 2010).

Até o presente estudo, o gene *KIR2DL5* ainda não havia sido associado ao lúpus, embora tenha sido associado à psoríase em um estudo na população japonesa (48% em casos e 30% em controles,  $p < 0,05$ ) (SUZUKI *et al.*, 2004) e outro na população chinesa apresentou associação de suscetibilidade à espondilite anquilosante (60% em casos e 43% em controles,  $p = 0,009$ ) (JIAO *et al.*, 2010).

Os genes *KIR3DS1* e *KIR2DP1* ainda não haviam sido citados em associação com doenças autoimunes.

No presente estudo também foram encontrados dois genes com associação de suscetibilidade ao desenvolvimento de LES, *KIR2DL2* (OR 2,781,  $p = 0,001$ ) e *KIR2DS5* (OR 4,300,  $p < 0,001$ ).

A associação de suscetibilidade ao LES do gene *KIR2DL2* também foi descrita na população chinesa (OR 6,68,  $p < 0,001$ ) (HOU *et al.*, 2010). Em relação a outras doenças autoimunes, esse gene apresentou associação de proteção à esclerose sistêmica em uma população brasileira (OR 0,22,  $p < 0,0001$ ) (SALIM *et al.*, 2010) e, em um estudo com a população alemã, a ausência deste gene, desde que na presença do gene *KIR2DS2* foi associada à esclerodermia (12% em casos e 2% em controles,  $p = 0,005$ ) (MOMOT *et al.*, 2004).

O gene *KIR2DS5* ainda não havia sido associado ao LES nem a outras doenças autoimunes.

Na literatura, existem outros genes e grupos de genes que foram associados a doenças autoimunes, como artrite reumatoide e os genes *KIR2DS2*, *KIR2DS4* e *KIR2DL1* (YEN *et al.*, 2001; YEN *et al.*, 2006). A combinação *KIR2DL1/HLA-C2* presente e *KIR2DL2/HLA-DR3* ausente mostra proteção contra diabetes tipo 1, enquanto *KIR2DL2/HLA-DR3/HLA-DR4* representa risco na ausência de *KIR2DL1/HLA-C2* (JOBIM *et al.*, 2010). Diabetes tipo 1 também foi associado com *KIR2DS2* (van der SLIK *et al.*, 2003). Esse tipo de associação é compatível com doenças multifatoriais, que dependem de uma combinação de eventos para se manifestar. Dos genes citados, apenas *KIR2DL2* teve associação ao LES no presente estudo.

Interessantemente, foi observada associação entre um gene que codifica receptor inibidor (*KIR2DL2*) e o risco aumentado de desenvolver LES, e entre dois genes que codificam receptores ativadores (*KIR2DS1* e *KIR3DS1*) e o risco diminuído de desenvolver a doença. Essas observações vão de encontro à ideia de que a presença de genes que codificam receptores inibidores teria um papel de diminuir a atividade do sistema imune, desta forma protegendo de uma doença autoimune e que os ativadores predisporiam à doença. Outra observação intrigante é a associação de um pseudogene (*KIR2DP1*) a uma doença, uma vez que pseudogenes não expressam produtos proteicos.

Uma hipótese para explicar essas observações contraditórias diz respeito ao alto desequilíbrio de ligação da família de genes *KIR* (KULKARNI, MARTIN e CARRINGTON, 2010), podendo este resultado ser reflexo do DL dos genes *KIR* com um loco associado à doença. Neste caso, os genes dos receptores inibidores e o pseudogene podem estar em DL com os genes dos ativadores ou ainda com outros genes que não da família *KIR*, que então estariam predispondo à resposta imune exacerbada. Contudo, deve-se levar em conta que a família gênica analisada neste trabalho ainda é, em muitos aspectos, uma incógnita para os pesquisadores, podendo, desta forma, revelar características até então desconhecidas e que não se encaixam no modelo pré-estabelecido.

Além disso, ainda é preciso verificar o papel dos pseudogenes, pois apesar de não serem expressos na forma de receptor e não codificarem proteína, podem apresentar algum papel regulatório como, por exemplo, transcrever RNAs

reguladores de outros genes. Porém, ainda não há na literatura nenhum relato de papel regulatório do pseudogene *KIR2DP1*.

Outro ponto a ser discutido é a estratificação populacional, pois em estudos epidemiológicos em populações miscigenadas como as brasileiras ou latino-americanas, a origem étnica dos participantes é uma variável importante, por potencialmente causar confusão nas análises estatísticas realizadas para identificar variantes genéticas responsáveis por fenótipos complexos. Nestes estudos, o *background* étnico dos participantes deve ser geneticamente homogêneo para evitar associações estatísticas espúrias (TARAZONA-SANTOS *et al.* 2007). Neste contexto, como perspectiva para pesquisas futuras, são necessários estudos adicionais que avaliem as implicações da estrutura genética sobre a associação de genes a determinadas doenças, como LES, em populações miscigenadas. Avaliação esta que pode ser feita com o uso de marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) (ROSENBERG *et al.*, 2010), que apresentam alto diferencial de frequência entre as populações ancestrais, tornando as análises de mistura étnica mais rápidas e precisas.

As frequências de presença dos genes *KIR* observadas em diversas populações estão apresentadas na tabela 5. Na população analisada no presente trabalho o gene *KIR3DL1* é o mais presente (0,964), seguido por *KIR2DL1* (0,960), enquanto nas demais populações brasileiras este último é o mais presente (0,930 a 1,000), exceto na população de Belém (PA), onde *KIR2DP1* aparece com frequência de 0,970 (PEDROZA *et al.*, 2011).

O gene menos presente na população estudada é *KIR2DS3* (0,320), assim como em 7 das 8 populações brasileiras comparadas (0,100 a 0,389), sendo diferente apenas em Belo Horizonte (MG), onde o menos frequente é o *KIR2DS5* (0,322) (HOLLENBACH *et al.*, 2010).

*KIR2DL2* aparece com frequência de 0,921 em Santa Catarina, porém nas outras populações a frequência mais alta encontrada foi 0,750 em Belém (PEDROZA *et al.*, 2011).

Os genes *KIR2DS1* e *KIR3DS1* chamam a atenção por serem dois dos menos frequentes em todas as populações listadas na tabela 5, exceto na população de Santa Catarina (0,703 e 0,692, respectivamente) e em uma população de ameríndios da Amazônia brasileira, onde eles aparecem com



frequência de 0,880 e 0,700 (EWERTON *et al.*, 2007). Nesta população ameríndia também se destaca a frequência dos genes *KIR2DL5* (0,850) e *KIR2DS5* (0,900) (EWERTON *et al.*, 2007), porque se apresentam mais elevadas do que em outras populações.

*KIR2DS4* apresenta frequências acima de 0,870 em todas as populações comparadas, com exceção de duas: a população do sudeste brasileiro (0,382) (MORGUN *et al.*, 2004) e a holandesa (0,420) (van der SLIK *et al.*, 2003).

Os demais genes apresentam frequências semelhantes entre as populações.

É preciso ressaltar que a adoção de diferentes metodologias de identificação dos genes dificulta a comparação entre dados. Assim, comparações mais refinadas entre populações, seguidas de testes estatísticos, só serão possíveis quando houver uma padronização da tipagem destes genes, pois a falta de padronização gera dados de difícil comparação devido ao tipo de polimorfismo encontrado nos genes *KIR*, de presença e ausência dos genes, as quais podem ou não ser verificadas dependendo da metodologia escolhida.

### 6.3 Perfis genotípicos

Neste trabalho foi observada a ocorrência de 102 perfis diferentes (tabela 6), sendo que 27 (26,47%) são compartilhados entre casos e controles, 30 (29,41%) deles são inéditos, 31 (30,39%) são exclusivos de casos e 44 (43,14%) exclusivos de controles. O perfil mais frequente em casos foi o de número 1, com a presença de todos os locos pesquisados (*KIR2DS2/KIR2DL3/KIR2DL5/KIR2DS3/KIR2DS5/KIR2DP1/KIR2DL1/KIR3DS1/KIR3DL1/KIR2DS1/KIR2DS4*) e o mais frequente em controles foi o de número 59, que apresenta os seguintes genes:

*KIR2DL2/KIR2DL3/KIR2DP1/KIR2DL1/KIR3DS1/KIR3DL1/KIR2DS1/KIR2DS4*, ambos pertencentes ao haplogrupo B.

É esperado, na população estudada, que haja grande diversidade em relação aos perfis gênicos, uma vez que a população brasileira é triétnica, resultado da miscigenação entre três componentes étnicos principais (europeu, africano e ameríndio), além da ocorrência de altas taxas de recombinação, ou seja, da plasticidade física dos locos *KIR*, bem como dos seus

polimorfismos. Esses fatores aumentam a possibilidade da formação de híbridos inéditos (VILCHES e PARHAM, 2002) resultando na presença de mais haplogrupos “inibidores” (A) em uma população do que em outras e o mesmo ocorrendo com os haplogrupos “ativadores” (B) (BASHIROVA *et al.*, 2006).

A metodologia escolhida para o trabalho não permitiu a determinação dos haplótipos existentes na população, pois não diferencia homocigotos de heterocigotos. Além de que, em genes *KIR* existe a possibilidade de hemizigotos, em que um loco pode estar presente em apenas um dos cromossomos.

O mais próximo que se pode chegar dos haplótipos são inferências baseadas em haplótipos previamente descritos em outras populações e aceitações teóricas, como por exemplo aceitar a presença absoluta dos genes moldura e a relação entre alguns locos, como *KIR2DL2/KIR2DL3* e *KIR3DL1/KIR3DS1*, que não aparecem juntos no mesmo haplótipo. A disponibilidade de dados familiares, no entanto, ajudaria a resolver este impasse, uma vez que proporcionaria a análise de segregação dos genes através das gerações, permitindo avaliar quais genes estariam ligados (SINGLE *et al.*, 2008).

Um estudo familiar está sendo feito, pelo grupo de pesquisa do LAPOGE (UFSC), com uma população isolada de Santa Catarina, o que facilitará análises futuras de alguns haplótipos encontrados nesta população.

A frequência inferida do haplogrupo A no presente estudo (9,5%) (tabela 7) mostrou que a população catarinense tem uma frequência mais baixa do que as encontradas em outras populações brasileiras, como no Rio Grande do Sul, 49,10% (JOBIM e JOBIM, 2008), 49,40% em uma amostra de Curitiba (PR) (AUGUSTO, 2010), 29,40% em Belém (PA) (PEDROZA *et al.*, 2011) e 39,74% numa população ameríndia da Amazônia (EWERTON *et al.*, 2007). Em outros países, a frequência do haplogrupo A foi de 50,60% nos EUA (HSU *et al.*, 2002), 58,70% na China (JIANG *et al.*, 2005) e aproximadamente 75% em japoneses e coreanos (revisado por BASHIROVA *et al.*, 2006). A frequência mais baixa foi encontrada em aborígenes australianos (13%) (revisado por BASHIROVA *et al.*, 2006), porém ainda mais alta que no presente estudo.

Como se pode observar, as frequências dos haplogrupos A e B geralmente ficam próximas a 50% na maioria das populações analisadas, (SINGLE *et al.*, 2008; VILCHES e PARHAM, 2002).

As diferenças existentes, inclusive em relação ao presente estudo, podem ser devidas a uma variação populacional, ou a diferenças entre as metodologias empregadas nos diferentes trabalhos. Aqui foram utilizados para comparação trabalhos que usam diferentes oligonucleotídeos iniciadores, uma vez que não há uma padronização da tipagem dos genes *KIR* e poucos trabalhos publicados empregam os mesmos iniciadores utilizados neste estudo.

#### 6.4 Comparação de técnicas

Para o presente estudo, foi adotada a metodologia descrita por Vilches *et al.*, (2007) que propõe uma facilitação do método de PCR-SSP para a genotipagem dos genes *KIR*.

Posteriormente, foi publicado um trabalho que utiliza dois pares de oligonucleotídeos iniciadores, que pareiam em regiões diferentes do gene, para a genotipagem dos *KIR* (MARTIN e CARRINGTON, 2008).

Levando em consideração as duas metodologias descritas, foi feita uma comparação das técnicas com 73 indivíduos da amostra. Os indivíduos escolhidos para a nova genotipagem foram aqueles que apresentaram perfil único, uma vez que esses poderiam gerar dúvidas devido a raridade do resultado. Ressalta-se que dos 73 perfis únicos, 30 deles ainda não foram descritos em trabalhos anteriores (GONZALEZ-GALARZA *et al.*, 2011).

Ao utilizar os oligonucleotídeos iniciadores propostos por Martin e Carrington (2008), quando existissem dois conjuntos de iniciadores para o mesmo gene, ambos deveriam amplificar no caso de um indivíduo apresentar este gene, o que não foi confirmado em todos os experimentos. Além disso, alguns resultados foram discordantes daqueles obtidos com os iniciadores sugeridos por Vilches e colaboradores (2007) e adotados neste trabalho (tabela 8).

Uma possível explicação pode ser atribuída à deleção parcial do gene nesses indivíduos, o que daria resposta positiva para um iniciador e negativa para outro. Outra possibilidade é de que os iniciadores não cumpram um pré-requisito para esta técnica: ser altamente eficientes, podendo não parear perfeitamente com a região-alvo ou parear em regiões aleatórias, uma vez que os genes *KIR* tem grande similaridade de sequência entre si. Junta-se a isso o fato de possuírem polimorfismos ainda

desconhecidos, o que dificulta a construção de iniciadores (BASHIROVA *et al.*, 2006).

Tal complexidade genética dos *KIR* aumenta o risco de falso-positivos e má-interpretação dos resultados, particularmente em estudos com populações pequenas, ressaltando a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos mais eficazes e melhor caracterização das populações controle (GOURRAUD, 2010). É preciso cautela ao analisar e comparar resultados, que apenas são comparáveis se realizados com os mesmos conjuntos de iniciadores.

## 7. CONCLUSÕES

Após a análise dos genes *KIR* de pacientes e controles do estado de Santa Catarina, pode-se concluir que:

A técnica de PCR-SSP foi otimizada no LAPOGE para a genotipagem individual dos 12 genes *KIR* trabalhados neste estudo, podendo agora ser reproduzida nos trabalhos futuros.

A amostra é composta predominantemente por mulheres euro-descendentes e uma menor porcentagem de afro e ameríndio-descendentes. É importante levar em consideração que a estratificação populacional dos participantes é uma variável importante e deve ser considerada em estudos de associação caso-controle pois está relacionada ao risco de associações espúrias.

A diferença de gênero existente no grupo de casos reafirma o padrão de incidência da doença, majoritariamente no sexo feminino. A proporção de mulheres para cada homem afetado na amostra é 3,6 vezes mais alta do que a média global, a mais alta encontrada quando comparada com dados disponíveis na literatura. Como perspectiva futura, indica-se a realização de estudos semelhantes em outras populações brasileiras. No grupo controle, esta diferença é proporcional à do grupo de casos, evitando um viés hormonal que se apresentaria caso houvesse igualdade de gênero na amostra.

A idade dos casos condiz com a idade de manifestação da doença, entre os 20 e 45 anos. Os controles apresentam-se em uma faixa etária mais elevada. Esta diferença não representa um viés para as análises uma vez que indivíduos mais velhos diminuem a chance de que haja no grupo controle pessoas que ainda poderão desenvolver LES.

A frequência de presença de cada gene foi calculada e a frequência gênica foi estimada a partir das frequências de ausência dos genes, que representam um genótipo homocigoto. Em geral, nos dois grupos os genes que codificam receptores inibidores apresentam-se com frequência mais alta do que os genes que codificam receptores ativadores.

Através da análise de associação caso-controle foram encontrados quatro locos com associação de proteção ao LES

(*KIR2DS1*, *KIR3DS1*, *KIR2DP1* e *KIR2DL5*) e dois locos que conferem suscetibilidade à doença (*KIR2DL2* e *KIR2DS5*).

Foi observada associação entre um gene que codifica receptor inibidor (*KIR2DL2*) e o risco aumentado de desenvolver LES, e entre dois genes que codificam receptores ativadores (*KIR2DS1* e *KIR3DS1*) e o risco diminuído de desenvolver a doença, que vai contra a hipótese original, de que a presença de genes de receptores inibidores teria um papel de diminuir a atividade do sistema imune e que os ativadores predisporiam à doença. Outra observação intrigante é a associação de um pseudogene (*KIR2DP1*) a uma doença, uma vez que pseudogenes não expressam produtos proteicos.

Essas observações podem ser devidas a desequilíbrio de ligação e a lacunas existentes no conhecimento científico sobre esta família gênica. O importante é ter em mente que através de estudos populacionais, os geneticistas tem a oportunidade de prover hipóteses para serem testadas por fisiologistas e que o trabalho em conjunto é a chave para desvendar esses problemas e por fim traduzi-los em benefício clínico (KHAKOO e CARRINGTON, 2006).

Foram identificados 102 perfis genotípicos distintos na amostra (dois pertencentes ao haplogrupo A e cem ao haplogrupo B), sendo 30 deles inéditos. A frequência do haplogrupo A apresentou-se mais baixa do que nas demais populações verificadas na literatura. Neste trabalho não foi possível a identificação dos haplótipos dos indivíduos devido à metodologia empregada. Um estudo familiar que está sendo feito pelo grupo de pesquisa do LAPOGE poderá facilitar a identificação de alguns dos haplótipos encontrados na região.

Levando em consideração duas metodologias descritas para a genotipagem dos genes *KIR*, foi feita uma comparação das técnicas com 73 indivíduos da amostra, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores propostos por Vilches *et al.* (2007) e por Martin e Carrington (2008). Alguns resultados foram discordantes, e sugere-se a padronização da técnica de genotipagem, para permitir a comparação de resultados de diferentes trabalhos.

**REFERÊNCIAS**

ABI-RACHED, L.; PARHAM, P. Natural selection drives recurrent formation of activating killer cell immunoglobulin-like receptor and Ly49 from inhibitory homologues. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 8, p. 1319, 2005.

ALARCÓN-SEGOVIA, D., ALARCÓN-RIQUELME, M.E.; CARDIEL, M.H.; CAEIRO, F.; MASSARDO, L.; VILLA, A.R.; PONS-ESTEL, B.A. Familial Aggregation of Systemic Lupus Erythematosus, Rheumatoid Arthritis, and Other Autoimmune Diseases in 1,177 Lupus Patients From the GLADEL Cohort. **Arthritis & Rheumatism**, v. 52, n. 4, p. 1138-1147, 2005.

ALVES, L.G.T.; RAJALINGAM, R.; CANAVEZ, F. A novel real-time PCR method for *KIR* genotyping. **Tissue Antigens**, v.73, p. 188-191, 2008.

AUGUSTO, D.G. **Diversidade de genes KIR em uma população de ascendência predominantemente europeia**. 2010. 67f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Programa de Pós-graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

BARROW, A.D.; TROWSDALE, J. The extended human leukocyte receptor complex: diverse ways of modulating immune responses. **Immunological Reviews**, v. 224, p. 98-123, 2008.

BASHIROVA, A.A.; MARTIN, M.P.; MCVICAR, D.W.; CARRINGTON, M. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. **The Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 7, p. 277, 2006.

BERGEN, J. KONING, F. The tortoise and the hare: slowly evolving T-cell responses take hastily evolving KIR. **Immunology**, v. 131, n. 3, p. 301-9, 2010.

BRODIN, P. KÄRRE, K. HÖGLUND, P. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 4, p. 143, 2009.

CARRINGTON, M.; WANG, S.; MARTIN, M.P.; GAO, X.; SCHIFFMAN, M.; CHENG, J.; HERRERO, R.; RODRIGUEZ, A.C.; KURMAN, R.; MORTEL, R.; SCHWARTZ, P.; GLASS, A.; HILDESHEIM, A. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, p. 1069–1075, 2005.

CARRINGTON, M.; MARTIN, M.P. The impact of variation at the *KIR* gene cluster on human disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 298, p. 225, 2006.

CARRINGTON, M.; NORMAN, P. **The *KIR* gene cluster**, National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda, 2003.

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

CONESA, A.; FERNANDEZ-MESTRE, M.; PADRON, D.; TORO, F.; SILVA, N.; TASSINARI, P.; BLANCA, I.; MARTIN, M.P.; CARRINGTON, M.; LAYRISSE, Z. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the mestizo population from Venezuela. **Tissue antigens**, v. 75, p. 724-729, 2010.

CRISWELL, L.A. The Genetic Contribution to Systemic Lupus Erythematosus. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**, v. 66, p. 176-83, 2008.

DEMANET, C.; VERHEYDEN, S. KIR Allele Frequencies in a Belgium Population. **Human Immunology**, v. 65, p. 864-865, 2004.

DIEUDÉ, P. Rheumatic diseases: Environment and genetics. **Joint Bone Spine**, v. 76, p. 602–607, 2009.



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

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

FARIDI, R.M.; DAS, V.; TRIPTHI, G.; TALWAR, S.; PARVEEN, F.; AGRAWAL S. Influence of activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors on predisposition to recurrent miscarriages. **Human Reproduction**, v. 24, n. 7, p. 1758-1764, 2009.

FAUCI, A.S.; BRAUNWALD, E.; KASPER, D.L.; HAUSER, S.L.; LONGO, D.L.; JAMESON, J.L.; LOSCALZO, J. **Harrison's Manual of Medicine**, McGraw-Hill Medical, 17<sup>th</sup> edition, international edition, 2009.

FIALHO, R.N.; MARTINS, L.; PINHEIRO, J.P.; BETTENCOURT, B.F.; COUTO, A.R.; SANTOS, M.R.; PEIXOTO, M.J.; GARRETT, F.; LEAL, J.; TOMÁS, A.M.; BRUGES-ARMAS, J. Role of human leukocyte antigen, killer-cell immunoglobulin-like receptors, and cytokine gene polymorphisms in leptospirosis. **Human Immunology**, v. 70, p. 915-920, 2009.

FIERABRACCI, A. Recent insights into the role and molecular mechanisms of the autoimmune regulator (AIRE) gene in autoimmunity. **Autoimmunity reviews**, v. 10, n. 3, p. 137-143, 2011.

FLODSTRÖM-TULLBERG, M.; BRYCESON, Y.T.; SHI, F.; HÖGLUND, P.; LJUNGGREN, H. Natural killer cells in human autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, p. 634, 2009.

FLORES, A.C.; MARCOS, C.Y.; PALADINO, N.; CAPUCCHIO, M.; THEILER, G.; ARRUVITO, L.; PARDO., R.; HABEGGER, A.; WILLIAMS, F.; MIDDLETON, D.; FAINBOIM, L. KIR genes polymorphism in Argentinean Caucasoid and Amerindian populations. **Tissue Antigens**, v. 69, p. 568-576, 2007.

FRANCESCHI, D.S.A.; MAZINI, P.S.; RUDNICK, C.C.C.; SELL, A.M.; TSUNETO, L.T.; MELO, F.C.DE; BRAGA, M.A.; PEIXOTO, P.R.F.; VISENTAINER, J.E.L. Association between killer-cell immunoglobulin-like receptor genotypes and leprosy in Brazil. **Tissue Antigens**, v. 72, p. 478-482, 2008.

GÓMEZ-LOZANO, N., VILCHES, C. Genotyping of human killer-cell immunoglobulin-like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence-specific primers: An update. **Tissue Antigens**, v. 59, p. 184–193, 2002.

GONZÁLEZ, D.A.; DÍAZ, B.B.; PÉREZ, M.C.R.; HERNÁNDEZ, A.G.; CHICO, B.N.D.; LEÓNA, A.C. Sex hormones and autoimmunity. **Immunology Letters**, v. 133, p. 6–13, 2010.

GONZALEZ-GALARZA, F.F.; CHRISTMAS, S.; MIDDLETON, D.; JONES, A.R. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. **Nucleic Acid Research**, v. 39, *database issue*, D913-D919, 2011.

GOURRAUD, P.A.; BARNETCHE, T.; VIDAN-JERAS, B.; CAMBON-THOMSEN, A. Introduction to statistical analysis of population data in immunogenetics. **Transplant Immunology**, v. 14, p. 245-253, 2005.

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

GRAHAM, R.R.; HOM, G.; ORTMANN, W.; BEHRENS, T.W. Review of recent genome-wide association scans in lupus. **Journal of Internal Medicine**, v. 265, p. 680–688, 2009.

GREGERSEN, P.K. e BEHRENS, T.W. Genetics of autoimmune diseases – disorders of immune homeostasis. **Nature Reviews Genetics**, vol. 7, p. 917-926, 2006.

GRIESEMER, A.D.; SORENSON, E.C.; HARDY, M.A. The Role of the Thymus in Tolerance. **Transplantation**, v. 90, n. 5, p. 465-474, 2010.

GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, M.E.; SANDOVAL-RAMÍREZ, L.; DÍAZ-FLORES, M.; MARSH, S.G.E.; VALLADARES-SALGADO, A.; MADRIGAL, J.A.; MEJÍA-ARANGURE, J.M.; GARCÍA, C.A.; HUERTA-ZEPEDA, A.; IBARRA-CORTÉS, B.; ORTEGA-CAMARILLO, C.; CRUZ, M. KIR Gene in Ethnic and Mestizo Populations from Mexico. **Human Immunology**, v. 67, p. 85-93, 2006.

HARLEY, I.T.W., KAUFMAN, K.M., LANGEFELD, C.D., HARLEY, J.B., KELLY, J.A. Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 285, 2009.

HEALTH DECISION STRATEGIES. EpiMax Table Calculator. Disponível em <http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm>. Acesso em março de 2011.

HEWAGAMA, A.; RICHARDSON, B. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. **Journal of Autoimmunity**, v. 33, p. 3, 2009.

HEWETT, D.; SAMUELSSON, L.; POLDING, J.; ENLUND, F.; SMART, D.; CANTONE, K.; SEE, C.G.; CHADHA, S.; INEROT, A.; ENERBACK, C.; MONTGOMERY, D.; CHRISTODOLOU, C.; ROBINSON, P.; MATTHEWS, P.; PLUMPTON, M.; DYKES, C.; WAHLSTROM, J.; SWANBECK, G.; MARTINSSON, T.; ROSES, A.; RILEY, J.; PURVIS, I. Identification of a Psoriasis Susceptibility Candidate Gene by Linkage Disequilibrium Mapping with a Localized Single Nucleotide Polymorphism Map. **Genomics**, v. 79, n. 3, p. 305-314, 2002.

HOLLENBACH, J.A.; MEENAGH, A.; SLEATOR, C.; ALAEZ, C.; BENGOCHE, M.; CANOSSI, A.; CONTRERAS, G.; CREARY, L.; EVSEEVA, I.; GORODEZKY, C.; HARDIE, R.A.; HEMMINGKARLSEN, T.; LIE, B.; LUO, M.; MARTINETTI, M.; NAVARETTE, C.; OLIVEIRA, D.C.M.DE; OZZELLA, G.; PASI, A.;

PAVLOVA, E.; PINTO, S.; PORTO, L.C.; SANTOS, P.; SLAVCEV, A.; SRINAK, D.; TAVOULARIS, S.; TONKS, S.; TRACHTENBERG, E.; VEJBAESYA, S.; MIDDLETON, D. Report from the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) anthropology component of the 15<sup>th</sup> International Histocompatibility Workshop: worldwide variation in the KIR loci and further evidence for the co-evolution of KIR and HLA. **Tissue Antigens**, v. 76, p. 9-17, 2010.

HOLM, S.J.; SAKURABA, K.; MALLBRIS, L.; WOLK, K.; STAHL, M.; SANCHEZ, F.O. Distinct HLA-C/KIR Genotype Profile Associates with Gutrate Psoriasis. **Journal of investigative Dermatology**, v. 125, p. 721-730, 2005.

HOU, Y.F.; ZHANG, Y.C.; JIAO, Y.L.; WANG, L.C.; LI, J.F.; PAN, Z.L.; YANG, Q.R.; SUN, H.S.; ZHAO, Y.R. Disparate distribution of activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor genes in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 19, n. 1, p. 20-26, 2010.

HSU, K.C.; LIU, X-R.; SELVAKUMAR, A.; MICKELSON, E.; O'REILLY, 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. **Journal of Immunology**, v. 169, p. 5118-5129, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Síntese de indicadores sociais. Uma análise das condições de vida da população brasileira. 2009. Disponível em [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em março de 2011.

JÄGER, A; KUCHROO, V.K. Effector and Regulatory T-cell Subsets in Autoimmunity and Tissue Inflammation. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 72, p. 173, 2010.

JIANG, K.; ZHUM F.M.; LV, Q.F.; YAN, L.X. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population. **Tissue Antigens**, v. 65, n. 5, p. 556-63, 2005.

JIAO, Y.L.; ZHANG, B.C.; YOU, L.; LI, J.F.; ZHANG, J.; MA, C.Y.; CUI, B.; WANG, L.C.; CHEN, Z.J.; ZHAO, Y.R. Polymorphisms of KIR gene and HLA-C alleles: possible association with

susceptibility to HLA-B27-positive patients with ankylosing spondylitis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 6, p. 840-4, 2010.

JOBIM, M.; CHAGASTELLES, P.; SALIM, P.H.; PORTELA, P.; WILSON, T.J.; CURTI, A.G.; JOBIM, M.R.; JOÃO, D.A.; NARDI, N.B.; TSCHIEDEL, B.; JOBIM, L.F.; ROESLER, R.; SCHWARTSMANN, G. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigen-C genotypes in South Brazilian with type 1 diabetes. **Human Immunology**, v. 71, p. 799–803, 2010.

JOBIM, M.; JOBIM, L.F.J. Células *natural killer* e vigilância imunológica. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 4 (suplemento), p. S58, 2008.

KHAKOO, S.I.; CARRINGTON, M. KIR and disease: a model system or system of models? **Immunological Reviews**, v. 214, p. 186–201, 2006.

KHAKOO, S. I.; THIO, C.L.; MARTIN, M.P.; BROOKS, C.R.; GAO, X.; ASTEMBORSKI, J.; CHENG, J.; GOEDERT, J.J.; VLAHOV, D.; HILGARTNER, M.; COX, S.; LITTLE, A.M.; ALEXANDER, G.J.; CRAMP, M.E.; O'BRIEN, S.J.; ROSENBERG, W.M.C.; THOMAS, D.L.; CARRINGTON, M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. **Science**, v. 305, p. 872-874, 2004.

KIKUCHI-MAKI, A.; CATINA, T.L.; CAMPBELL, K.S. Cutting Edge: KIR2DL4 Transduces Signals into Human NK Cells through Association with the Fc Receptor  $\gamma$  Protein. **Journal of Immunology**, v. 174, p. 3859-3863, 2005.

KULKARNI, S.; MARTIN, M.P.; CARRINGTON, M. KIR genotyping by multiplex PCR-SSP. **Methods in Molecular Biology**, v. 612, p. 365-375, 2010.

LISTÌ, F.; CARUSO, C.; COLONNA-ROMANO, G.; LIO, D.; NUZZO, D.; CANDORE, G. HLA and KIR Frequencies in Sicilian Centenarians. **Rejuvenation Research**, v.13, n. 2-3, p. 314-318, 2010.

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

LONG, E.O.; COLONNA, M.; LANIER, L.L. Inhibitory MHC class I receptors on NK and T cells: a standard nomenclature. **Immunology Today**, v. 17, n. 2, p. 100, 1996.

LOPEZ, P.; MOZO, L.; GUTIERREZ, C.; SUAREZ, A. Epidemiology of systemic lupus erythematosus in a northern Spanish population: gender and age influence on immunological features. **Lupus**, v. 12, p. 860-865, 2003.

LOPEZ-VAZQUEZ, A., RODRIGO, L., MARTINEZ-BORRA, J. PEREZ, R.; RODRIGUEZ, M.; FDEZ-MORERA, J.L.; FUENTES, D.; RODRIGUEZ-RODERO, S.; GONZALEZ, S.; LOPEZ-LARREA, C. Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 192, p.162–165, 2005a.

LOPEZ-VAZQUEZ, A., MINA-BLANCO, A., MARTINEZ-BORRA, J.; NJOBVU, P.D.; SUÁREZ-ALVAREZ, B.; BLANCO-GELAZ, M.A.; GONZÁLEZ, S.; RODRIGO, L.; LÓPEZ-LARREA, C. Interaction between KIR3DL1 and HLA-B\*57 supertype alleles influence the progression of HIV-1 infection in a Zambian population. **Human Immunology**, v. 66, p. 285–289, 2005b.

LUSZCZEK, W.; MANCZAK, M.; CISLO, M.; NOCKOWSKI, P.; WISNIEWSKI, A.; JASEK, M.; KUSNIERCZYK, P. Gene for the Activating Natural Killer Cell Receptor, KIR2DS1, is Associated With Susceptibility to Psoriasis Vulgaris. **Human Immunology**, n. 65, p. 758–766, 2004.

MAJORCZYK, E.; PAWLIK, A.; LUSZCZEK, W.; NOWAK, I.; WISNIEWSKI, A.; JASEK, M.; KUS NIERCZYK, P. Associations of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with complications of rheumatoid arthritis. **Genes and Immunity**, v. 8, p. 678-683, 2007.

MARRERO, A.R.; BRAVI, C.; STUART, S.; LONG, J.C.; LEITE F.P.N.; KOMMERS, T.; CARVALHO, C.M.; PENA, S.D.; RUIZ-LINARES, A.; SALZANO, F.M.; BORTOLINI M.C. Pre- and post-Columbian gene and cultural continuity: the case of the Gaucho from southern Brazil. **Human Heredity**, v. 64, n. 3, p. 160-171, 2007.

MARTIN, M.P.; CARRINGTON, M. KIR locus polymorphisms: genotyping and disease association analysis. **Methods in Molecular Biology**, v. 415, p. 49-64, 2008.

MARTIN, M.P.; NELSON, G.; LEE, J-H.; PELLETT, F.; GAO, X.; WADE, J.; WILSON, M.J.; 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. **Journal of Immunology**, v. 169, p. 2818-2822, 2002.

MOMOT, T.; KOCH, S.; HUNZELMANN, N.; KRIEG, T.; ULBRICHT, K.; SCHMIDT, R.E.; WITTE, T. Association of Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors With Scleroderma. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 5, p. 1561-1565, 2004.

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

MORGUN, A.; GODCALVES-PRIMO, A.; SHULZHENKO, N.; RAMPIM, G.F.; MINE, K.L.; GERBASE-DELIMA, M. HLA-DQB1 and -DRB1 Alleles, Cytokine Polymorphisms and KIR Gene Frequencies in a Population (Caucasian) from South East Brazil. **Human Immunology**, v. 65, p. 879, 2004.

NELSON, G.W.; MARTIN, M.P.; GALDMAN, D.; WADE, J.; TROWSDALE, J.; CARRINGTON, M. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. **Journal of Immunology**, v. 173, p. 4273–4276, 2004.

OLIVER, J.E.; SILMAN, A.J. Why are women predisposed to autoimmune rheumatic diseases? **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, p. 252, 2009.

ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MEN. Disponível em [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Acesso em março de 2011.

ORDOÑEZ, D.; SANCHEZ, A.J.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, J.E.; CISNEROS, E.; RAMIL, E.; ROMO, N.; MORARU, M.; MUNTEIS, E. LOPEZ-BOTET, M.; ROQUER, J.; GARCIA-MERINO, A.; VILCHES, C. Multiple sclerosis associates with LILRA3 deletion in Spanish patients. **Genes and Immunity**, v. 10, p. 579–585, 2009.

ORR, M.T.; LANIER, L.L. Natural Killer Cell Education and Tolerance. **Cell**, v. 142, p. 847, 2010.

PARHAM, P. Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. **Molecular Immunology**, v. 42, p. 459–462, 2005.

PARHAM, P.; ABI-RACHED, L.; MATEVOSYAN, L.; MOESTA, A.K.; NORMAN, P.J.; AGUILAR, A.M.O.; GUETHLEIN, L.A. **Journal of Medical Primatology**, v. 39, p. 194–212, 2010.

PEDROZA, L.S.R.A.; SAUMA, M.F.L.C.; VASCONCELOS, J.M.; TAKESHITA, L.Y.C.; RIBEIRO-RODRIGUES, E.M.; SASTRE, D.; BARBOSA, C.M.; CHIES, J.A.B.; VEIT, T.D.; LIMA, C.P.S.; OLIVEIRA, L.F.; HENDERSON, B.L.; CASTRO, A.P.G.; MAIA, M.H.T.; BARBOSA, F.F.; SANTOS, S.E.B.; GUERREIRO, J.F.; SENA, L.; SANTOS, E.J.M. Systemic lupus erythematosus: Association with KIR and SLC11A1 polymorphisms, ethnic predisposition and influence in clinical manifestations at onset revealed by ancestry genetic markers in an urban Brazilian population. **Lupus**, v. 20, p. 265-273, 2011.

PELLETT, F.; SIANNIS, F.; VUKIN, I.; LEE, P.; UROWITZ, M.B.; GLADMAN, D.D. KIRs and autoimmune disease: studies in systemic lupus erythematosus and scleroderma. **Tissue Antigens**, journal compilation 69, suppl. 1, p. 106-108, 2007.



PERRICONE, R.; PERRICONE, C.; DE CAROLIS, C.; SHOENFELD, Y. NK cells in autoimmunity: A two-edg'd weapon of the immune system. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, p. 384, 2008.

PETRI, M.; KIM, M.Y.; KALUNIAN, K.C.; GROSSMAN, J.; HAHN, B.H.; SAMMARITANO, L.R.; LOCKSHIN, M.; MERRILL, J.T.; BELMONT, H.M.; ASKANASE, A.D.; MCCUNE, W.J.; HEARTH-HOLMES, M.; DOOLEY, M.A.; VON FELDT, J.; FRIEDMAN, A.; TAN, M.; DAVIS, J.; CRONIN, M.; DIAMOND, B.; MACKAY, M.; SIGLER, L.; FILLIUS, M.; RUPEL, A.; LICCIARDI, F.; BUYON, J.P. Combined oral contraceptives in women with systemic lupus erythematosus. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 24, 2010.

RAHMAN, A.; ISENBERG, D.A. Systemic lupus erythematosus. **New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 929–39, 2008.

ROBINSON, J.; MISTRY, K.; McWILLIAM, H.; LOPEZ, R.; MARSH, S.G.E. IPD - The Immuno Polymorphism Database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. D863-869, 2010.

ROSENBERG, N.A.; HUANG, L.; JEWETT, E.M.; SZPIECH, Z.A.; JANKOVIC, I.; BOEHNKE, M. Genome-wide association studies in diverse populations. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, p. 356-366, 2010.

SALIM, P.H.; JOBIM, M.; BREDEMEIER, M.; CHIES, J.A.; SCHLOTTFELDT, J.; BRENOL, J.C.; JOBIM, L.F.; XAVIER, R.M. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes in systemic sclerosis. **Journal of Clinical and Experimental Immunology**, v. 160, n. 3, p. 325-30, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Cold Spring Harbor Laboratory**, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

SATO, I.E.; BONFÁ, E.D.; CONSTALLAT, L.T.L.; SILVA, N.A.; BRENOL, J.C.T.; SANTIAGO, M.B.; SZAJUBOK, J.C.M.; RACHID, A.; BARROS, R.T.; VASCONCELOS, M. Consenso brasileiro para o tratamento do lúpus eritematoso sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.42, n.6, p.362-370, 2002.

SCHLEINITZ, N.; VÉLY, F.; HARLÉ, J.R.; VIVIER, E. Natural killer cells in human autoimmune diseases. **Immunology**, v. 131, p. 451–458, 2010.

SINGLE, R.M.; MARTIN, M.P.; MEYER, D.; GAO, X.; CARRINGTON, M. Methods for assessing gene content diversity of KIR with examples from a global set of populations. **Immunogenetics**, v. 60, p. 711-725, 2008.

SHAPIRA, Y.; AGMON-LEVIN, N.; SHOENFELD, Y. Geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 468, 2010.

SHASTRY, A.; SEDIMBI, S.K.; RAJALINGAM, R.; RUMBA, I.; KANUNGO, A.; SANJEEVI, C.B. Different KIRs Confer Susceptibility and Protection to Adults with Latent Autoimmune Diabetes in Latvian and Asian Indian Populations. *Immunology of Diabetes V: Annals of the New York Academy of Science*, v. 1150, p. 133–138, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. Disponível em <http://www.reumatologia.com.br>. Acesso em março de 2011.

SUZUKI, Y.; HAMAMOTO, Y.; OGASAWARA, Y.; ISHIKAWA, K.; YOSHIKAWA, Y.; SASAZUKI, T.; MUTO, M. Genetic Polymorphisms of Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors Are Associated with Susceptibility to Psoriasis Vulgaris. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, p. 1133–1136, 2004.

TARAZONA-SANTOS, E.M.; RAIMONDI, S.; FUSELLI, S. Controlling the effects of population stratification by admixture in pharmacogenomics. In: Suarez-Kurtz G (Ed.). **Pharmacogenomics in admixed populations**. Landes Bioscience, Austin, Estados Unidos, p 1-16, 2007.

TVEITA, A.A. The danger model in deciphering autoimmunity. **Rheumatology**, v. 49, p. 632–639, 2010.

UHRBERG, M.; VALIANTE, N.M.; SHUM, B.P.; SHILLING, H.G.; LIENERT-WEIDENBACH, K.; CORLISS, B.; TYAN, D.; LANIER,

L.L.; PARHAM, P. Human Diversity in Killer Cell Inhibitory Receptor Genes. **Immunity**, v. 7, p. 753–763, 1997.

van der SLIK, A.R.; KOELEMAN, B.P.C.; VERDUIJN, W.; BRUINING, G.J.; ROEP, B.O.; GIPHART, M.J. Disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA matched control subjects. **Diabetes**, v. 52, p. 2639, 2003.

VILAR, M.J.P.; SATO, E.I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). **Lupus**, v. 11, p. 528-532, 2002.

VILCHES, C.; CASTAÑO, J.; GÓMEZ-LOZANO, N.; ESTEFANÍA, E. Facilitation of *KIR* genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. **Tissue Antigens**, v. 70, p. 415–422, 2007.

VILCHES, C.; PARHAM, P. KIR: Diverse, Rapidly Evolving Receptors of Innate and Adaptive Immunity. **Annual Reviews of Immunology**, v. 20, p.217, 2002.

VIVIER, E.; RAULET, D.H.; MORETTA, A.; CALIGIURI, M.A.; ZITVOGEL, L.; LANIER, L.L.; YOKOYAMA, W.M.; UGOLINI, S. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. **Science**, v. 331, n. 6013, p. 44-49, 2011.

WAUQUIER, N.; PADILLA, C.; BECQUART, P.; LEROY, E.; VIEILLARD, V. Association of KIR2DS1 and KIR2DS3 with fatal outcome in Ebola virus infection. **Immunogenetics**, v. 72, p.767-771, 2010..

WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annual Human Genetics**, Cambridge, v. 19, p. 251-253, 1955.

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

YEN, J.H.; MOORE, B.E.; NAKAJIMA, T.; SCHOLL T.; SCHAID, D.J.; WEYAND, C.M.; GORONZY, J.J. Major histocompatibility complex class I recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 193, p. 1159–1167, 2001.

## **ANEXOS**



## **Anexo A**

### **Questionário aplicado a pacientes com lúpus eritematoso sistêmico**







**Universidade Federal de Santa Catarina**  
**Departamento de Biologia Molecular, Embriologia e Genética/CCB**  
**Departamento de Clínica Médica/CCS**  
**Análise de Polimorfismos Gênicos em Pacientes com Lúpus Eritematoso**  
**Sistêmico**

**Nome:** \_\_\_\_\_ **Prontuário/HU:** \_\_\_\_\_  
**Idade:** \_\_\_\_ anos **Sexo:** ( )F ( )M **Cor da pele:** \_\_\_\_\_  
**Procedência:** \_\_\_\_\_ **Natural de:** \_\_\_\_\_  
**Estado civil:** ( )S ( )C ( )D ( )V **Ocupação:** \_\_\_\_\_  
**Telefone:** \_\_\_\_\_  
**Data:** \_\_\_\_\_ **LUP** \_\_\_\_\_

**Médico responsável:** ` \_\_\_\_\_

**DADOS FAMILIARES:**

**Nome do pai:** \_\_\_\_\_  
**Cidade onde nasceu:** \_\_\_\_\_ **Profissão:** \_\_\_\_\_  
**Ascendência:** Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_  
**Nome da mãe:** \_\_\_\_\_  
**Cidade onde nasceu:** \_\_\_\_\_ **Profissão:** \_\_\_\_\_  
**Ascendência:** Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_  
**Tempo de doença diagnosticada:** \_\_\_\_\_  
**História familiar:** Lúpus: ( )S ( )N Parentesco: \_\_\_\_\_  
 Outras D. Reumat.: ( )S ( )N Parentesco: \_\_\_\_\_

**Manifestações iniciais:**

- |                          |                            |
|--------------------------|----------------------------|
| ( ) Febre                | ( ) Úlcera oral ou nasal   |
| ( ) Alopecia             | ( ) Serosite               |
| ( ) Fenômeno de Raynaud  | ( ) Distúrbio Renal        |
| ( ) <i>Rash</i> Malar    | ( ) Distúrbio Neurológico  |
| ( ) <i>Rash</i> Discóide | ( ) Distúrbio Hematológico |
| ( ) Fadiga               | ( ) Hipertensão Arterial   |
| ( ) Artrite              | ( ) Vasculite              |
| ( ) Fotossensibilidade   | ( ) Outras? Quais?         |

**Evolução: Internações:** ( )S ( )N Quantas? \_\_\_\_\_

**Motivos?** \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**Manifestações associadas:** ( )S ( )N Quais? \_\_\_\_\_

- Sobreposição com alguma outra doença reumatológica:**
- ( ) Esclerodermia
  - ( ) Sjögren
  - ( ) Dermatomiosite
  - ( ) SAF
  - ( ) Fibromialgia
  - ( ) Outras Quais?

**Observações:** Diabetes? Depressão? \_\_\_\_\_

**Sintomatologia recente (últimos 10 dias)**

- ( ) Febre
- ( ) Alopécia
- ( ) Fenômeno de Raynaud
- ( ) *Rash* Malar
- ( ) *Rash* Discóide
- ( ) Fadiga
- ( ) Artrite
- ( ) Fotossensibilidade
- ( ) Úlcera oral ou nasal
- ( ) Serosite
- ( ) Distúrbio Renal
- ( ) Distúrbio Neurológico
- ( ) Distúrbio Hematológico
- ( ) Hipertensão Arterial
- ( ) Vasculite
- ( ) Outras? Quais?

**Tratamento Atual:**

- Corticosteróides:** ( )S ( )N Qual? \_\_\_\_\_ Dose? \_\_\_\_\_ Frequência? \_\_\_\_\_
- Azatioprina:** ( )S ( )N Qual? \_\_\_\_\_ Dose? \_\_\_\_\_ Frequência? \_\_\_\_\_
- Antimalárico:** ( )S ( )N Qual? \_\_\_\_\_ Dose? \_\_\_\_\_ Frequência? \_\_\_\_\_
- Metotrexato:** ( )S ( )N Dose? \_\_\_\_\_ Frequência? \_\_\_\_\_
- Ciclosporina:** ( )S ( )N Dose? \_\_\_\_\_ Frequência? \_\_\_\_\_
- Ciclofosfamida:** ( )S ( )N Dose? \_\_\_\_\_ Frequência? \_\_\_\_\_
- Aine:** ( )S ( )N Qual? \_\_\_\_\_ Dose? \_\_\_\_\_ Frequência? \_\_\_\_\_
- Analgésicos:** ( )S ( )N Qual? \_\_\_\_\_ Dose? \_\_\_\_\_ Frequência? \_\_\_\_\_
- Outros:** ( )S ( )N Quais? \_\_\_\_\_ Dose? \_\_\_\_\_ Frequência? \_\_\_\_\_

.....  
**Idade da menarca:** \_\_\_\_\_ anos **Menopausa:** ( )S ( )N Idade: \_\_\_\_\_ anos  
**Gestações:** \_\_\_\_\_ **Partos:** \_\_\_\_\_ **Fase do ciclo reprodutivo:** ( )Menacme  
( )Climatério

**Tratamento HORMONAL Antes do Diagnóstico:** ( )S ( )N

Qual? ( )AC ( )Outro

Duração: \_\_\_\_\_ Parou há quanto tempo? \_\_\_\_\_

**Tratamento MEDICAMENTOSO Antes do Diagnóstico:** ( )S ( )N

Quais? \_\_\_\_\_

.....

**História de uso de drogas:**

Álcool:            ( )S    ( )N Tipo: \_\_\_\_\_

Quantidade?    Frequência?

Cigarro:            ( )S    ( )N Cigarros/dia: \_\_\_\_\_

Se fumava, qual a duração?

Quando parou?

Drogas Ilícitas: ( )S    ( )N Qual?

Por quanto tempo?

**SLEDAI**  
**(Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index)**  
**Modificação SELENA**

Avaliação Global do Médico \_\_\_\_\_

**Score SLEDAI**

Marque se o descriptor estiver presente no momento da visita ou nos 10 dias anteriores (0 – nula; 1 – leve; 2 – média; 3 – severa) .

Pes	Pres.	Descritor	Definição
8	( )	Convulsão	início recente. Excluir causa metabólica, infecciosa ou farmacológica.
8	( )	Psicose	Alterações na habilidade de exercer atividades normais devido a distúrbio severo na percepção da realidade. Inclui alucinações, incoerência, pensamento ilógico, comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico, conteúdo pobre de pensamentos. Excluir uremia e causas farmacológicas.
8	( )	Síndrome Cerebral Orgânica	Função mental alterada com diminuição da orientação, memória ou outras funções inteligentes, com início abrupto e características clínicas flutuantes. Inclui redução da consciência com capacidade reduzida de concentração e incapacidade de manter-se atento ao ambiente, mais pelo menos 2 dos seguintes: distúrbio de percepção, fala incoerente, insônia ou sonolência diurna, ou atividade psicomotora aumentada ou diminuída. Excluir causas metabólicas, infecciosas ou farmacológicas.
8	( )	Distúrbio Visual	Alterações retinianas do lupus.. Inclui corpos citóides, hemorragias etinianas, hemorragia ou exsudato na coróide ou neurite óptica. Excluir hipertensão, infecção ou causas farmacológicas.
8	( )	Distúrbio em Nervo Craniano	início recente de neuropatia sensorial ou motora envolvendo nervos cranianos.
8	( )	Cefaléia do Lupus	Cefaléia severa e persistente: pode ser migranosa, mas deve ser não-responsiva a analgesia narcótica.
8	( )	AVC	início recente de AVC. Excluir aterosclerose
8	( )	Vasculite	Úlceração, gangrena, nódulos moles nos dedos, infarto periungueal, hemorragia em cunha, ou biópsia ou angiograma provando vasculite.
4	( )	Artrite	Mais do que 2 articulações com dor e sinais de inflamação (i.e. edema, ferrugem articular ou sensibilidade)
4	( )	Miosite	Fraqueza ou dor muscular proximais, associada com CPK/aldolas elevada ou mudanças no eletromiograma ou biópsia mostrando miosite.
4	( )	Cilindros Urinários	Cilindros de hemácias ou heme-granulares.
4	( )	Hematuria	≥5 hemácias/campo. Excluir cálculo, infecção ou outra causa.
4	( )	Proteinúria	≥0,5 g/24 h. Início recente ou aumento recente de mais que 0,5 g/24 h.
4	( )	Piúria	≥5 leucócitos/campo. Excluir infecção.
2	( )	Rash Novo	início recente ou recorrência de rash do tipo inflamatório.
2	( )	Alopécia	início recente ou recorrência de perda de cabelo anormal, em placas ou difusa.
2	( )	Úlceras em Mucosas	início recente ou recorrência de úlceras nasais ou orais.
2	( )	Pleurisia	Dor torácica pleurítica com atrito pleural ou derrame, ou espessamento pleural.
2	( )	Pericardite	Dor de origem pericárdica ou pelo menos 1 dos seguintes: atrito, derrame ou confirmação eletrocardiográfica.
2	( )	Complemento Baixo	Diminuição no CH50, C3 ou C4 abaixo do limite inferior do laboratório.
2	( )	Agregação de DNA Aumentada	≥25% por ensaio Farr or acima da variação normal para o laboratório
1	( )	Febre	≥38°C. Excluir causas infecciosas.
1	( )	Trombocitopenia	≤100.000 plaquetas/mm <sup>3</sup> .
1	( )	Leucopenia	≤3000 leucócitos/mm <sup>3</sup> . Excluir causas farmacológicas

\_\_\_\_\_ Score Total (soma dos pesos)

<b>Crise Leve ou Moderada ( )</b>	<b>Severa ( )</b>
) Mudança no SLEDAI >3 pontos	) Mudança no SLEDAI >12 pontos
) Úlceras nasofaríngeas Pleurite Pericardite Artrite Febre (LES) Lupus bolhoso, vasculite cutânea, profunda, fotosensível e discóide recente/pior	) SNC-LES recente ou pior Vasculite (????) Nefrite Miosite Pk<60.000 Hb<7% ou diminuição na HB>3% Precisando de prednisona em dobro
) Aumento na prednisona, mas não para mais que 0,5 mg/kg/dia	) Prednisona>0,5 mg/kg/dia
) Adicionado AINE ou Plaquenil	) Necessidade de Azatioprina, Metotrexato ou hospitalização pelo LES
) Aumento na PGA maior ou igual a 1 mas não maior que 2,5	) Aumento no PGA para mais de 2,5



## **Anexo B**

**Termo de consentimento livre e esclarecido e  
declaração de consentimento dos pacientes**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E  
GENÉTICA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AO  
PACIENTE**

**Projeto de Pesquisa:** “GENÉTICA DA AUTOIMUNIDADE: POLIMORFISMOS EM LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E ARTRITE REUMATÓIDE EM PACIENTES DE SANTA CATARINA”.

**Informações:**

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo um projeto de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e medicamentos que podem estar associados ao **aparecimento e melhor tratamento de doenças autoimunes, mas especificamente ao Lúpus Eritematoso Sistêmico**. Para isto pedimos sua **colaboração e permissão** para extrairmos de parte de seu material biológico (sangue), uma quantia pequena de **DNA** (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA, será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns de seus genes, propostos no atual projeto (ligados ao metabolismo de medicamentos e de substâncias estranhas ao organismo e também relacionados à resposta imunológica) e o aparecimento desta doença. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contacto. Deixamos claro que **sua participação é voluntária**, não influenciando no seu atendimento e tratamento. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam.

Para isso você pode telefonar para o número (48) 3331-9804 e conversar com a Profa. Dra. Iliada Rainha de Souza ou com o Prof. Dr. Ivânio Alves Pereira (no ambulatório de Reumatologia, telefone: 3331-9133).

**Procedimentos:**

Caso você concorde em participar, você irá responder um questionário de duração aproximada de 5 minutos, para sabermos se você teve outras doenças, se outras pessoas na sua família tiveram doença autoimune, como lúpus eritematoso sistêmico ou outra forma de lúpus, etc.

O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

**Riscos:**

A coleta de sangue é um procedimento normal para o tratamento da sua doença. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidos em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

**Custos:**

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo

**Benefícios**

Você não terá nenhum benefício direto logo após participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão num futuro próximo dar um tratamento mais eficaz e resultar numa melhor alternativa de medicamento. Num futuro posterior, poderá proporcionar novas alternativas para prevenção da doença e identificação de pessoas que tem risco de desenvolver a doença, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Assinaturas:

Pesquisador auxiliar \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável \_\_\_\_\_

Florianópolis, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

## DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu declaro que concordo em participar da pesquisa “**Genética da Autoimunidade**” na condição de voluntário de acordo com os critérios expostos no termo de consentimento livre e esclarecido:

Florianópolis,

Assinatura: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_



## **Anexo C**

### **Questionário aplicado a indivíduos controles**





**Universidade Federal de Santa Catarina**  
**Centro de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética**  
**Laboratório de Polimorfismos Genéticos**

**QUESTIONÁRIO – GRUPO CONTROLE**

IDENTIFICAÇÃO

**Data:** \_\_/\_\_/\_\_ **Coleta:** ( ) sangue

**Dados Pessoais:**

Nome \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_

Telefone Residencial: \_\_\_\_\_

Telefone Trabalho: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) M ( ) F Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Estado Civil: \_\_\_\_\_ Tipo de sangue: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_ Aposentado: ( ) Sim ( ) Não

Escolaridade: ( ) analfabeto ( ) 1º grau incompleto

( ) 1º grau completo ( ) 2º grau incompleto

( ) 2º grau completo ( ) superior incompleto

( ) superior completo ( ) pós graduação

Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_

Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_

Ascendência:  
materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Etnia: ( ) Euro descendente ( ) Afro descendente

( ) Asiático descendente ( ) Indígena descendente

Cor da pele: ( ) negra ( ) mulata ( ) amarela ( ) branca

Observação: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

---

**Dados Familiares:**

Nome do pai: \_\_\_\_\_

Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_

Ascendência do pai:

Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_

Descendência da mãe: Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Possui Irmãos: ( ) Sim ( ) Não Quantos: \_\_\_\_\_

Possui filhos: ( ) Sim ( ) Não Quantos: \_\_\_\_\_

---

Ingere **BEBIDA ALCOÓLICA**? ( ) Sim ( ) Não

Frequência: ( ) Todos os dias ( ) Fim de semana

( ) Esporadicamente (Festas)

Quantidade (copos 200ml): \_\_\_\_\_

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

( ) Cerveja ( ) Vinho ( ) Cachaça ( ) Outro \_\_\_\_\_

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

( ) Cerveja ( ) Vinho ( ) Cachaça ( ) Outro \_\_\_\_\_

Pratica **EXERCÍCIOS FÍSICOS**? ( ) Sim ( ) Não

Tipo: \_\_\_\_\_

---

Quantidade: ( ) menos de 30 min ( ) 30 min ( ) 1h ( ) mais de 1h

Frequência: ( ) 1x semana ( ) 2-3x semana ( ) 4-6x semana

( ) Todo os dias ( ) Menos de 1x semana

Você **FUMA**? ( ) Sim ( ) Não

Você já **FUMOU**? ( ) Sim ( ) Não

Tipo: ( ) Cigarro ( ) Charuto ( ) Cachimbo ( ) Outro \_\_\_\_\_

Quantidade e Frequência (nº de cigarros por dia): \_\_\_\_\_

Tempo que fuma ou fumou: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo parou \_\_\_\_\_

---



Entrevistador: \_\_\_\_\_ Data da entrevista: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

### Identificação:

#### Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: \_\_\_\_\_

MENOPAUSA: ( ) Sim ( ) Não Idade \_\_\_\_\_

HISTERECTOMIA: ( ) Sim ( ) Não

PARIDADE:

Nº de gestações \_\_\_\_\_ Idade da 1ª gestação \_\_\_\_\_

Nº de filhos ( ) nulípara N \_\_\_\_\_

Abortos ( ) P ( ) E N \_\_\_\_\_

Amamentou: ( ) Sim ( ) Não Tempo total (meses): \_\_\_\_\_

TRAT. HORMONAL:

Utiliza AC? ( ) Sim ( ) Não \_\_\_\_\_

Nome e tipo (oral, adesivo, injetável) do AC \_\_\_\_\_

Tempo que usa ou usou AC \_\_\_\_\_

Há quanto tempo parou \_\_\_\_\_

Faz TRH? ( ) Sim ( ) Não \_\_\_\_\_

Já fez TRH? ( ) Sim ( ) Não

Nome do Hormônio \_\_\_\_\_

Tempo que faz ou fez TRH \_\_\_\_\_

Há quanto tempo parou \_\_\_\_\_

( ) Outros hormônios \_\_\_\_\_

Tempo total: \_\_\_\_\_

Observações \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

#### Histórico Médico

Caso de **CÂNCER** pessoal? ( ) Sim ( ) Não

Tipo: \_\_\_\_\_

Casos de **CÂNCER DE MAMA** na família? ( ) Sim ( ) Não

Grau de Parentesco: ( ) filha ( ) irmã ( ) mãe ( ) avó  
( ) tia materna 1º grau ( ) tia paterna 1º grau  
( ) prima materna 1º grau ( ) prima paterna 1º grau  
( ) Outros \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Casos de **CÂNCER** de outro tipo na família? ( ) Sim ( ) Não  
Grau de Parentesco e tipo:  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Caso de **TUMOR BENIGNO** pessoal? ( ) Sim ( ) Não  
Local: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Caso de **DOENÇA AUTOIMUNE** pessoal? ( ) Sim ( ) Não  
Qual? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Tempo de diagnóstico: \_\_\_\_\_

Casos de **DOENÇA AUTOIMUNE** na família? ( ) Sim ( ) Não  
Grau de Parentesco e tipo: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Você tem alguma **DOENÇA CARDIOVASCULAR**?  
( ) Sim ( ) Não Qual? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

---

HIPERTENSÃO ARTERIAL:	( ) Sim	( ) Não
HIPERCOLESTEROLEMIA:	( ) Sim	( ) Não
OSTEOPOROSE:	( ) Sim	( ) Não
DOENÇA REUMÁTICA:	( ) Sim	( ) Não

---

---

DIABETES:  Sim  Não  
 ASMA:  Sim  Não  
 HIV:  Sim  Não  Nunca fez exame  
 HEPATITE:  Sim  Não  Nunca fez exame  
 DENGUE:  Sim  Não  
 TUBERCULOSE:  Sim  Não  
 DISTÚRBIO RENAL:  Sim  Não  
 DISTÚRBIO PULMONAR:  Sim  Não  
 DISTÚRBIO HEPÁTICO:  Sim  Não

Casos de DOENÇA DE ALZHEIMER na família:  Sim  Não  
 Grau de parentesco: \_\_\_\_\_

Casos de DOENÇA DE PARKINSON na família:  Sim  Não  
 Grau de parentesco: \_\_\_\_\_

OUTRAS DOENÇAS?: \_\_\_\_\_

Alérgico a algum medicamento? \_\_\_\_\_

Alérgico a algum alimento? \_\_\_\_\_

Teve DEPRESSÃO? \_\_\_\_\_

Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo?  
 Sim  Não Nome do medicamento (dosagem e frequência) e  
 tempo que utilizou: \_\_\_\_\_

---



## **Anexo D**

**Termo de consentimento livre e esclarecido e  
declaração de consentimento dos controles**





Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética  
Laboratório de Polimorfismos Genéticos

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projetos de Pesquisa:

**“Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”**

e

**“Genética da autoimunidade: polimorfismos em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide em pacientes de Santa Catarina...”**

### Informações:

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo projetos de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao **aparecimento do câncer de mama e doenças autoimunes**. Para isto pedimos sua **colaboração e permissão** para fazer parte do **grupo controle** e para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantidade pequena de **DNA** (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns genes, propostos nos atuais projetos (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais, de substâncias estranhas ao organismo, relacionados ao reparo de DNA e sistema imune) e o aparecimento destas doenças. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que **sua participação é voluntária**. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número **(48) 3721-9804** e conversar com a Prof<sup>a</sup>. Dra. Líada Rainha de Souza ou seus orientandos.

### **Procedimentos:**

Caso você concorde em participar, você irá preencher um questionário para sabermos seus dados pessoais (como nome, endereço e telefone) e irá assinar um termo de consentimento livre e esclarecido para que possamos utilizar seus dados pessoais e material biológico nestas pesquisas.

Também precisaremos tirar um pouco de sangue numa seringa.

O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Entraremos em contato pelo telefone fornecido o mais breve possível para realizarmos um novo questionário de duração máxima de 20 minutos. Este questionário irá conter dados como seus hábitos alimentares e pessoais, histórico reprodutivo e histórico clínico, essenciais para o desenvolvimento das pesquisas.

### **Riscos:**

A coleta de sangue é um procedimento normal para a realização de vários exames. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidas em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

### **Custos:**

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

### **Benefícios**

Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer de mama e doenças autoimunes, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver essas doenças, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

### **Pesquisador responsável**

---

Florianópolis, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_



## **DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO**

**Eu,** \_\_\_\_\_,  
**fui esclarecido(a) sobre as pesquisas** “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina” e “Genética da autoimunidade: polimorfismos em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide em pacientes de Santa Catarina”, **e concordo que meus dados sejam utilizados na realização das mesmas.**

Florianópolis,

Assinatura: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_



## **Anexo E**

### **Protocolo de extração de DNA**



## Protocolo de extração de DNA

(SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 2001)

Esse método consiste no rompimento mecânico e químico das células, degradação de proteínas, precipitação e purificação do DNA, que se mantém conservado.

### Soluções necessárias:

#### Tampão de extração SEB

(*Stain Extraction Buffer*)

- Tris-HCl 10mM pH 7,5
- EDTA 10mM pH 8,0
- NaCl 100mM
- SDS 2%

#### Proteinase K

- Solução de proteinase K 20mg/ml

#### Clorofane

- Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico

#### Clorofórmio

- Clorofórmio absoluto

#### Álcool isopropílico

- Álcool isopropílico absoluto

#### Acetato de Sódio 3M

- Solução de acetato de sódio 3M

#### Etanol 70%

- Solução de etanol 70:30

#### Tampão TE

- Tris-HCl 10mM
- EDTA 0,1mM pH 7,5

### Procedimento:

- Em um microtubo de 1,5ml adicione 50µl de *buffy coat* e 300µl de tampão de extração SEB e 10µl de Proteinase K (20mg/ml).
- Homogeneize em vórtex e leve ao banho-maria por 12 horas a 65°C.
- Adicione ao microtubo 300µl de Clorofane, homogeneize em vórtex e centrifugue por 7 minutos a 12.000rpm (centrífuga Eppendorf 5415D).

- Recupere o sobrenadante e o transfira para um novo microtubo.
- Adicione 300µl de clorofórmio, homogeneize em vórtex e centrifugue por 7 minutos a 12.000rpm.
- Recupere o sobrenadante e o transfira para um novo microtubo.
- Adicione álcool isopropílico absoluto em volume equivalente ao volume da amostra e acetato de sódio (3M) em volume equivalente a 10% do volume recuperado.
- Homogeneize o conteúdo do microtubo por inversão e leve ao freezer (-20°C) por 1 hora.
- Centrifugue o microtubo por 10 minutos a 13.000rpm a 0°C (centrífuga Eppendorf 5415R).
- Descarte o sobrenadante e adicione ao microtubo 300µl de etanol 70%.
- Homogeneize em vórtex e centrifugue por 2 minutos a 13.000rpm a 4°C.
- Descarte o sobrenadante e repita o último passo.
- Descarte o sobrenadante e leve o microtubo ao banho-seco por 1 hora a 65°C.
- Adicione 100µl de tampão TE para solubilização do DNA.
- Armazene em freezer à temperatura de -20°C.

## **Anexo F**

### **Protocolo de amplificação dos fragmentos dos genes KIR**





## Protocolo de PCR-SSP para amplificação dos fragmentos dos genes *KIR*

Esta técnica amplifica um fragmento de determinado gene de acordo com a especificidade do oligonucleotídeo iniciador utilizado (na tabela, referido como *primer*).

- Mantenha os reagentes e o microtubo de reação em suporte gelado durante toda a manipulação.
- Em um microtubo de 0,2ml, misture os reagentes indicados na tabela de acordo com o gene que se quer amplificar.

Mix para 1 amostra em µl)	2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DS2, 2DP1 <sup>a</sup>	3DS1 <sup>a</sup>	2DS4 <sup>a</sup>	2DL5 <sup>a</sup>	2DS3 <sup>a</sup>	2DS1 <sup>a</sup>	2DS5 <sup>b</sup>	3DL1 <sup>b</sup>
Água miliQ	7,46	7,35	7,85	8,46	8,55	7,35	7,35	7,44
3SA	-	-	-	-	-	-	0,20	-
INTP 10mM	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
Primer F 50mM	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Primer F' 50mM	-	0,20	-	-	-	0,20	-	0,20
Primer R 50mM	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Primer controle F 50mM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Primer controle R 50mM	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
ampão 10x	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Cloreto de magnésio 50mM	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
enzima Taq DNA polimerase 5U/µl	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
DNA 20µg/ml	4,00	4,00	4,00	4,00	4,50	4,00	4,00	4,00
total	15,00	15,00	15,30	16,00	16,50	15,00	15,00	15,00

<sup>a</sup> estas reações utilizam o programa 1 no termociclador.

<sup>b</sup> estas reações utilizam o programa 2 no termociclador.

A enzima utilizada neste trabalho foi a Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen™. Outras marcas não reproduziram o experimento de maneira satisfatória.

- Leve ao termociclador com o seguinte programa:

Etapa	Duração	Programa 1	Programa 2
		Temperatura	Temperatura
1. Desnaturação inicial	2 minutos	95°C	95°C
2. Desnaturação	10 segundos	94°C	94°C
3. Pareamento dos <i>primers</i>	10 segundos	65°C	63°C
4. Extensão	30 segundos	72°C	72°C
5. Volta para o passo 2 e repete 10 vezes			
6. Desnaturação	20 segundos	94°C	94°C
7. Pareamento dos <i>primers</i>	20 segundos	61°C	61°C
8. Extensão	30 segundos	72°C	72°C
9. Volta para o passo 6 e repete 5 vezes			
10. Extensão final	5 minutos	72°C	72°C

O termociclador utilizado neste trabalho foi Eppendorf™ Mastercycler.

## **Anexo G**

**Compilação de genes *KIR* previamente associados a doenças autoimunes, tipo de associação, número amostral, população estudada e oligonucleotídeos iniciadores utilizados**

**Compilação de genes *KIR* previamente associados a doenças autoimunes, tipo de associação, número amostral, população estudada e oligonucleotídeos iniciadores utilizados.**

Doença	Gene	Associação	Número amostral e população estudada	Iniciadores utilizados	Referência
Lúpus eritematoso sistêmico	<i>KIR2DS1</i> +/ <i>KIR2DS2</i> -	19% vs 14% $p = 0,04$	304 casos e 416 controles, população canadense	[1]	PELLET <i>et al.</i> , 2007
	<i>KIR2DS1</i>	OR 4,54, IC 95% 2,41 – 8,56, $p < 0,001$	93 casos e 123 controles, população chinesa	[1]	HOU <i>et al.</i> , 2010
	<i>KIR2DL2</i>	OR 6,68, IC 95% 3,37 – 13,24, $p < 0,001$			
Psoríase	<i>KIR2DS1</i>	OR: 1,47 IC 1,10 – 1,96, $p = 0,010$	396 casos e 372 controles, população sueca	[2]	HOLM <i>et al.</i> , 2005
	<i>KIR2DS1</i>	85% vs 51% $p < 0,0009$	116 casos e 123 controles, população polonesa	[1], [3], [4]	LUSZCZEK <i>et al.</i> , 2004
	<i>KIR2DS1</i>	45% vs 28% $p < 0,05$	96 casos e 50 controles, população japonesa	[3]	SUZUKI <i>et al.</i> , 2004
	<i>KIR2DL5</i>	48% vs 30% $p < 0,05$			
Artrite psoriática	<i>KIR2DS1</i> e/ou <i>KIR2DS2</i> sem o ligante correspondente	27% vs 15% $p = 1 \times 10^{-5}$	366 casos e 299 controles, população canadense	[1]	MARTIN <i>et al.</i> , 2002

Doença	Gene	Associação	Número amostral e população estudada	Iniciadores utilizados	Referência
Esclerose sistêmica	<i>KIR2DL2</i>	29% vs 65%, OR = 0,22, IC 95% 0,12 – 0,40, $p < 0,0001$	110 casos e 115 controles, população brasileira	[3]	SALIM <i>et al.</i> , 2010
	<i>KIR2DS2+2DL2-</i>	25,5% vs 1,7%, OR = 19,29, IC 95% 4,24 – 122,26, $p < 0,0001$			
Esclerodermia	<i>KIR2DS2+2DL2-</i>	12% vs 2%, $p = 0,005$	102 casos e 100 controles, população alemã	[5]	MOMOT <i>et al.</i> , 2004
Espondilite anquilosante	<i>KIR2DL5</i>	60% vs 43%, $p = 0,009$	150 casos e 119 controles, população chinesa	[6]	JIAO <i>et al.</i> , 2010
	<i>KIR2DL1</i>	97% vs 89%, $p = 0,012$			
Artrite reumatoide com vasculite	<i>KIR2DS2</i>	OR = 5,56, IC 95% 1,92 - 16,04, $p = 0,001$	30 casos e 76 controles, população norte-americana descendente da Europa ocidental	[5]	YEN <i>et al.</i> , 2001
Artrite reumatoide	<i>KIR2DS4</i>	74% vs 60%, OR = 1,9, IC 95% 1,1 – 3,4, $p < 0,001$	122 casos e 96 controles, população taiwanesa		YEN <i>et al.</i> , 2006
	<i>KIR2DL1</i>	80% vs 65%,			

Doença	Gene	Associação	Número amostral e população estudada	Iniciadores utilizados	Referência
		OR = 2,1, IC 95% 1,2 – 3,9, $p < 0,02$			
Diabetes tipo I	<i>KIR2DL1/HLAC2 + / KIR2DL2/HLADR3 –</i>	33% vs 67%, OR = 0,24, IC 95% 0,16 – 0,36, $p = 0,001$	248 casos e 250 controles, população brasileira	[3]	JOBIM <i>et al.</i> , 2010
	<i>KIR2DL1/HLAC2</i>	70,4% vs 55%, $p = 0,001$			
	<i>KIR2DS2/HLAC do grupo 1 (Asn<sup>80</sup>)</i>	49% vs 41%, $p = 0,030$	149 casos e 207 controles, população holandesa	[4], [5]	van der SLIK <i>et al.</i> , 2003

[1] MARTIN *et al.*, 2002; [2] HEWEET *et al.*, 2002; [3] GÓMEZ-LOZANO e VILCHES, 2002; [4] HSU *et al.*, 2002; [5] UHRBERG *et al.*, 1997; [6] JIAO *et al.*, 2008; (+) presença do gene; (-) ausência do gene