

AGRADECIMENTOS

Quero expressar o meu agradecimento ao Centro de Histocompatibilidade do Centro, na pessoa da Dr.^a Maria Luísa Pais, Directora do mesmo, pela recepção, apoio e disponibilidade mostrada para com a realização do presente trabalho.

À Professora Doutora Emília Duarte, orientadora desta tese, pelo apoio e disponibilidade na concretização da mesma.

Um agradecimento muito especial ao Dr. Paulo Santos, pois sem a sua amizade, apoio incondicional, ensinamentos e disponibilidade seria de todo impossível a realização deste trabalho.

À equipa de laboratório de Genómica Funcional, Dr.^a Isabel Velada, Dr.^a Sandrine Mendes, Dr.^a Susana Carmona e restantes colaboradores do laboratório por todo o apoio e carinho mostrado pelo presente trabalho.

Ao Dr António Martinho e sua equipa, responsável pelo Laboratório de Genética Molecular do Centro de Histocompatibilidade do Centro, pela sua colaboração e esclarecimentos prestados na realização de várias técnicas.

Aos amigos, que desde sempre me apoiaram e incentivaram a alcançar este objectivo.

Aos meus pais e familiares por todo o apoio, incentivo e carinho demonstrado ao longo desta etapa da minha vida.

Um agradecimento muito especial à minha mulher e filho, sem o apoio destes nada seria possível.

O meu muito obrigado.

ÍNDICE

I - LISTAGEM DE FIGURAS	v
II - LISTAGEM DE TABELAS.....	vii
III - LISTAGEM DE ABREVIATURAS	viii
IV – RESUMO	x
V – ABSTRACT	xii
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Transplantação renal e terapêutica imunossupressora	2
1.2 – Infecção por Citomegalovírus em transplantação.....	4
1.3 - Células NK: um novo conhecimento da biologia da resposta imunológica	7
1.3.1 - Modelo “ <i>Missing self</i> ”	8
1.4 – Genética dos KIR.....	9
1.5 - KIR, HLA e infecção viral em transplantação renal	12
1.5.1 – KIR e HLA	12
1.5.2 – Aloreactividade e infecção viral.....	14
1.6 - Objectivos.....	16
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	17
2.1 - População Estudada.....	18
2.2 - Material Biológico.....	19
2.2.1 – Soro	19
2.2.2 – DNA genómico humano	19

2.2.2.1 - Análise de pureza e quantificação de DNA	20
2.2.3 - DNA Viral.....	21
2.3 - Metodologia Analítica	23
2.3.1 – Pesquisa de anticorpos anti Citomegalovírus.....	23
2.3.2 – Pesquisa e quantificação de DNA do Citomegalovírus	23
2.3.3 - Tipagem HLA dos loci A, B, Cw, DRB1 e DQB1 por PCR-SSO	25
2.3.3.1 - Amplificação do DNA	26
2.3.3.2 - Eletroforese em gel de agarose e interpretação dos resultados	26
2.3.3.3 - Hibridização	27
2.3.3.4 - Aquisição dos dados.....	28
2.3.4 - Tipagem KIR por PCR-rSSO	28
2.3.4.1 - Amplificação do DNA	29
2.3.4.2 – Hibridização	30
2.3.4.3 - Aquisição dos dados.....	31
2.4 – Estratégias estatísticas para análise de dados.....	31
3 – RESULTADOS	32
3.1 - Pureza e concentração das amostras de DNA genómico humano.....	33
3.2 - Tipagem KIR	33
3.2.1. - Genótipos KIR	34
3.2.2 - Haplótipos KIR	37
3.2.3 - KIR activadores	38
3.2.4 - Genes KIR.....	39

3.3 - Tipagem HLA.....	40
3.4 – Genes KIR e respectivos ligandos	41
3.5 – Genes KIR e respectivos ligandos na infecção por Citomegalovírus	43
4 – DISCUSSÃO	45
4.1 Genes KIR e doença.....	46
4.2 <i>Framework genes</i>	47
4.3 Caracterização dos genótipos KIR na população do estudo	48
4.4 Influência da alorreactividade das células NK na infecção por Citomegalovírus em transplantação renal.....	49
4.5 Perspectivas futuras	51
5 – CONCLUSÃO.....	52
6 – REFERÊNCIAS	54

I - LISTAGEM DE FIGURAS

- Figura 1** - Principais genes existentes no Complexo Major de Histocompatibilidade e sua localização no cromossoma 6. 3
- Figura 2** - Relações entre as células NK e células-alvo, de acordo com a presença ou ausência do ligando HLA. HLA = *Human Leucocyte Antigen*; KIR= *Killer Immunoglobulin-like Receptor*; NK= *Natural Killer*. 8
- Figura 3** - Localização dos genes KIR no *Leucocyte Receptor Complex* que se situa no cromossoma 19q13.4. 9
- Figura 4** - Modelo de receptores KIR inseridos na membrana celular10
- Figura 5** - Genes KIR: haplótipos A e B. A azul estão representados os *framework* genes, a vermelho os genes KIR inibidores, a verde os genes KIR activadores e a amarelo os pseudogenes. 11
- Figura 6** - Frequência dos genes KIR analisados na população do estudo. Os genes estão apresentados de acordo com a ordem pela qual estão posicionados no cromossoma 19q13.4. A verde escuro e azul escuro (pseudogene) encontram-se os *Framework genes*, a verde claro os KIR inibidores, a rosa os KIR activadores e azul claro outro pseudogene KIR. 34

Figura 7 - Genótipos obtidos pela tipagem dos genes KIR. A verde escuro e azul escuro (pseudogene) encontram-se os *Framework genes*, a verde claro os KIR inibidores, a rosa os KIR activadores e azul claro outro pseudogene KIR. 36

Figura 8 - Frequência na população estudada de indivíduos com KIR2DS4 e outros KIR activadores e indivíduos com apenas um KIR activador (2DS4). 37

II - LISTAGEM DE TABELAS

Tabela I - Receptores KIR, natureza inibidora ou activadora da sinalização e respectivos ligandos.....	14
Tabela II - Pureza e concentração das amostras de DNA genómico humano.....	33
Tabela III - Distribuição dos haplótipos KIR nos diferentes grupos de pares dador/receptor de acordo com o perfil serológico CMV.....	38
Tabela IV - Distribuição do número de KIR activadores nos diferentes grupos de pares dador/receptor de acordo com o perfil serológico CMV.....	39
Tabela V - Distribuição dos genes KIR nos diferentes grupos de pares dador/receptor de acordo com o perfil serológico CMV.....	39
Tabela VI – Distribuição dos ligandos KIR nos diferentes grupos de pares dador/receptor de acordo com o perfil serológico CMV.....	41
Tabela VII - Distribuição dos genes KIR em função da presença ou ausência dos respectivos ligandos nos diferentes grupos de pares dador/receptor de acordo com o perfil serológico CMV.....	42
Tabela VIII - Distribuição dos genes KIR em função da presença ou ausência dos respectivos ligandos nos diferentes grupos de pares dador/receptor de acordo com a infecção por CMV.....	44

III - LISTAGEM DE ABREVIATURAS

"D"	Domínio
"L"	Longo
"P"	Pseudogene
"S"	Curto
ALG	<i>Anti-lymphocyte Globulin</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
ATG	<i>Anti-thymocyte Globulin</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i> expresso na superfície dos linfócitos T
CMV	Citomegalovírus
DO	Densidade óptica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DS	Solução de diluição
EDTA K ₃	Ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico
gl	Graus de liberdade
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	<i>Human Leucocyte Antigens</i>
IL	Interleucina
ITIM	<i>Immune Receptor Tyrosine-Based Inhibitory Motifs</i>
KIR	<i>Killer Immunoglobulin-like Receptors</i>
MEIA	<i>Microparticle Enzyme Immunoassay</i>
MHC	Complexo Major de Histocompatibilidade
MIEA	<i>Major immediate early antigen</i>

NK	<i>Natural Killer</i>
ns	Não significativo
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-rSSO	<i>Polymerase Chain Reaction – reverse Sequence-Specific Oligonucleotides</i>
PCR-SSO	<i>Polymerase Chain Reaction –Sequence-Specific Oligonucleotides</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SA-PE	Estreptavidina conjugada a R-Ficoeritrina
TE	Tampão Tris-EDTA
ts	Tendencialmente significativo
UTR	<i>Untranslated region</i>
UV	Ultravioleta
X ²	Qui-Quadrado

IV – RESUMO

As infecções virais são uma das complicações mais comuns em transplantação de órgãos sólidos, contribuindo para a rejeição do aloenxerto e sendo uma das causas mais significativas de morbidade e mortalidade pós-transplante. O Citomegalovírus (CMV) infecta mais de 70% da população mundial permanecendo em estado latente com reactivações intermitentes, causando doença severa ou fatal em pacientes imunocomprometidos. As células *Natural Killer* (NK) integram o sistema imune inato, sendo este essencial para limitar ou erradicar os vírus na sua fase de infecção ou numa infecção primária, fazendo parte da primeira linha de defesa contra agentes patogénicos e células transformadas, lisando as células alvo sem pré-sensibilização. Estas células são reguladas através da interacção com as moléculas do Complexo Major Histocompatibilidade (MHC) classe I pela ligação entre estas e os *Killer Immunoglobulin-like Receptors* (KIR) expressos na superfície das NK.

A hipótese testada foi relacionar os genótipos KIR e HLA com a infecção por CMV, numa população de primeiros transplantados renais, tendo como hipótese que a ausência do ligando HLA para o respectivo KIR inibidor (falta do ligando KIR) e/ou presença de vários KIR activadores, poderá proteger os transplantados da infecção por CMV. A população deste estudo foi constituída por 68 pacientes e respectivos dadores, sujeitos a primeiros transplantes renais.

A pesquisa de anticorpos anti-CMV foi efectuada por MEIA e a carga viral por PCR em Tempo Real. Os pares dador-receptor, foram tipados para os genes do Complexo Major de Histocompatibilidade e KIR por PCR-SSO e por PCR-rSSO respectivamente.

Os pacientes foram distribuídos pelos seguintes grupos: D⁺R⁺ (n=53), D⁺R⁻ (n=9), D⁻R⁺ (n= 3) e D⁻R⁻ (n= 3). Foram detectados 34 genótipos diferentes para os KIR na população. Verificámos que relativamente aos KIR inibidores, na população para todos os grupos (D⁺R⁺, D⁺R⁻, D⁻R⁺ e D⁻R⁻), estão em maior frequência com respectivo ligando do que na ausência deste já os KIR activadores, os KIR 2DS1, 2DS2 e 3DS1 para os diferentes perfis apresentaram maior frequência com o respectivo ligando, excepção para o KIR2DS4 sendo o único a ter apresentado maior frequência com ausência do respectivo ligando. Neste estudo demonstrámos que a ausência dos ligandos para KIR inibidores poderá favorecer, de uma forma global, a eliminação do CMV nos 12 meses subsequentes ao transplante, o que se verificou nos KIR 2DL2, 2DL3 e 3DL1. Ao mesmo tempo estes resultados sugerem o papel dos KIR inibidores e o impacto que estes poderão ter na infecção por CMV em transplantação renal. Além da tipagem HLA de rotina, a genotipagem KIR poderá ajudar no diagnóstico e prognóstico da infecção viral em transplantados renais.

O presente trabalho faz parte de uma colaboração internacional do Laboratório de Genómica Funcional (Responsável: Paulo Santos) do Centro de Histocompatibilidade do Centro, com duas equipas dos Estados Unidos da América e uma do Canadá: *Medhat Askar, Allogen Laboratories Transplant Center, Cleveland Clinic, Department of Surgery Cleveland; Dadhania Darshana, The Rogosin Institute, Immunogenetics & Transplantation Laboratory, New York* e *Ahmed Shoker, Saskatchewan Transplant Program, Division of Nephrology, Royal University Hospital, Saskatoon.*

Palavras-Chave: Transplante renal, Células NK, Infecção viral, Citomegalovírus, KIR, HLA, Aloreactividade.

V – ABSTRACT

Viral infections are one of the most common complications in solid organ transplantation, contributing to allograft rejection and being one of the most significant causes of morbidity and mortality after transplantation. Cytomegalovirus (CMV) infects more than 70% of the world population, the virus stays alive having intermittent reactivations, causing severe or fatal disease in patients immunocompromised. Natural Killer cells (NK) make part of the innate immune system, being essential to limit or eradicate the viruses during the infection or in a primary infection; they are on the first line of defense against pathogenic agents and transformed cells and lysis the target cells without a primary sensibilisation. These cells work in interaction with the class I MHC molecules, through the connection between these and the Killer Immunoglobulin-like Receptors (KIR) on the surface of NK cell.

The tested hypothesis was to relate KIR and HLA genotypes with CMV infection in kidney transplanted patients. The lack of HLA to the inhibitory KIR and/or the presence of several activating KIR can protect from infection by CMV.

The study population consisted of 68 patients and their donors, subject to first kidney transplants. The detection of anti-CMV was performed by MEIA and viral load by Real-Time PCR. The donor-recipient pairs were typed for the genes of the Major Histocompatibility Complex and KIR by PCR-SSO and PCR-RSSO respectively. The patients were divided into the following groups: D^+R^+ (n=53), D^+R^- (n=9), D^-R^+ (n= 3) and D^-R^- (n= 3). We detected 34 different genotypes for KIR in the population. We found that KIR inhibitory in the population for all groups (D^+R^+ , D^+R^- , D^-R^+ and D^-R^-), are more often with is ligand than in the absence, for KIR activators the KIR 2DS1, 2DS2 and 3DS1 for the different profiles presented were more frequently with their

ligand, except for KIR2DS4 is the only one that presented more often with the absence of its ligand. We demonstrated that absence of ligands to inhibitory KIR can, in a global way, favor the elimination of CMV in the first 12 months after the transplant, what could be seen in KIR2DL2, 2DL3 and 3DL1. Taken together, these results suggest a role of inhibitory KIR in infection by CMV after kidney transplantation. Besides routine HLA typing, genotyping KIR may help diagnose and make a prognosis of viral infection in kidney transplanted patients.

This work is part of an international collaboration of the Laboratório de Genômica Funcional (Responsible: Paulo Santos) from Centro de Histocompatibilidade do Centro, with two research teams from the United States of América and one from Canada: Medhat Askar, Allogen Laboratories Transplant Center, Cleveland Clinic, Department of Surgery Cleveland; Dadhania Darshana, The Rogosin Institute, Immunogenetics & Transplantation Laboratory, New York and Ahmed Shoker, Saskatchewan Transplant Program, Division of Nephrology, Royal University Hospital, Saskatoon.

Keywords: Kidney transplantation, Natural Killer cells, Viral infection, Cytomegalovirus, KIR, HLA, Alloreactivity.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Transplantação renal e terapêutica imunossupressora

A rejeição é a principal causa para a perda do aloenxerto renal. Caso o dano causado aos túbulos e glomérulos seja severo, o rim poderá não recuperar. Assim sendo, é importante diagnosticar o episódio de rejeição o mais cedo possível e rapidamente instituir a terapia anti-rejeição. Por norma, o sucesso da reversão da rejeição através do uso de agentes imunossupressores determina o sucesso a longo termo do transplante (Terasaki, Cecka *et al.* 1996; Chan Laurence 1997).

A rejeição é uma resposta do organismo ao aloenxerto, sendo um processo complexo e redundante. O alvo principal desta resposta são os antígenos do Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC), designados por *Human Leucocyte Antigens* (HLA) (Chan Laurence 1997). Estes são codificados num *cluster* de genes densamente polimórficos, localizado no braço curto do cromossoma 6 (Figura 1). As moléculas HLA classe I são codificadas por três *loci* génicos distintos, conhecidos como HLA-A, B e C presentes na região classe I do MHC. As moléculas classe II incluem HLA-DR, DQ e DP e cada uma delas é codificada por *loci* genéticos distintos presentes na região classe II (Terasaki, Cecka *et al.* 1996; Trowsdale 2001).

A rejeição ocorre quando os linfócitos T reconhecem os antígenos “*non self*”, isto acontece apenas quando o antígeno ou o peptídeo imunogénico está associado a uma molécula HLA na superfície de uma célula apresentadora de antígenos (APC). Os linfócitos T auxiliares (CD4) são então activados, proliferam, diferenciam-se e segregam uma variedade de citocinas. Estas conduzem a um aumento da expressão dos antígenos HLA classe II nos tecidos transplantados, estimulando então os linfócitos B a

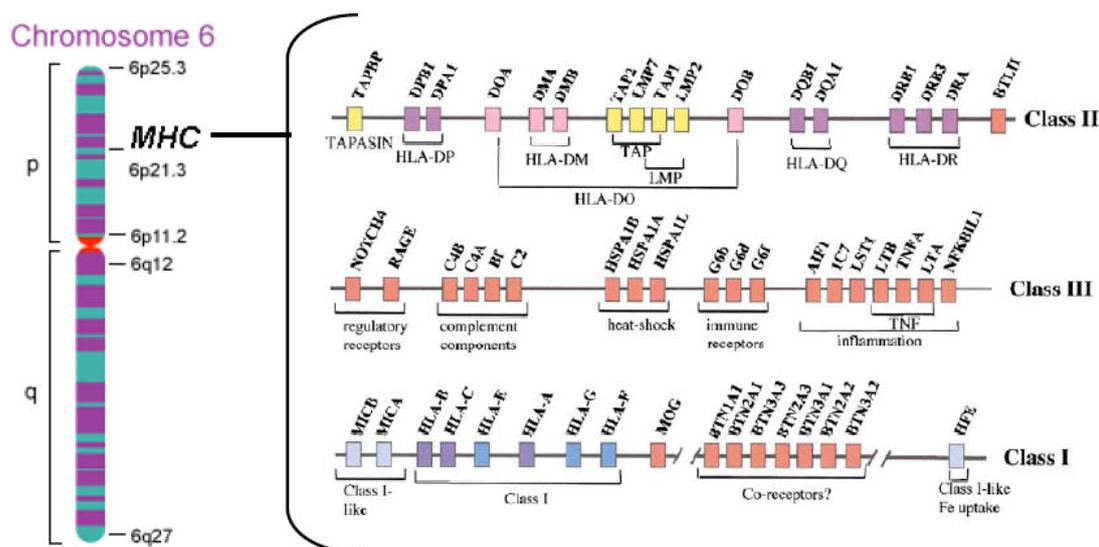


Figura 1 - Principais genes existentes no Complexo Major de Histocompatibilidade e sua localização no cromossoma 6 (adaptado de Trowsdale 2001).

produzir anticorpos contra o aloenxerto, em conjunto com a activação dos linfócitos T citotóxicos, macrófagos e células *Natural Killer* (NK), coadjuvando a citotoxicidade contra o aloenxerto (Shaikewitz and Chan 1994; Kelley and Trowsdale 2005).

O episódio de rejeição aguda pode ocorrer entre o 5º e o 7º dia pós-transplante, mas normalmente dá-se entre a 1ª e 4ª semana subsequentes. O episódio clássico de rejeição aguda da nova era (azatioprina-prednisolona) apresenta o seguinte quadro: tumefacção do rim e oligúria associada a um aumento da creatinina, acompanhada por febre (Shaikewitz and Chan 1994; Chan Laurence 1997).

A rejeição crónica ocorre num período de tempo que poderá ir de meses a anos, sendo actualmente um dos maiores problemas em transplantação, pois parece corresponder a uma ausência de resposta ao tratamento. Pensa-se que a rejeição crónica seja o resultado de episódios de rejeição aguda repetidos e não controlados, ou um processo inflamatório lento e progressivo, que poderá instalar-se logo nas primeiras

semanas após o transplante ou em qualquer momento posterior (Shaikewitz and Chan 1994).

Hoje em dia, o protocolo padronizado para imunossupressão em transplantados renais consiste numa terapia de base para prevenir a rejeição (imunossupressores gerais) e se necessário, doses elevadas de metilprednizolona, anticorpos monoclonais ou policlonais - globulina anti-linfócito (ALG) e globulina anti-timócito (ATG).

Os fármacos imunossupressores que interferem com a rejeição do aloenxerto actuam em diferentes locais da resposta imune, sendo mais comumente utilizados: os Glucocorticóides; Ciclosporina e Tacrolimus (FK506); Azatioprina e Micofenolato de Mofetil (Sollinger 1995; Tibbles 2008).

Os glucocorticóides inibem a libertação de interleucina (IL) -1 por parte dos macrófagos. A ciclosporina e o tacrolimus (FK506) interferem com a IL-2 produzida pelos linfócitos T auxiliares, e a azatioprina e micofenolato de mofetil previnem a proliferação dos linfócitos T citotóxicos e auxiliares (Jordan, Shapiro *et al.* 1994; Woodle, Thistlethwaite *et al.* 1996; Jordan, Naraghi *et al.* 1997).

Com a introdução de regimes imunossupressores mais potentes em transplantação, como os anteriormente mencionados, o aumento do risco de doenças infecciosas acompanha a diminuição do risco de rejeição aguda (Tibbles 2008).

1.2 – Infecção por Citomegalovírus em transplantação

O Citomegalovírus (CMV) é um β -herpesvirus, apresentando um genoma constituído por ácido desoxirribonucleico (DNA), com 235-kb, que codifica 59 proteínas virais. Este vírus infecta mais de 70% da população mundial independentemente do género ou localização geográfica. Após infecção primária, o

vírus permanece em estado latente com reactivações intermitentes. Uma vez que o nosso sistema imunitário está em constante vigilância sob os vírus, geralmente as infecções são assintomáticas em indivíduos imunocompetentes, causando doença severa ou fatal em pacientes imunocomprometidos (Webb, Lee et al. 2002; Hadaya, de Rham et al. 2008; Tibbles 2008).

Adicionalmente, o CMV é a principal causa de infecção viral congénita em seres humanos, com uma incidência de 0,2-2,2% entre os nados-vivos. Destes cerca de 10 % apresentará malformações congénitas, tais como perda de audição ou atraso mental (Webb, Lee *et al.* 2002).

A infecção por CMV é uma das complicações virais mais comuns na transplantação de células hematopoéticas e órgãos sólidos, sendo uma das causas mais significativas de morbidade e mortalidade pós-transplante. Mais de 50 % dos receptores de órgãos sólidos apresentam evidência laboratorial de infecção primária ou re-infecção por CMV no primeiro ano pós-transplante. Para além disto, existe evidência indirecta que a infecção por CMV é, por si só, um factor de risco independente para a rejeição aguda ou crónica do aloenxerto (Hodson, Jones et al. 2005; Nemat, Eizadi et al. 2007).

O CMV poderá produzir uma interleucina viral 10 – um regulador negativo do sistema imune – podendo ainda o vírus causar a activação do sistema imune e aloimunização, o que poderá levar a rejeição crónica do órgão transplantado (Tibbles 2008).

A apresentação clínica da infecção por CMV em pacientes transplantados envolve três fases, numa primeira fase a reactivação da infecção por CMV, ou seja, a presença do CMV na corrente sanguínea, a qual poderá ser assintomática e apenas revelada em testes de rotina, seguida de um síndrome por CMV, caracterizado por uma

infecção sistémica com febre e mal-estar e finalmente a doença invasiva por CMV, podendo causar gastroenterite, pneumonia, retinite, nefrite e miocardite. Além dos efeitos directos da doença por CMV, existem ainda os efeitos indirectos, como a imunomodulação e a evasão ao sistema imune causando um aumento da morbidade (Hadaya, de Rham *et al.* 2008).

As sequelas clínicas da infecção por CMV dividem-se entre efeitos directos da replicação viral (febre, leucopenia e trombocitopenia com ou sem disfunção de um órgão específico) e efeitos indirectos resultado da influência do vírus no sistema imune, do hospedeiro. Os efeitos indirectos incluem rejeição aguda do órgão transplantado, redução da função do órgão a longo prazo e aumento do risco de infecções oportunistas (Duncan, Grgurich *et al.* 1994; George, Snyderman *et al.* 1997; Waiser, Budde *et al.* 1998; Schnitzler, Lowell *et al.* 2003; Hodson, Jones *et al.* 2005).

Os grupos de risco para CMV incluem os pacientes negativos para CMV e que recebem um órgão sólido (rim) de um dador positivo para CMV (D^+R^- , nova infecção) e aqueles que foram previamente infectados (D^+ , reactivação) (Tibbles 2008).

Os regimes de prevenção da doença por CMV incluem a profilaxia nos grupos de risco, despiste de reactivações e o tratamento preventivo, sendo os fármacos utilizados mais comumente para a terapia profilática: o ganciclovir, o valaciclovir e o aciclovir (Hodson, Jones *et al.* 2005; Tibbles 2008).

Antes da introdução da terapia profilática, a doença por CMV ocorria em 7 a 32% dos receptores de órgão sólidos, sendo o risco mais baixo em transplantados renais comparativamente com os transplantados com pulmão-coração (Hodson, Jones *et al.* 2005).

1.3 - Células NK: um novo conhecimento da biologia da resposta imunológica

As células NK fazem parte da primeira linha de defesa contra agentes patogénicos e células transformadas (Borrego, Kabat *et al.* 2002). Estas células são definidas como um sub-tipo de linfócitos $CD3^-$, $CD16^+$, $CD56^+$. As células NK representam 10 a 20% das células mononucleares do sangue periférico e lisam as células alvo sem pré-sensibilização (Alter, Malenfant *et al.* 2004; Vilches and Parham 2006; Rajalingam 2007). As células NK fazem parte do sistema imune inato, sendo este essencial para limitar ou erradicar os vírus na fase inicial de infecção ou numa infecção primária (Vilches and Parham 2006).

As células NK são reguladas através da interacção com as moléculas do MHC classe I, pela ligação entre estas e os receptores inibidores expressos na superfície das NK, como ilustra a Figura 2 (Moretta and Moretta 2004; Gardiner 2008; Jobim and Jobim 2008).

Pensa-se que esse mecanismo protege as células “saudáveis” da lise pelas NK autólogas, enquanto que nas células nas quais ocorreu uma alteração na expressão das moléculas MHC, devido à infecção viral ou transformação tumoral, são lisadas (Uhrberg, Valiante *et al.* 1997; Moretta and Moretta 2004; Gardiner 2008; Jobim and Jobim 2008).

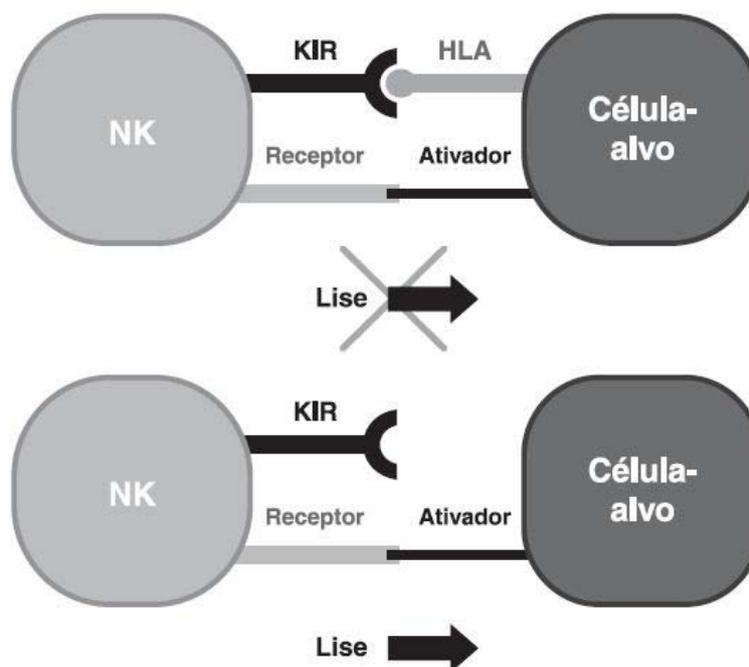


Figura 2 - Relações entre as células NK e células-alvo, de acordo com a presença ou ausência do ligando HLA. HLA = *Human Leucocyte Antigen*; KIR= *Killer Immunoglobulin-like Receptor*; NK= *Natural Killer* (adaptado de Jobim and Jobim 2008).

1.3.1 - Modelo “*Missing self*”

O modelo mais comumente aceite postula que a activação das células NK é controlada através do equilíbrio entre os sinais activadores e inibidores. Em condições normais, a activação dos KIR é suprimida pela dominância dos sinais inibidores. Deste modo, a activação das células NK pode acontecer como resultado de uma diminuição dos sinais inibidores, ou de um aumento dos sinais activadores. Durante a transformação celular, a alteração da expressão do MHC pode provocar a activação das células NK, que anteriormente não actuavam devido aos sinais inibidores. A teoria do “*missing-self*” advoga que as células NK vigiam as células verificando a normal expressão das moléculas MHC classe I, tolerando o *self* (Karre, Ljunggren et al. 1986). Quando esta expressão é alterada, devido a infecção viral ou transformação tumoral, as

células NK são activadas e lisam as células em causa (Trowsdale 2001; Vilches and Parham 2002; Kunert, Seiler *et al.* 2007).

1.4 – Genética dos KIR

Os KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptors) pertencem a uma família multigénica e altamente polimórfica com 16 genes diferentes (que codificam os KIR) e que se situam no cromossoma 19q13.47 (Robinson and Marsh 2007), como ilustra a Figura 3. Estes genes podem conter informação para a expressão de dois ou três domínios extracelulares do tipo imunoglobulina, locais de ligação dos determinantes polimórficos do sistema HLA-A, B e C. A cauda citoplasmática pode ser longa ou curta, estando esta envolvida na transdução do sinal (Borrego, Kabat *et al.* 2002).

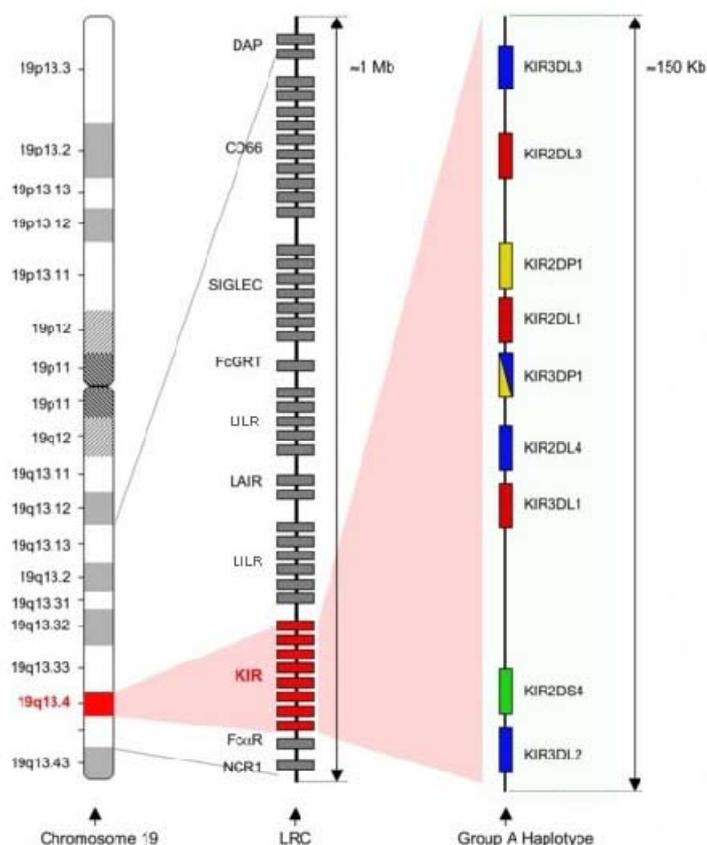


Figura 3 - Localização dos genes KIR no *Leucocyte Receptor Complex* que se situa no cromossoma 19q13.4 (adaptado de Robinson and Marsh 2007).

A nomenclatura adoptada para os KIR é a seguinte: o primeiro número refere-se ao número de domínios do tipo imunoglobulina presentes é o “D” ao “domínio”. O “D” é seguido por “L” no caso de ser de cauda citoplasmática longa e por “S” no caso de ser de cauda citoplasmática curta, e por “P” para pseudogenes. O número final indica o número do gene que codifica a proteína, por exemplo o KIR2DL4 como ilustra a Figura 4 (Uhrberg, Valiante *et al.* 1997; Borrego, Kabat *et al.* 2002; Moretta and Moretta 2004; Jobim and Jobim 2008).

Os KIR de cauda longa incluem um ou dois motivos *Immune Receptor Tyrosine-Based Inhibitory Motifs* (ITIM), enquanto que os KIR de cauda curta não possuem ITIM, mas sim um aminoácido positivamente carregado na porção transmembranar que permite associação com a molécula acessória, DAP- 12, libertando um sinal activador por intermédio de *Immune receptor tyrosine-based activator receptor* (ITAM) (Gardiner 2008; Jobim and Jobim 2008).

Existem dois grupos de haplótipos KIR com maior frequência nas populações estudadas. O haplótipo mais frequente é o haplótipo A que apresenta um número fixo de 9 genes (6 KIR inibidores, 1 KIR activador e 2 pseudogenes); o outro haplótipo B apresenta um maior número de KIR activadores.

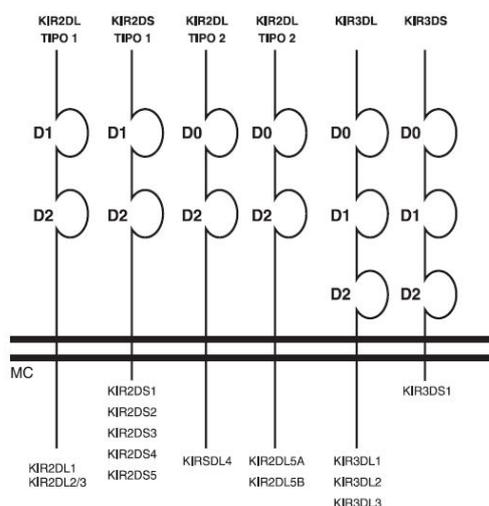


Figura 4 - Modelo de receptores KIR inseridos na membrana celular (adaptado de Jobim and Jobim 2008).

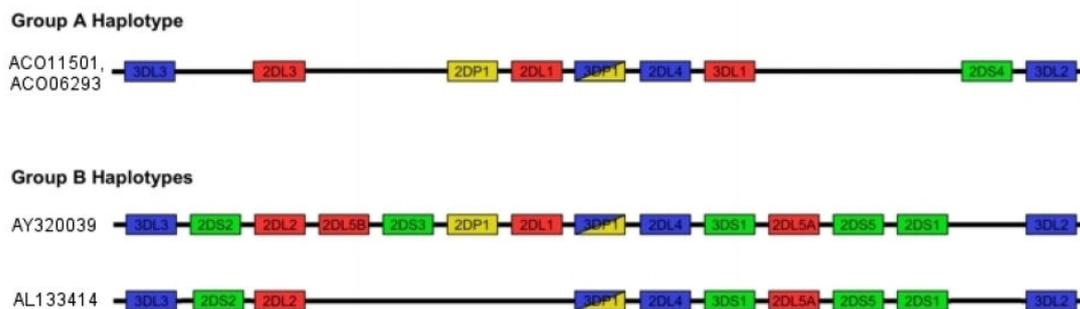


Figura 5 - Genes KIR: haplótipos A e B. A azul estão representados os *framework* genes, a vermelho os genes KIR inibidores, a verde os genes KIR activadores e a amarelo os pseudogenes (adaptado Robinson and Marsh 2007).

A Figura 5 ilustra uma representação de haplótipos do grupo A e grupo B (Uhrberg, Valiante *et al.* 1997; Borrego, Kabat *et al.* 2002; Vilches and Parham 2006; Robinson and Marsh 2007; Gardiner 2008). Apesar dos haplótipos KIR variarem no número e tipo de genes presentes, os KIR3DL3, 3DP1, 2DL4 e 3DL2 estão virtualmente presentes em todos os haplótipos e por isso foram denominados *framework genes* (Uhrberg, Valiante *et al.* 1997; Wilson, Torkar *et al.* 2000).

O comprimento da sequência genómica de cada um destes genes varia entre 4 e 16 Kb e pode conter quatro a nove exões. Os exões 1 e 2 codificam o peptídeo líder e os primeiros dois aminoácidos do polipeptídeo maduro; os exões 3, 4 e 5 codificam domínios do tipo imunoglobulina designados por D0, D1 e D2, respectivamente (Hsu, Chida *et al.* 2002; Vilches and Parham 2002; Gardiner 2008). O exão 6 codifica um polipeptídeo que liga o domínio extracelular D2 à região transmembranar codificada pelo exão 7 e, finalmente, os exões 8 e 9 codificam o prolongamento citoplasmático dos receptores.

Assim, e de acordo com as suas características estruturais, os genes KIR podem ser classificados da seguinte forma:

- Genes KIR2D Tipo I, que codificam proteínas com dois domínios extracelulares do tipo imunoglobulina (Ig) com conformações D1 e D2, onde se incluem os genes KIR2DS1-5, KIR2DL1-3 e o pseudogene KIR2DP1;
- Genes KIR2D Tipo II, que codificam proteínas com dois domínios extracelulares com conformações D0 e D2, onde se incluem os genes KIR2DL4, KIR2DL5A e B;
- Genes KIR3D, que codificam proteínas com os três domínios extracelulares, onde se incluem os genes KIR3DL1-3, KIR3DS1 e KIR3DP1 (Trowsdale 2001; Hsu, Chida *et al.* 2002; Schellekens, Rozemuller *et al.* 2008).

1.5 - KIR, HLA e infecção viral em transplantação renal

1.5.1 – KIR e HLA

As células NK apresentam funções efectoras de citotoxicidade e produção de citocinas. Estas células são reguladas por um conjunto integrado de sinais regulados; receptores inibidores ou activadores. Os KIR presentes nas células NK e os seus respectivos ligandos, as moléculas de HLA classe I, fazem parte deste conjunto de sinais e respectiva regulação (Passweg, Huard *et al.* 2007).

O *cluster* dos genes KIR e os *loci* dos HLA classe I são altamente polimórficos, o que originou a hipótese das células NK responderem em certa medida de forma geneticamente pré determinada. Esta opinião é corroborada por recentes observações epidemiológicas em que certos genótipos dos KIR/HLA com perfil activador (ou seja, presença de um maior número de KIR activadores, ou ausência de KIR inibidores, ou

dos seus respectivos ligandos) estão associados com a resistência ao Vírus da Hepatite C (HCV) e à infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), com progressão mais lenta na doença por HIV (Passweg, Huard *et al.* 2007). Por outro lado, o perfil com maior número de KIR ativadores pode aumentar o risco para doenças autoimunes, como a psoríase/artrite psoriática, diabetes tipo I, e esclerodermia (Passweg, Huard *et al.* 2007).

Alguns estudos associam o *locus* do gene HLA-C com o receptor KIR2DL. O alelo HLA-C contém dimorfismos funcionais que determinam a especificidade deste ligando para os KIR. Os alelos do grupo 1 de HLA-C (*HLA-C1*) codificam Ser77/Asp80 no domínio HLA-Cw α 1, que ligam ao receptor KIR2DL2 e KIR2DL3 e provavelmente ao KIR2DS2 ativador. Em contraste com os alelos HLA-C grupo 2 (*HLA-C2*) que codificam Asp77/Lys80 e que ligam o KIR2DL1 e possivelmente KIR2DS1 (Ahlenstiel, Martin *et al.* 2008).

Os genótipos KIR/HLA contribuem para uma susceptibilidade ou resistência para uma grande variedade de doenças infecciosas e para o cancro. Homozigotia para *HLA-C1* e *KIR2DL3* poderá ser vantajoso em relação às infecções virais, sendo prejudicial para a inflamação crónica, que tem um papel fundamental na carcinogénese (Colonna, Borsellino *et al.* 1993; Wagtmann, Rajagopalan *et al.* 1995).

O processo normal de desenvolvimento das células NK garante que as células em circulação tolerem as células autólogas saudáveis devido à interacção dos seus receptores inibidores com os ligando HLA classe I autólogo. Assim, as alorreacções das células NK são dirigidas para células alogénicas que não têm as moléculas *self*-HLA classe I (Valiante, Uhrberg *et al.* 1997).

Tabela I - Receptores KIR, natureza inibidora ou activadora da sinalização e respectivos ligandos (adaptado de Uhrberg, Valiante *et al.* 1997).

KIR gene	Sinal	Ligando
2DL1	Inibidor	HLA-C2
2DL3 (incluindo 2 DL2)	Inibidor	HLA-C1
2DL4	Activador	HLA-G
2DL5	Inibidor	Desconhecido
3DL1	Inibidor	HLA-Bw4
3DL2	Inibidor	HLA-A3, A11
2DS1	Activador	HLA-C2
2DS2	Activador	HLA-C1
2DS3	Activador	Desconhecido
2DS4	Activador	HLA-Cw4
2DS5	Activador	HLA-Bw4?
3DS1	Activador	HLA-Bw4
3DL3	Desconhecido	
2DP1, 3DP1	Não expresso	

1.5.2 – Aloreactividade e infecção viral

A aloreactividade por células NK é a consequência de um mecanismo natural, pelo qual estas células discriminam as células autólogas saudáveis das não saudáveis (Vilches and Parham 2006). Este mecanismo utiliza os receptores expressos nas células NK, os KIR, que apresentam diferentes especificidades para as moléculas MHC classe I e que por sua vez transmitem sinais inibidores às células NK. Estes sinais representam um mecanismo de tolerância, prevenindo a lise das células autólogas que expressem quantidades normais de MHC classe I (Vilches and Parham 2006; Rajalingam 2007).

Na ausência ou diminuição da expressão do respectivo ligando para os KIR na célula autóloga, a informação transmitida à célula NK é para destruir essa célula. Esta ausência do ligando pode ser a consequência de transformação tumoral ou infecção viral (Moretta and Moretta 2004; Vilches and Parham 2006).

A infecção viral em receptores de transplante de órgãos ocorre devido à presença do vírus no tecido transplantado e/ou à supressão das funções do sistema imune para prevenir a rejeição do transplante (Hirsch 2002). O transplante, a imunossupressão e os vírus, bem como o passado imunológico do receptor são factores qualitativos e quantitativos para a patogénese viral relativamente ao tempo, manifestação e prognóstico (Hirsch 2002).

1.6 - Objectivos

O objectivo deste estudo foi relacionar os genótipos KIR e HLA e a infecção por CMV, numa população de primeiros transplantados renais. Tendo como hipótese que a ausência do ligando HLA para o respectivo KIR inibidor (falta do ligando KIR) e/ou presença de vários KIR activadores, poderá proteger os transplantados da infecção por CMV.

O presente trabalho faz parte de uma colaboração internacional do Laboratório de Genómica Funcional (Responsável: Paulo Santos) do Centro de Histocompatibilidade do Centro, com duas equipas dos Estados Unidos da América e uma do Canadá: *Medhat Askar, Allogen Laboratories Transplant Center, Cleveland Clinic, Departement of Surgery Cleveland* ; *Dadhania Darshana, The Rogosin Institute, Immunogenetics & Transplantation Laboratory, New York* e *Ahmed Shoker, Saskatchewan Transplant Program, Division of Nephrology, Royal University Hospital, Saskatoon*.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - População Estudada

A população deste estudo foi constituída por um grupo de 68 pacientes e respectivos dadores, de ambos os sexos, sujeitos a primeiros transplantes renais na Unidade de Transplantação Renal dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC). Foram previamente estudados, em todos os pares dador-receptor, os genes do Complexo Major de Histocompatibilidade (HLA-A, -B, -Cw, DRB1 e DQB1) por técnicas de biologia molecular.

O grupo de pacientes estudados foi devidamente informado do objectivo do estudo a que iriam ser sujeitos aquando da recolha das amostras.

A amostra foi seleccionada de acordo com os pedidos consecutivos de análise viral no período pós-transplante

A componente laboratorial do estudo foi realizada nos Laboratórios de Genómica Funcional e de Genética do Centro de Histocompatibilidade do Centro.

Dos pacientes transplantados renais, 72,1% (n=49) eram do sexo masculino e 27,9% (n=19) do sexo feminino. A média de idades da população estudada no momento do transplante era de 48,4 anos \pm 12,3 (23-69 anos).

De acordo com o perfil serológico para CMV, os pacientes foram distribuídos pelos seguintes grupos: dador e receptor com anticorpos anti-CMV, D⁺R⁺ (77,9%; n=53); dador positivo e receptor negativo, D⁺R⁻ (13,2 %; n=9), dador negativo e receptor positivo, D⁻R⁺ (4,4%; n= 3) e dador e receptor negativos, D⁻R⁻ (4,4%; n= 3).

Os pacientes estudados foram submetidos a um de três protocolos de imunossupressão: Ciclosporina (44,1%; n=30), Tacrolimus (53,0%; n=36) e Everolimus (2,9%; n=2).

2.2 - Material Biológico

2.2.1 – Soro

A amostra de soro a analisar foi obtida a partir de uma colheita de sangue em tubos de gel, após centrifugação a 3000 g durante 10 minutos (KUBOTA 5910, Tokyo, Japão).

2.2.2 – DNA genómico humano

As amostras de sangue periférico foram colhidas para tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico (EDTA K₃), com um volume aproximado de 6 ml de material biológico. Estas amostras, após recepção no Centro de Histocompatibilidade do Centro, foram registadas e armazenadas a 4°C até serem processadas.

A extracção de DNA foi realizada com o *Kit MagAttract DNA Blood M48* (Qiagen®, Hilden, Alemanha). A tecnologia MagAttract baseia-se na purificação de DNA através da sílica e partículas magnéticas, combinando eficiência e rapidez. O DNA liga-se à superfície da sílica existente nas partículas magnéticas, na presença de um sal caotrópico. O DNA ligado é então lavado eficientemente, usando dois tampões de lavagens cuja composição não é descrita pela empresa fornecedora, seguida de uma lavagem rápida com água destilada, a qual melhora consideravelmente a pureza do DNA. Finalmente o DNA é eluído com Tampão Tris-EDTA (Tampão TE) (10 mM Tris, 1 mM EDTA) e recolhido em tubos Eppendorf de 1,5 ml.

Para esta extracção foi utilizado o *BioRobot M48* (Qiagen®, Hilden, Alemanha), onde foram colocados 200 µl de sangue total. Todo o processo está perfeitamente

automatizado. O *BioRobot* adicionou o tampão de lise ML, em seguida juntou a Suspensão *MagAttract B*, o qual apresenta as partículas magnéticas com sílica onde se irá ligar o DNA, posteriormente realizaram-se duas lavagens com os seguintes tampões MW1 e MW2 respectivamente e uma lavagem rápida com água destilada. No final o DNA tal como mencionado anteriormente, foi eluído com Tampão TE. Após a extracção do DNA purificado, este pode ser conservado entre 2 a 8 °C por 24 horas ou a -20°C por períodos mais longos. No presente estudo as amostras após todo o processo acima referido foram conservadas a -20°C.

O rendimento de DNA purificado depende do tipo de amostra, número de células nucleadas presentes na amostra e do protocolo utilizado. Com este Kit esperou-se que para 200µl de sangue total contendo aproximadamente $4,5-7,7 \times 10^6$ Leucócitos/ml, se obtivesse entre 3,9 a 6,2 µg de DNA purificado.

2.2.2.1 - Análise de pureza e quantificação de DNA extraído

A concentração e o grau de pureza de uma solução com DNA (ausência de quantidades significativas de contaminantes) foi determinada através da medição da absorvância num espectrofotómetro. A leitura efectuada a 260 nm permitiu detectar a presença de bases purínicas e pirimídicas, sendo que, uma absorvância de 1 unidade a 260 nm corresponde a 50 µg de DNA por mililitro ($A_{260} = 1 \rightarrow 50 \mu\text{g} / \text{ml}$). A leitura efectuada a 280 nm permitiu detectar contaminantes. Assim sendo, o quociente entre a Densidade Óptica (DO) a 260 nm e 280 nm (DO_{260}/DO_{280}) forneceu uma estimativa da pureza do DNA, neste caso valores de razão próximos de 1,8 indicaram elevado grau de pureza. Valores de razão inferiores ou iguais a 1,6 são indicativos de contaminação com proteínas, e valores superiores ou iguais a 2 são indicativos de possível contaminação com RNA.

Para quantificar o DNA presente nas amostras utilizou-se o espectrofotômetro *GeneQuant pro* (Biochrom, Cambridge, Inglaterra) e usou-se como referência o Tampão TE. Numa *cuvette* de ultra-microvolume foram colocados 7 µl de amostra e com o software *Biochrom Data Capture* determinou-se o grau de pureza e as concentrações do DNA da mesma.

2.2.3 - DNA Viral

Utilizaram-se amostras de sangue periférico colhidas para tubos sem preparação com um volume aproximado de 10 ml de sangue e urina de volume variável. Após a colheita, essas amostras foram enviadas ao Laboratório de Genômica Funcional do Centro de Histocompatibilidade do Centro, onde as mesmas foram registradas e armazenadas a 4°C, até ter sido aplicado o protocolo.

Para separação do soro centrifugaram-se as amostras a 3000 g durante 10 minutos (KUBOTA 5910, Tokyo, Japão). No caso da urina, durante o processo de tratamento, foi registrado o volume recepcionado. Em câmara de fluxo laminar a amostra foi transferida para tubos de Sorval e centrifugada durante 15 minutos a 12987 g a uma temperatura de 4°C (Sigma 4K15, Osterode am Harz, Alemanha). No fim desta centrifugação desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 1 ml de Tampão fosfato-salino (Tampão PBS) (PBS: 0.01 M fosfato de sódio;. 0.145 M cloreto de sódio; pH 7.2). O passo seguinte foi centrifugar durante 7 minutos a 7500g e 4°C.(Eppendorf 5415R, Hamburg, Alemanha). Desprezou-se novamente o sobrenadante e ressuspendeu-se em 1 ml de tampão PBS.

De seguida ambas as amostras (soro e urina) foram conservadas a -20°C até realização da pesquisa e quantificação da carga viral.

O *QIAamp*[®] *UltraSens*[™] *Virus Kit* (*Qiagen*[®], Hilden, Alemanha) permitiu uma recuperação eficiente, rápida e altamente sensível de DNA viral em plasma ou soro e urina. A nova tecnologia *QIAamp* de *UltraSens* é um procedimento de extração e purificação que integra quatro passos: lise, ligação, lavagem e eluição, tendo sido usada para concentrar ácidos nucleicos virais, possibilitando a detecção de títulos virais muito baixos. Os contaminantes e inibidores enzimáticos foram eficientemente removidos pelo procedimento de purificação de *QIAamp*, este baseou-se na tecnologia de membrana-gel de sílica (não utiliza fenol, clorofórmio ou outros solventes orgânicos). O procedimento *UltraSens* de *QIAamp* possibilitou a inclusão de controlos internos nas amostras na etapa inicial, permitindo assim que o processo de extração e purificação fosse controlado com precisão.

Partindo de 1000 µl de amostra de plasma e/ou soro e urina, esta tecnologia permitiu que fossem concentrados antes da purificação em colunas de centrifugação com membranas sílica-gel. O tampão de lise AC contém um reagente que formou complexos com ácidos nucleicos, e estes puderam ser sedimentados a baixa velocidades de centrifugação para formar um sedimento. Em seguida, este foi ressuspensão num pequeno volume de tampão AC e o *carrier* de DNA foi então adicionado à amostra. Após uma pequena incubação, a amostra foi centrifugada a baixa velocidade para formar novo sedimento com os complexos de ácidos nucleicos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensão em Tampão AR que ajudou a dissolver o sedimento e aumentou a actividade da Proteinase K que foi previamente adicionada, de seguida incubou-se durante 10 minutos a 56°C. As condições de ligação são ajustadas adicionando tampão AB, o lisado foi transferido para uma coluna de rotação. Durante uma breve centrifugação, DNA ligou-se selectivamente à membrana, enquanto os contaminantes se depositaram no fundo da coluna. Os restantes contaminantes e

inibidores enzimáticos foram eficientemente removidos por centrifugação e duas lavagens, os ácidos nucleicos virais purificados foram eluídos com o tampão de eluição AVE de baixa concentração salina. A composição de todos os tampões acima mencionados não é descrita pela empresa fornecedora.

Todo o procedimento acima mencionado foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante.

Após extracção e purificação o DNA viral foi conservado a -20°C.

2.3 - Metodologia Analítica

2.3.1 – Pesquisa de anticorpos anti Citomegalovírus

A pesquisa dos anticorpos anti-vírus CMV IgG foi realizada pela técnica MEIA (*Microparticle Enzyme Immunoassay*) no equipamento *Asxym*® (Abbott, Illinois, Estados Unidos). O equipamento foi sujeito a manutenção executada pela casa comercial e foi calibrado de acordo com as normas do fabricante. O laboratório procede regularmente ao controlo de qualidade interno e externo desta técnica.

2.3.2 – Pesquisa e quantificação de DNA do Citomegalovírus

A reacção de polimerização em cadeia é um método de amplificação de DNA. A PCR em tempo real utiliza corantes fluorescentes combinando as etapas de amplificação e detecção da reacção de PCR num só passo. O doseamento depende do aumento do sinal fluorescente, sendo este proporcional à quantidade de DNA alvo amplificado durante cada ciclo de PCR. Além disso, o uso de sondas marcadas com corantes diferentes, permite a detecção e quantificação de vários alvos em uma única reacção

(multiplex). Em cada ciclo de PCR cada reacção é caracterizada por um aumento da fluorescência acima de um valor de base, parâmetro conhecido como ciclo de quantificação (Cq), também designado por *threshold cycle* (Ct). A correlação entre a fluorescência e o produto amplificado permite a quantificação precisa de moléculas, mantendo a sensibilidade e especificidade dos ensaios PCR de tempo final convencionais (Nolan, Hands *et al.* 2006).

Em cada poço da placa de PCR ocorre uma reacção de amplificação específica para um gene do vírus em estudo, no caso do CMV a região do exão 4 do gene MIEA (*major immediate early antigen*, HCMVUL123) e ainda para a região promotora e 5' UTR do gene beta globulina humana (controlo interno) utilizando o DNA previamente extraído.

A sonda específica para o vírus, marcada com fluoróforo FAM, é activada quando ocorre a hibridização com o produto de amplificação específico do CMV. Outra sonda específica para o gene beta globulina humana marcado com o fluoróforo VIC é activada quando hibridiza com o produto de amplificação específico deste gene.

O aumento da emissão da fluorescência, proporcional ao aumento dos produtos de amplificação específicos, foi medido e registado pelo equipamento.

O procedimento foi realizado com os Kits *Q- CMV Real Time Complete Kit* (CEPHEID, Nanogen, Corso Torino, Itália). Iniciou-se o procedimento com a preparação de uma *Master Mix*, que contém os componentes necessários a uma PCR. Pipetou-se para uma placa 5 µL de DNA viral das amostras, 5 µL de água livre de RNase e DNase como controlo negativo e 5 µL de cada um dos padrões do vírus em estudo. A todos os poços adicionaram-se 20 µL da *Master Mix* anteriormente preparada. Os padrões utilizados para o CMV apresentam os seguintes número de cópias: 10², 10³, 10⁴ e 10⁵. O primeiro poço da placa deve corresponder ao padrão mais elevado. As

amostras, o controlo negativo e os padrões foram todos feitos em duplicado. Posteriormente, de modo a realizar a reacção de PCR em tempo real colocou-se a placa no aparelho *LightCycler® 480 Real-Time PCR System* (Roche, Rotkreuz, Suíça) e realizou-se a reacção utilizando o seguinte programa de PCR: 2 minutos a 50°C para descontaminar, 10 minutos a 95°C para desnaturação das duplas cadeias, 40 ciclos com um período de desnaturação de 15 segundos a 95°C e um período de emparelhamento/extensão de 1 minuto a 60°C. No final, permanece a 4°C por tempo indeterminado para terminar a reacção. Todo o procedimento acima mencionado foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante.

2.3.3 - Tipagem HLA dos loci A, B, Cw, DRB1 e DQB1 por PCR-SSO

A tipagem de alelos HLA classe I e classe II foi realizada com a técnica de reacção de polimerização em cadeia com sondas oligonucleotídeas de sequências específicas (PCR-SSO), recorrendo aos kits *LABType SSO Typing Test* (One Lambda, Inc, Los Angeles, EUA), para os loci A, B, Cw, DRB1 e DQB1. Numa primeira fase o DNA alvo é amplificado utilizando *primers* específicos para o locus. Seguidamente, o produto da amplificação é desnaturado e deixado reibridizar com sondas de DNA complementar conjugadas a microesferas codificadas por fluorescência que identificam os alelos presentes. Cada mistura de microesferas inclui uma sonda de controlo positivo e negativo, permitindo assim, a subtracção de sinais de fundo não-específicos e a normalização dos dados brutos para que seja possível ajustar a possível variação em quantidade de amostras e eficácia da reacção. Finalmente, o DNA é marcado com SA-PE e um analisador de fluxo identifica a intensidade de fluorescência da ficoeritrina (PE) em cada microesfera.

2.3.3.1 - Amplificação do DNA

Descongelaram-se os *primers*, a D-mix e as amostras de DNA, que ficaram em gelo até à sua utilização. De seguida pipetou-se 1 µl de cada amostra de DNA para uma placa de PCR, distribuindo uma amostra por poço. Preparou-se a mistura de reacção tendo em conta o número de reacções a realizar, adicionando por reacção 6,9 µl de D-mix, 2 µl de primers e 0,15 µl de *Taq Polimerase* (adicionada imediatamente antes de utilizar; 5U/µl, Promega, Madison, EUA). Agitou-se a mistura de reacção no vórtex e dispensou-se 9 µl em cada poço. Cobriu-se a placa com película de selagem e colocou-se no termociclador (Thermocycler T1 - Biometra, Goettingen, Alemanha) com o seguinte programa: um ciclo de desnaturação inicial 96°C durante 180 segundos, 5 ciclos com os seguintes passos: desnaturação a 96°C durante 20 segundos, emparelhamento a 60°C durante 20 segundos e extensão a 72°C durante 20 segundos. No final destes, ocorrem mais trinta ciclos com as seguintes características: desnaturação a 96°C durante 10 segundos, emparelhamento a 60°C durante 15 segundos e extensão a 72°C durante 20 segundos. Após os ciclos acima mencionados ocorre um ciclo de extensão final a 72°C durante 600 segundos, no final a temperatura desce a 4°C para conservação que poderá ser por tempo ilimitado.

2.3.3.2 - Eletroforese em gel de agarose e interpretação dos resultados

Antes de se proceder à hibridização dos produtos de PCR realizou-se uma electroforese com todas as amostras para verificar se ocorreu amplificação.

Os produtos de amplificação da reacção de PCR foram submetidos a uma electroforese de gel de agarose a 2% com 0,8 µg/ml de brometo de etídio (Sigma Chemical, St Louis, EUA), que permitiu a visualização dos produtos de amplificação à luz ultra-violeta (UV), no transluminador de *UV Gel Logic 200* (Kodak, New Haven, Estados Unidos). Com este equipamento fotografou-se o gel e identificaram-se as amostras que amplificaram, tendo em conta o peso molecular das bandas obtidas.

2.3.3.3 - Hibridização

Para o processo de hibridização pipetou-se 1,25 µl de tampão de desnaturação para uma placa de 96 poços limpa, adicionou-se 2,5 µl de produto de amplificação de cada amostra e homogeneizou-se bem com a pipeta. Após incubar 10 minutos à temperatura ambiente, colocou-se a placa sobre gelo.

Adicionou-se 2,5 µl de tampão de neutralização e misturou-se bem com a pipeta até observar uma alteração de cor rosa transparente para amarelo. Preparou-se a mistura de hibridização tendo em conta o número de reacções, adicionando por reacção 17 µl de tampão de hibridização e 2 µl de mistura de esferas. Homogeneizou-se a mistura de hibridização e adicionou-se 20 µl a cada poço. Após tapar a placa com a película de selagem, fez-se vórtex a baixa velocidade e colocou-se a placa no termociclador pré-aquecido a 60°C durante 15min. Terminada a incubação, adicionou-se rapidamente 50 µl de tampão de lavagem a cada poço. Selou-se a placa, fez-se vórtex e centrifugou-se 5 minutos a 1300g. O tampão foi removido de uma só vez invertendo a placa e os seus vestígios foram removidos com papel científico. Realizou-se outra lavagem idêntica. Preparou-se a solução SA-PE 1X tendo em conta o número de reacções, adicionando por reacção 0,25 µl de solução SA-PE stock e 24,75 µl de tampão SA-PE e após homogeneização adicionou-se 25 µl a cada poço. Selou-se a placa, fez-se vórtex a baixa

velocidade e colocou-se a placa no termociclador pré-aquecido a 60°C durante 5 minutos. Adicionou-se rapidamente 50 µl de tampão de lavagem a cada poço. Selou-se novamente a placa, fez-se vórtex e centrifugou-se 5min a 1300g. Removeu-se o tampão como explicado anteriormente. Adicionou-se 60 µl de tampão de lavagem e selou-se a placa, que ficou guardada no frigorífico, a 4°C, envolta em papel de alumínio, até à realização da leitura.

2.3.3.4 - Aquisição dos dados

Com a pipeta homogeneizou-se as soluções de cada poço e de seguida transferiu-se para a placa de leitura do aparelho *LABScan 100*, que foi ligado 30 minutos antes de se realizar a leitura. A interpretação dos resultados foi realizada com o programa *HLA Fusion TM* Versão 1.2.1 (One Lambda, Inc., Los Angeles, EUA)

2.3.4 - Tipagem KIR por PCR-rSSO

O método de hibridização reverso com sondas específicas de oligonucleotídeos após reacção de polimerização em cadeia (PCR-rSSO) foi utilizado na tipagem KIR, recorrendo ao *Kit LIFECODES KIR-SSO TYPING KIT* (TEPNEL, Stanford, Estados Unidos). Este é constituído por duas *Master-Mix: LIFECODE KIR-1* e *LIFECODE KIR-2*, *LIFECODE KIR Probe MIX* e solução de diluição. A tipagem completa de cada amostra é realizada após se efectuarem duas reacções de amplificação, uma com o *primer LIFECODE KIR-1* e outra com o *primer LIFECODE KIR-2*. O que permite a detecção dos seguintes 16 genes KIR incluindo dois pseudogenes: 2DL1, 2DL2

001/2/3/5, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DS1, 3DL2, 3DL3, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS4 001, 2DS4 003/4/6/7, 2DS5, 2DP1, 3DP1.

2.3.4.1 - Amplificação do DNA

Todas as amostras foram colocadas na concentração de 50 ng/μl de DNA. Para tal registaram-se todos os valores obtidos e em seguida utilizou-se a seguinte fórmula: Concentração inicial x Volume inicial = Concentração final x Volume final.

Começou-se por colocar as *Master Mix* à Temperatura ambiente (18 a 30°C), homogeneizaram-se gentilmente todos os reagentes aproximadamente durante 10 segundos, em seguida realizou-se uma breve centrifugação para que todos os reagentes se depositassem no fundo dos respectivos tubos. Tal como anteriormente mencionado a amplificação *multiplex* dos *locus* KIR encontra-se dividida em duas reacções de amplificação. Prepararam-se os componentes para amplificação para n+1 amostras, utilizando um volume final de 20 μl para cada reacção, da seguinte forma: 1x *Master-Mix LIFECODE KIR 1* ou *LIFECODE KIR 2*, 2 μl MgCl₂ (Promega, Madison, Estados Unidos), 0,5 U/μl *Taq Polimerase* (Promega, Madison, Estados Unidos) e 500 ng de DNA. Todo o processo de preparação da *Master Mix* foi realizado em gelo bem como os restantes passos do ensaio até à PCR. A mistura da reacção foi pipetada para uma placa de PCR (Abgene, Surrey, Inglaterra). Selou-se a placa com película selante de forma a prevenir a evaporação das amostras durante a PCR e colocou-se no termociclador. (Thermocycler T1 - Biometra, Goettingen, Alemanha) com o seguinte programa: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C durante 120 segundos, 40 ciclos com os seguintes passos: desnaturação a 94°C durante 30 segundos, emparelhamento a 59°C durante 90 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos. No final dos ciclos acima mencionados ocorre um ciclo de extensão final a 72°C durante 15 minutos, após a

extensão final a temperatura desce a 4°C para conservação que poderá ser por tempo ilimitado no equipamento.

2.3.4.2 – Hibridização

Antes de se proceder à hibridização dos produtos de PCR realizou-se uma electroforese (como descrito em 2.3.3.2) com todas as amostras para verificar se ocorreu amplificação.

Incubou-se a *LIFECODE KIR Probe MIX* a 58°C no *Thermomixer* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) durante 10 minutos. Durante este período colocou-se o termociclador (Thermocycler T1 - Biometra, Goettingen, Alemanha) a pré-aquecer a 56°C. Posteriormente pipetou-se 5µl do produto amplificado para uma placa de PCR (Abgene, Surrey, Inglaterra) e adicionou-se 15µl da *Probe-Mix* previamente aquecida. Selou-se a placa com película selante e colocou-se no termociclador previamente aquecido a 56°C durante 20 minutos. A cerca de 7 minutos do fim do tempo de incubação preparou-se uma solução com DS (solução de diluição) mais SA-PE (Estreptavidina conjugada a R-Ficoeritrina) com a seguinte proporção: 1000 µl de DS e 4 µl de SA-PE a fim de se adicionar 100 µl desta solução em cada poço da placa com amostra. Esta solução após preparação foi colocada a 45°C durante 5 minutos no equipamento *Thermomixer* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Sendo o SA-PE fotossensível foi guardado e trabalhado ao abrigo da luz. Findo o tempo de incubação adicionámos 100 µl da solução previamente preparada em cada poço da placa de PCR ainda no termociclador no período máximo de 5 minutos. Em seguida com a pipeta homogeneizou-se as soluções de cada poço e transferiram-se as amostras da placa de PCR para uma placa de leitura do aparelho *LABScan 100* (Luminex Corporation, Austin, Estados Unidos), que foi ligado 30 minutos antes de se fazer a leitura.

2.3.4.3 - Aquisição dos dados

A interpretação dos resultados foi efectuada com o programa *Luminex100 IS Software* versão 2.3.182 (Luminex Corporation, Austin, Estados Unidos)

2.4 – Estratégias estatísticas para análise de dados

A análise dos resultados obtidos consistiu no cálculo da estatística uni e bivariada, nomeadamente ao recurso de tabelas e figuras para ilustrar as frequências dos genes nos diferentes grupos: D^+R^+ , D^+R^- , D^-R^+ e D^-R^- .

Para avaliar as distribuições de variáveis qualitativas utilizámos o teste do χ^2 da aderência (uma amostra). Para verificar diferenças de proporções e contingências recorremos ao χ^2 da independência.

As diferenças observadas entre quatro grupos serão consideradas tendencialmente significativas se *p value* estiver entre 0,1 e 0,05; significativo se estiver entre 0,05 e 0,01. Quando o *p value* for $<0,001$ constará essa informação.

Para a realização de todos os cálculos estatísticos utilizou-se o programa SPSS 15.0 para Windows®.

3 – RESULTADOS

3.1 - Pureza e concentração das amostras de DNA genómico humano

Os protocolos de tipagens utilizados estão otimizados para uma determinada concentração de DNA e dependem, também, da sua integridade e pureza. Assim, foi realizada a análise espectrofotométrica da pureza e concentração de todas as amostras biológicas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela II.

Tabela II - Pureza e concentração das amostras de DNA genómico humano.

Concentração (ng/μl)	D.O 260nm/ D.O.280nm
10,0 e 581,50	1,34 ± 0,26

Verificou-se que as amostras possuíam, na sua maioria, uma concentração superior ao recomendado (50 ng/μl), pelo que foram preparadas diluições de concentração adequada para posterior utilização. Alguns DNAs apresentavam quantidades elevadas de sais e proteínas.

As amostras de DNA foram posteriormente utilizadas para as tipagens dos genes KIR, HLA classe I (*loci* A, B e C) e HLA classe II (*loci* DRB1 e DQB1).

3.2 - Tipagem KIR

A frequência de todos os genes KIR na população estudada foi determinada após a tipagem de todas as amostras. Os *framework genes* 3DL3 e 3DL2 apresentaram uma frequência de 100% na população, tal como esperado. Já os *framework genes* 3DP1 e 2DL4 apresentaram uma frequência de 98,5% (n= 67).

Entre os genes KIR mais frequentes na população estudada estão o 2DL1 e o pseudogene 2DP1 com 94,1% (n= 64), 2DS4 com 89,7% (n= 61), 2DL3 com 88,2% (n= 60). Entre os genes com menor expressão encontraram-se o KIR 3DS1, 2DS1 e 2DS5 com 39,7% (n= 27), sendo que o gene KIR que apresentou a menor frequência é o 2DS3 com 22,1% (n= 15) como evidencia a Figura 6.

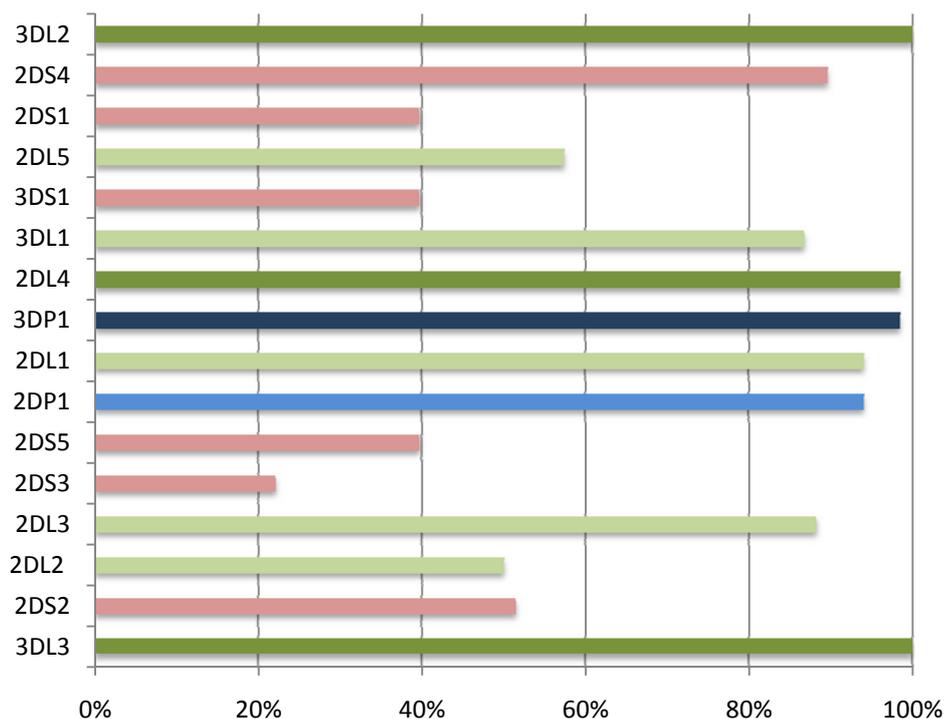


Figura 6 - Frequência dos genes KIR analisados na população do estudo. Os genes estão apresentados de acordo com a ordem pela qual estão posicionados no cromossoma 19q13.4 (Hsu, Chida *et al.* 2002). A verde escuro e azul escuro (pseudogene) encontram-se os *Framework genes*, a verde claro os KIR inibidores, a rosa os KIR activadores e azul claro outro pseudogene KIR.

3.2.1. - Genótipos KIR

O conjunto de mistura de *primers* utilizado na tipagem dos genes KIR e o facto de não se terem efectuado estudos familiares, não permitiu a distinção dos haplótipos, assim os resultados obtidos referem-se a genótipos. Identificaram-se 34 genótipos diferentes, que estão representados na (Figura7).

O genótipo mais frequente na população estudada foi o G5, que ocorreu em 16 indivíduos. Outros genótipos mais frequentes são os genótipos G8 com 5 indivíduos, e G19 e G24 com 4. Os seguintes genótipos G10, G21 e G34 ocorreram apenas em 3 indivíduos. G22 e G28 com 2 indivíduos e os restantes 25 genótipos com apenas 1 indivíduo (Figura 7).

Genes KIR																
Genótipos	3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DS3	2DS5	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DL1	3DS1	2DL5	2DS1	2DS4	3DL2
G1	Dark Green	Red	Light Green			Red			Dark Blue			Red	Light Green	Red		Dark Green
G2	Dark Green	Red	Light Green						Dark Blue	Dark Green	Light Green				Red	Dark Green
G3	Dark Green			Light Green			Light Blue	Light Green		Dark Green	Light Green				Red	Dark Green
G4	Dark Green						Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green				Red	Dark Green
G5	Dark Green			Light Green			Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green				Red	Dark Green
G6	Dark Green			Light Green			Light Blue	Light Green	Dark Green	Dark Green	Light Green	Red			Red	Dark Green
G7	Dark Green	Red	Light Green			Red			Dark Blue	Dark Green		Red	Light Green	Red		Dark Green
G8	Dark Green	Red	Light Green	Light Green			Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green				Red	Dark Green
G9	Dark Green			Light Green		Red	Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green		Red	Light Green	Red		Dark Green
G10	Dark Green	Red	Light Green	Light Green			Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green				Red	Dark Green
G11	Dark Green	Red	Light Green		Red		Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green		Light Green		Red	Dark Green
G12	Dark Green			Light Green	Red		Light Blue	Light Green	Dark Green	Dark Green	Light Green	Red	Light Green		Red	Dark Green
G13	Dark Green			Light Green		Red	Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green	Red	Light Green	Red		Dark Green
G14	Dark Green	Red	Light Green	Light Green		Red	Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green		Red	Light Green			Dark Green
G15	Dark Green			Light Green		Red	Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green	Red		Red	Red	Dark Green
G16	Dark Green	Red	Light Green	Light Green	Red		Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green			Light Green		Red	Dark Green
G17	Dark Green	Red	Light Green			Red			Dark Blue	Dark Green	Light Green	Red	Light Green	Red	Red	Dark Green
G18	Dark Green			Light Green		Red	Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green		Red	Light Green	Red	Red	Dark Green
G19	Dark Green	Red	Light Green	Light Green	Red		Light Blue	Light Green	Dark Green	Dark Green	Light Green	Red	Light Green		Red	Dark Green
G20	Dark Green			Light Green		Red	Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green	Red	Light Green	Red	Red	Dark Green
G21	Dark Green	Red	Light Green	Light Green	Red		Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green		Light Green		Red	Dark Green
G22	Dark Green	Red	Light Green	Light Green		Red	Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green			Light Green	Red	Red	Dark Green
G23	Dark Green			Light Green		Red	Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green	Red	Light Green	Red	Red	Dark Green
G24	Dark Green	Red	Light Green		Red		Light Blue	Light Green	Dark Green	Dark Green		Red	Light Green	Red		Dark Green
G25	Dark Green	Red	Light Green	Light Green		Red	Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green		Red	Light Green	Red		Dark Green
G26	Dark Green	Red	Light Green		Red		Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green	Red	Light Green		Red	Dark Green
G27	Dark Green			Light Green		Red	Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green	Red	Light Green	Red	Red	Dark Green
G28	Dark Green	Red	Light Green	Light Green		Red	Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green		Light Green	Red	Red	Dark Green
G29	Dark Green	Red	Light Green		Red		Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green		Light Green	Red	Red	Dark Green
G30	Dark Green	Red	Light Green	Light Green		Red	Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green		Light Green	Red	Red	Dark Green
G31	Dark Green	Red		Light Green			Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green	Red	Light Green	Red	Red	Dark Green
G32	Dark Green	Red	Light Green		Red		Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green	Red	Light Green	Red	Red	Dark Green
G33	Dark Green	Red	Light Green			Red	Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green	Red	Light Green	Red	Red	Dark Green
G34	Dark Green	Red	Light Green	Light Green	Red	Red	Light Blue	Light Green	Dark Blue	Dark Green	Light Green	Red	Light Green		Red	Dark Green

Figura 7 - Genótipos obtidos pela tipagem dos genes KIR. A verde escuro e azul escuro (pseudogene) encontram-se os *Framework genes*, a verde claro os KIR inibidores, a rosa os KIR activadores e azul claro outro pseudogene KIR.

3.2.2 - Haplótipos KIR

Tal como anteriormente mencionado, existem dois grupos de haplótipos KIR com maior frequência nas populações estudadas. O haplótipo AA, que apresenta um número fixo de 9 genes (6 KIR inibidores, 1 KIR activador, o 2DS4, e 2 pseudogenes), corresponde aos genótipos G5, G4 e G3; e o haplótipo B com um maior número de KIR activadores.

Apenas 26,5% da população estudada (n=18) apresentou só um KIR activador, o KIR2DS4, enquanto que 73,5% (n=50) apresentou, para além do KIR2DS4, outros KIR activadores. Assim sendo, os primeiros são incluídos no háplotipo AA e os segundos no haplotipo BX, que inclui o háplotipo BB e AB (Figura 8).

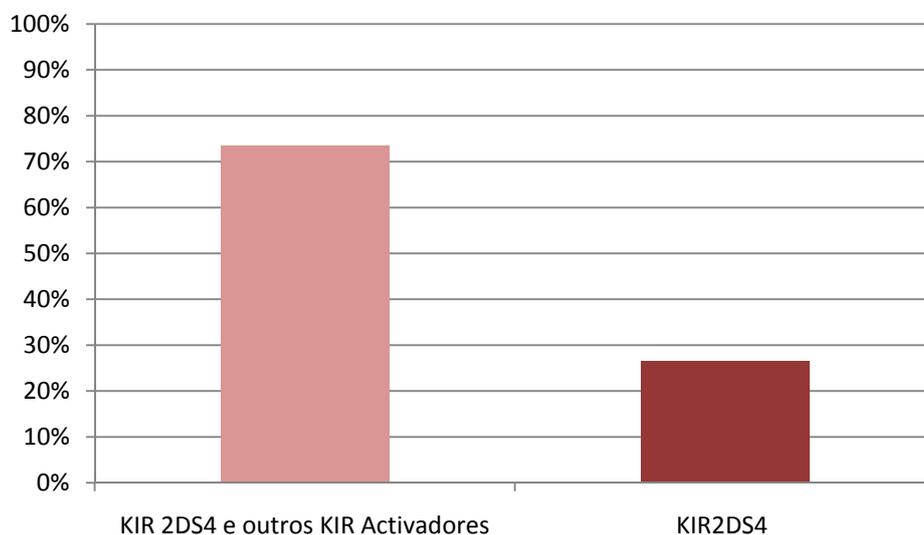


Figura 8 - Frequência na população estudada de indivíduos com KIR2DS4 e outros KIR activadores e indivíduos com apenas um KIR activador (2DS4).

Tabela III - Distribuição dos haplótipos KIR nos diferentes grupos de pares dador/receptor de acordo com o perfil serológico CMV.

Haplótipos KIR	D ⁺ R ⁺ (n=53) n(%)	D ⁺ R ⁻ (n=9) n(%)	D ⁻ R ⁺ (n=3) n(%)	D ⁻ R ⁻ (n=3) n(%)	DR Total (n=68) n(%)
AA	14 (26,4)	3 (33,3)	0 (0,0)	1 (33,3)	18 (26,5)
BX (BA, BB)	39 (73,6)	6 (66,7)	3 (100)	2 (66,7)	50 (73,5)
$\chi^2=1,370$	gl=3	p=0,712 (ns)			

Contudo, em termos relativos, a distribuição dos haplótipos foi homogênea nos diferentes perfis serológicos para CMV como se pode constatar pela Tabela III.

3.2.3 - KIR ativadores

Ao agrupar os KIR ativadores em três grupos, sendo estes compostos por um primeiro grupo contendo entre um a dois KIR ativadores, o segundo grupo com três a quatro KIR ativadores, e o terceiro com cinco a seis KIR ativadores, verificamos que o grupo com três a quatro KIR ativadores foi o que apresentou a maior frequência nos quatro diferentes perfis serológicos para CMV 47,1% (n=32). Contudo esta diferença não se revelou estatisticamente significativa. O grupo menos frequente foi o que apresentou entre cinco a seis KIR ativadores 11,8% (n=8) para os quatro perfis serológicos (Tabela IV).

Tabela IV - Distribuição do número de KIR activadores nos diferentes grupos de pares dador/receptor de acordo com o perfil serológico CMV.

	1-2 KIR (n=28) n(%)	3-4 KIR (n=32) n(%)	5-6 KIR (n=8) n(%)	Total n(%)
D ⁺ R ⁺	24 (45,3)	24 (45,3)	5 (9,4)	53 (77,9)
D ⁺ R ⁻	3 (33,3)	4 (44,4)	2 (22,2)	9 (13,2)
D ⁻ R ⁺	0 (0,0)	3 (100,0)	0 (0,0)	3 (4,4)
D ⁻ R ⁻	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)	3 (4,4)
Total	28 (41,2)	32 (47,1)	8 (11,8)	68 (100,0)
X ² =6,280	gl=6	p=0,400 (ns)		

3.2.4 - Genes KIR

Observámos que a distribuição dos genes KIR (inibidores, activadores e pseudogene) pelos diferentes perfis D⁺R⁺, D⁺R⁻, D⁻R⁺ e D⁻R⁻ ocorreu de forma equilibrada, com excepção para os genes KIR2DL3, KIR2DS1 e KIR2DS5 e nos grupos D⁺R⁺ e D⁺R⁻.

Tabela V - Distribuição dos genes KIR nos diferentes grupos de pares dador/receptor de acordo com o perfil serológico CMV.

	D ⁺ R ⁺ (n=53) n(%)	D ⁺ R ⁻ (n=9) n(%)	D ⁻ R ⁺ (n=3) n(%)	D ⁻ R ⁻ (n=3) n(%)	Total D/R (n=68) n(%)	
KIR2DL1	50 (94,3)	8 (88,9)	3 (100,0)	3 (100,0)	64 (94,1)	ns
KIR2DP1	50 (94,3)	8 (88,9)	3 (100,0)	3 (100,0)	64 (94,1)	ns
KIR2DL2	27 (50,9)	5 (55,6)	2 (66,7)	0 (0,0)	34 (50,0)	ns
KIR2DL3	49 (92,5)	6 (66,7)	2 (66,7)	3 (100,0)	60 (88,2)	ts
KIR2DL5	28 (52,8)	6 (66,7)	3 (100,0)	2 (66,7)	39 (57,4)	ns
KIR3DL1	47 (88,7)	6 (66,7)	3 (100,0)	3 (100,0)	59 (86,8)	ns
KIR2DS1	17 (32,1)	6 (66,7)	2 (66,7)	2 (66,7)	27 (39,7)	ns
KIR2DS2	27 (50,9)	5 (55,6)	2 (66,7)	1 (33,3)	35 (51,5)	ns
KIR2DS3	12 (22,6)	2 (22,2)	1 (33,3)	0 (0,0)	15 (22,1)	ns
KIR2DS4	48 (90,6)	7 (77,8)	3 (100,0)	3 (100,0)	61 (89,7)	ns
KIR 2DS5	18 (34,0)	5 (55,6)	2 (66,7)	2 (66,7)	27 (39,7)	ns
KIR 3DS1	19 (35,8)	4 (44,4)	2 (66,7)	2 (66,7)	27 (39,7)	ns

O grupo D⁺R⁺ apresentou, em termos relativos uma maior percentagem de KIR2DL3, 92,5% em comparação com o grupo dos D⁺R⁻, 66,7%, contudo é na contingência entre o gene KIR 2DL3 e D⁺R⁺ que o resíduo ajustado é >2, isto é, que a contingência é tendencialmente significativa (Tabela V).

No que diz respeito ao KIR2DS1 obtivemos um resíduo ajustado de -2,4 entre este gene e D⁺R⁺, o que nos leva a deduzir que é nesta contingência que existe uma menor distribuição.

Nas restantes contingências não se observaram valores relevantes.

3.3 - Tipagem HLA

A partir da tipagem dos genes do MHC classe I, calculou-se a frequência em homozigotia e heterozigotia na população em estudo. Dos alelos do grupo 1 de HLA-C (HLA-C1), que codificam Ser77/Asp80 no domínio HLA-Cw α 1 (HLA-Cw *01, *03, *07* *08), e são ligandos para os KIR inibidores, KIR2DL2/3, KIR2DL1 e KIR3DL1, e os alelos HLA-C grupo 2 (HLA-C2) e que codificam Asp77/Lys80 (HLA-Cw *02, *04, *05* *06) bem como os alelos HLA-B que partilham o epitopo Bw4 e Bw6. Os KIR activadores KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5 e KIR3DS1, têm como ligandos os HLA-Bw4, HLA-C1 e HLA-C2 (Lanier 2005; Parham 2005; Ahlenstiel, Martin *et al.* 2008; Hadaya, de Rham *et al.* 2008). Sempre que nos referimos a alelos em homozigotia terminamos a nomenclatura com H (Tabela VI).

Tabela VI – Distribuição dos ligandos KIR nos diferentes grupos de pares dador/receptor de acordo com o perfil serológico CMV.

	D ⁺ R ⁺ (n=53) n(%)	D ⁺ R ⁻ (n=9) n(%)	D ⁻ R ⁺ (n=3) n(%)	D ⁻ R ⁻ (n=3) n(%)	Total D/R (n=68) n(%)	
HLA-C1	44 (83,0)	7 (77,8)	2 (66,7)	3 (100,0)	56 (82,4)	ns
HLA-C1H	13 (24,5)	2 (22,2)	1 (33,3)	2 (66,7)	18 (26,5)	ns
HLA-C2	40 (75,5)	7 (77,8)	2 (66,7)	1 (33,3)	50 (73,5)	ns
HLA-C2H	9 (17,0)	2 (22,2)	1 (33,3)	0 (0,0)	12 (17,6)	ns
HLA-Bw4	33 (62,3)	7 (77,8)	3 (100)	2 (66,7)	45 (66,2)	ns
HLA-Bw4H	20 (37,7)	2 (22,2)	2 (66,7)	1 (33,3)	25 (36,8)	ns
HLA-Bw6	33 (62,3)	7 (77,8)	1 (33,3)	2 (66,7)	43 (63,2)	ns
HLA-Bw6H	20 (37,7)	2 (22,2)	0 (0,0)	1 (33,3)	23 (33,8)	ns

Apesar de não se ter encontrado diferenças estatísticas significativas, parece-nos relevante referir que entre os mais frequentes está o HLA-C1 com 82,4% (n=56), seguido do HLA-C2 com 73,5% (n=50). Nos HLA-B que partilham o epitopo Bw4 e Bw6, é mais frequente o HLA - Bw4 com 66,2% (n=45) seguido do HLA -Bw6.

Em todos os casos acima mencionados podemos ainda destacar que a homozigotia foi menos frequente, porém dentro desta o HLA-Bw4 foi o mais frequente e o HLA-C2 o menos frequente.

3.4 – Genes KIR e respectivos ligandos

Na tabela VII são apresentados os dados relativos aos KIR (cinco inibidores e quatro activadores), na presença ou ausência do respectivo ligando, relacionando-os com os diferentes perfis serológicos para CMV.

Tabela VII - Distribuição dos genes KIR em função da presença ou ausência dos respectivos ligandos nos diferentes grupos de pares dador/receptor de acordo com o perfil serológico CMV.

	D ⁺ R ⁺ (n=53) n(%)	D ⁺ R ⁻ (n=9) n(%)	D ⁻ R ⁺ (n=3) n(%)	D ⁻ R ⁻ (n=3) n(%)	
2DL1 com HLA-C2	39 (73,6)	7 (77,8)	2 (66,7)	1 (33,3)	ns
2DL1 sem HLA-C2	11 (20,8)	1 (11,1)	1 (33,3)	2 (66,7)	
2DL2 com HLA-C1	22 (41,5)	4 (44,4)	1 (33,3)	0 (0,0)	ns
2DL2 sem HLA-C1	5 (9,4)	1 (11,1)	1 (33,3)	0 (0,0)	
2DL3 com HLA-C1	22 (41,5)	4 (44,4)	1 (33,3)	0 (0,0)	ns
2DL3 sem HLA-C1	5 (9,4)	1 (11,1)	1 (33,3)	0 (0,0)	
3DL1 com HLA-Bw4	29 (54,7)	4 (44,4)	3 (100,0)	2 (66,7)	<0,001
3DL2 com HLA (A3; A11)	17 (32,1)	2 (22,2)	0 (0,0)	1 (33,3)	ns
3DL2 sem HLA (A3; A11)	36 (67,9)	7 (77,8)	3 (100,0)	2 (66,7)	
2DS1 com HLA-C2	12 (22,6)	4 (44,4)	2 (66,7)	1 (33,3)	ns
2DS1 sem HLA-C2	5 (9,4)	2 (22,2)	0 (0,0)	1 (33,3)	
2DS2 com HLA-C1	15 (28,3)	5 (55,6)	1 (33,3)	2 (66,7)	ns
2DS2 sem HLA-C1	2 (3,8)	1 (11,1)	1 (33,3)	0 (0,0)	
3DS1 com HLA-Bw4	9 (17,0)	3 (33,3)	2 (66,7)	1 (33,3)	ns
3DS1 sem HLA- Bw4	10 (18,9)	1 (11,1)	0 (0,0)	1 (33,3)	
2DS4 com HLA-Cw4	14 (26,4)	2 (22,2)	1 (33,3)	1 (33,3)	ns
2DS4 sem HLA-Cw4	34 (64,2)	5 (55,6)	2 (66,7)	2 (66,7)	

Verificámos que relativamente aos KIR inibidores, na população em estudo e para todos os grupos (D⁺R⁺, D⁺R⁻, D⁻R⁺ e D⁻R⁻), estão em maior frequência com respectivo ligando do que na ausência deste, com excepção para o KIR3DL2 em que a frequência foi maior para a ausência do respectivo ligando em todos os perfis serológicos de CMV. No caso KIR3DL1 apenas foi avaliada a presença do gene com o respectivo ligando, sendo que a distribuição deste pelo gene é significativa com mais casos no D⁺R⁺.

Para os KIR activadores na população estudada e para a maioria do perfis serológicos CMV, os KIR 2DS1, 2DS2 e 3DS1 apresentaram maior frequência com o

respectivo ligando, exceção para o KIR2DS4 sendo o único a ter apresentado maior frequência com ausência do respectivo ligando, o HLA-Cw4 em todos os perfis serológicos.

3.5 – Genes KIR e respectivos ligandos na infecção por Citomegalovírus

Na tabela VIII relacionámos os resultados da PCR em Tempo Real para CMV em quatro momentos distintos: nos primeiros noventa dias após transplante, entre o nonagésimo primeiro e centésimo octogésimo dia, entre o centésimo octogésimo primeiro e o tricentésimo sexagésimo quinto dia e do tricentésimo sexagésimo sexto dia em diante com os perfis D^+R^+ , D^+R^- , D^-R^+ e D^-R^- .

Observou-se que na presença de um KIR inibidor com o respectivo ligando, e confrontando com os resultados para a infecção por CMV nos quatro diferentes momentos, em todos existiu uma maior frequência de casos positivos para CMV do que para o mesmo KIR sem o respectivo ligando. A exceção ocorre para o KIR3DL2 cujo ligando é o HLA (A*03,A*11) e que em todos os grupos foi mais frequente sem o respectivo ligando.

Comparativamente os KIR activadores, em 4 KIR dois apresentaram maior frequência com o respectivo ligando, KIR 2DS1 e 2DS2. O KIR3DS1 em todos os perfis previamente definidos para a CMV apenas no grupo D^+R^+ é que tal não acontece. Para o KIR2DS4 foi mais frequente sem o respectivo ligando em todos os perfis. Com exceção do KIR 2DL1, 3DL2 e 2DS4 todos os restantes são, pelo menos, tendencialmente significativos.

Tabela VIII - Distribuição dos genes KIR em função da presença ou ausência dos respectivos ligandos nos diferentes grupos de pares dador/receptor de acordo com a infecção por CMV.

	Infecção CMV (0-90 dias) n= 66 n(%)	Infecção CMV (91-180 dias) n=30 n(%)	Infecção CMV (181-365 dias) n= 18 n(%)	Infecção CMV (>365 dias) n= 13 n(%)	
2DL1 com HLA-C2	12 (18,2)	17 (56,7)	5 (27,8)	1 (7,7)	ns
2DL1 sem HLA-C2	2 (3,0)	5 (16,7)	1 (5,6)	0 (0,0)	
2DL2 com HLA-C1	6 (9,1)	9 (30,0)	1 (5,6)	0 (0,0)	ts
2DL2 sem HLA-C1	2 (3,0)	5 (16,7)	1 (5,6)	0 (0,0)	
2DL3 com HLA-C1	6 (9,1)	9 (30,0)	1 (5,6)	0 (0,0)	ts
2DL3 sem HLA-C1	2 (3,0)	5 (16,7)	1 (5,6)	0 (0,0)	
3DL1 com HLA-Bw4	12 (18,2)	17 (56,7)	4 (22,2)	1 (7,7)	<0,001
3DL2 com HLA (A3; A11)	4 (6,1)	8 (26,7)	1 (5,6)	0 (0,0)	ns
3DL2 sem HLA (A3; A11)	11 (16,7)	16 (53,3)	5(17,8)	1 (7,7)	
2DS1 com HLA-C2	0 (0,0)	2 (6,7)	1 (5,6)	0 (0,0)	-*
2DS1 sem HLA-C2	1 (1,5)	3(10,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
2DS2 com HLA-C1	1 (1,5)	4 (13,3)	1 (5,6)	0 (0,0)	-*
2DS2 sem HLA-C1	0 (0,0)	1 (3,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	
3DS1 com HLA-Bw4	2 (3,0)	5 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	-*
3DS1 sem HLA- Bw4	1 (1,5)	2 (6,7)	2 (11,1)	0 (0,0)	
2DS4 com HLA-Cw4	6 (9,1)	8 (26,7)	2 (11,1)	1 (7,7)	ns
2DS4 sem HLA-Cw4	8 (12,1)	12 (40,0)	4 (22,2)	0 (0,0)	

-* Frequências esperadas inferiores a cinco e n inferior a 20, pelo que não sendo permitido agregar variáveis não se podem generalizar os resultados.

4 – DISCUSSÃO

4.1 Genes KIR e doença

A disponibilidade de sistemas de tipagem de genes KIR permitiu que diversos investigadores utilizassem estes sistemas para tentar estabelecer associações entre a presença ou ausência destes genes e a ocorrência de doenças (infecções virais, bacterianas e doenças autoimunes).

Carrington e seus colaboradores concluíram que os KIR activadores 2DS1 e 2DS2 estão associados à artrite psoriática, mas apenas quando os ligandos dos correspondentes genes inibidores – KIR2DL1 e KIR2DL2/3 – estão ausentes (Nelson, Martin *et al.* 2004). Middleton *et al.* concluíram que há uma associação entre a ausência de KIR2DL2 e KIR2DS2 e a diabetes de tipo I, já que estes KIR têm uma frequência significativamente menor que nos controlos saudáveis. Estes autores possuem também resultados em doenças infecciosas e de natureza cancerígena: um estudo na população mexicana aponta para uma associação entre a tuberculose e os genes KIR2DL1 e 2DL3, e outro estudo na população espanhola aponta para uma associação entre KIR2DS2 e KIR2DL2 e o cancro colorectal (Middleton, Williams *et al.* 2005). Passweg e seus colaboradores, através da observação epidemiológica, verificaram que certos genótipos dos KIR/HLA com perfil activador (ou seja, presença de um maior número de KIR activadores ou ausência de KIR inibidores ou dos seus respectivos ligandos) estão associados com resistência ao HCV e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, bem como a uma progressão mais lenta na doença por HIV (Passweg, Huard *et al.* 2007; Jobim and Jobim 2008).

O presente estudo incidiu sobre uma população de primeiros transplantados renais que foram agrupados segundo o perfil serológico para CMV, em que relacionámos a frequência dos genes KIR e respectivos ligandos HLA com a infecção por CMV. Verificámos que a distribuição dos genes KIR2DL3 e KIR2DS1, nos grupos

D^+R^+ e D^+R^- , apresentaram diferenças tendencialmente significativas no caso do KIR2DL3. No caso KIR2DS1 verificamos que é neste gene que existe uma menor distribuição, pois é no grupo D^+R^+ que a sua frequência é menor, sendo igual para os restantes perfis. Nos restantes KIR estudados e perfis serológicos não se verificaram diferenças significativas entre os diferentes grupos.

Uma vez que a aloreactividade das células NK é regulada através de um equilíbrio entre os sinais inibidores e activadores, o presente estudo sugere um desequilíbrio entre KIR2DL3 e KIR2DS1 nos pares D^+R^+ eventualmente associado a uma menor resistência à infecção viral.

4.2 Framework genes

Apesar dos haplótipos KIR variarem no número e tipo de genes presentes, os KIR3DL3, 3DP1, 2DL4 e 3DL2 estão virtualmente presentes em todos os haplótipos e por isso foram denominados *framework genes* (Uhrberg, Valiante *et al.* 1997; Wilson, Torkar *et al.* 2000). Neste estudo foi encontrada uma prevalência de 100% para os KIR3DL3 e 3DL2 e de 98,5% para os genes KIR3DP1 e 2DL4, o que vai de encontro a outros estudos previamente publicados (Hsu, Chida *et al.* 2002; Middleton, Williams *et al.* 2005; Jobim and Jobim 2008).

4.3 Caracterização dos genótipos KIR na população do estudo

Entre os 68 indivíduos deste estudo identificaram-se 34 genótipos, uma vez que o conjunto de misturas de *primers* utilizados na tipagem dos genes KIR e o facto de não se terem efectuado estudos familiares não permitiu a distinção dos haplótipos.

Todos os haplótipos conhecidos são flanqueados no terminal centromérico por KIR3DL3, no terminal telomérico pelo KIR3DL2 e ao centro por KIR2DL4 e KIR3DP1 e dividem-se em duas partes, a centromérica (delimitada por KIR3DL3 e KIR3DP1) e a telomérica (delimitada por KIR2DL4 e KIR3DL2). De acordo com Hsu e seus colaboradores (Hsu, Liu *et al.* 2002) a parte centromérica dos haplótipos é caracterizada pela presença de KIR2DL3 ou KIR2DL2, mas não ambos. Assim, pode perceber-se que a maior parte dos genótipos são heterozigóticos, possuindo dois haplótipos diferentes, uma vez que possuem ambos os genes. Ainda segundo este autor, o KIR2DL3 está sempre acompanhado do trio KIR2DP1, KIR2DL1 e KIR3DP1, o que se verificou em todos os genótipos com excepção do G3. O KIR2DL2 está sempre acompanhado de KIR2DS2, o que se verificou em todos os genótipos identificados neste estudo com excepção de G31. Estes dois últimos genes podem estar associados a KIR2DP1, KIR2DL1 e KIR3DP1 mas definem também outro haplótipo caracterizado pela presença duma variante do KIR3DP1 (que possui o exão 2) e pela ausência de KIR2DP1 e KIR 2DL1 que no presente estudo são o G1, G2 e G17. A parte telomérica dos haplótipos é caracterizada pela presença de KIR3DL1 ou KIR3DS1, mas não ambos. A presença de KIR3DL1 indica um segmento telomérico curto, contendo apenas KIR2DS4 e KIR2DL2. Pelo contrário, a presença de KIR3DS1 define um segmento telomérico longo, contendo KIR2DL5, KIR2DS3 ou KIR2DS5, KIR2DS1, KIR2DS4 e

KIR3DL2. Todas estas relações ocorrem nos genótipos identificados no presente estudo.

Analisando os genótipos quanto ao número de genes KIR activadores, verifica-se que os genótipos G3, G4 e G5 possuem apenas um, o KIR2DS4, característica única dos haplótipos do tipo A, o que nos permite concluir que estes genótipos são constituídos por dois haplótipos A. Nos restantes genótipos, nada se pode inferir quanto aos tipos de haplótipos que possuem, pois podem ser constituídos por dois haplótipos B ou por um haplótipo A e um B.

O genótipo mais frequente na população deste estudo é o G5, existe em 16 indivíduos (88,8%), corresponde ao haplótipo AA. Com este haplótipo encontramos ainda o G3 e G4, tendo sido os restantes indivíduos agrupados no haplótipo BX, que inclui os haplótipos BA e BB.

A homozigotia para o haplótipo A (genótipo AA) é frequente (30-58%) na maioria das populações estudadas, com excepção para os asiáticos (75%) e os aborígenes australianos (15%) (Rajalingam 2007; Marangon, Guelsin *et al.* 2009). No presente estudo, a frequência encontrada para o haplótipo A é de 26,5%, relativamente mais baixa do que noutros estudos (Rajalingam 2007), mas muito similar à encontrada por Jobim e Jobim de 24,1% para este mesmo haplótipo, numa população que se assemelha à deste estudo (Jobim and Jobim 2008).

4.4 Influência da alorreactividade das células NK na infecção por Citomegalovírus em transplantação renal

O modelo proposto por Karre e seus colaboradores, hipótese de *missing-self* (Karre, Ljunggren *et al.* 1986), para explicar a regulação da activação das células NK

através dos seus receptores inibidores e activadores tem vindo a ser testado em vários pacientes transplantados, quer em transplante de células estaminais hematopoiéticas quer de órgãos sólidos (Nelson, Martin *et al.* 2004; Kunert, Seiler *et al.* 2007; Hadaya, de Rham *et al.* 2008; Jobim and Jobim 2008).

Este modelo, de ausência de ligandos, prevê a aloreactividade das células NK, no caso particular do presente estudo. Na infecção viral, ocorre assim uma alteração da expressão destas moléculas do MHC devida ao CMV.

Porém, é sabido que os genótipos HLA e KIR são segregados independentemente, existindo assim a probabilidade de um indivíduo expressar um KIR nas suas células NK para o qual não possui o respectivo ligando, e também o inverso em que um indivíduo pode expressar um ligando HLA para o qual não possua o respectivo KIR. Desta forma, este estudo pretendeu averiguar se a ausência de ligando para os KIR inibidores ou a presença do respectivo ligando para os KIR activadores, poderá ser um indicador para um menor número de casos de infecção ou re-infecção por CMV.

No presente estudo verificámos que a presença de um KIR inibidor e respectivo ligando se encontra associada a uma maior frequência da infecção CMV. Tal acontece com o KIR2DL1 com HLA-C2 e KIR2DL2 e 2DL3 com HLA-C1. No entanto obtivemos um resultado contraditório com KIR3DL2 que, sem o respectivo ligando (HLA-A3; HLA-A11), apresenta um maior número de casos de infecção CMV.

Alguns autores concluíram que na ausência do ligando HLA-C para os respectivos KIR inibidores, haveria um menor número de infecções por CMV após transplante (Hadaya, de Rham *et al.* 2008). Os resultados obtidos no presente estudo corroboram aquelas observações, sendo que esta condição é verificada ao longo dos

quatro momentos diferentes após transplantação em que foram realizadas pesquisas de CMV.

Do mesmo modo, Stern e colaboradores demonstraram que o número de KIR activadores se relacionava inversamente com os episódios de infecções/re-infecções por CMV em transplantados renais (Stern, Elsasser *et al.* 2008). Outros autores, para além do anteriormente mencionado, preconizam que existe uma relação entre o número de KIR inibidores e activadores e os casos de infecção viral CMV (Hadaya, de Rham *et al.* 2008; Stern, Elsasser *et al.* 2008). No presente estudo apenas se verificou esta associação para o KIR2DS4.

Dado o conjunto de dados e discussão patente na literatura no que envolve esta matéria, seria mais esclarecedora uma futura investigação num conjunto de pares dador negativo para anticorpos CMV e receptor positivo ou negativo para anticorpos CMV (D^R^+ e D^R^-) sub-representados no presente estudo.

4.5 Perspectivas futuras

No seguimento do estudo da aloreactividade das células NK, seria importante a realização de ensaios de citotoxicidade, similares aos de Alter e colaboradores, começando por isolar clones de células NK, verificando quais os genes KIR expressos e relacionando-os com a presença ou ausência dos respectivos ligandos (Alter, Malenfant *et al.* 2004).

A análise de acordo com os diferentes perfis de infecção CMV, avaliando a capacidade de lise e intervenção das células NK na resolução da infecção, permitiria um melhor conhecimento dos factores que contribuem para a sobrevida do enxerto em transplantação renal.

5 – CONCLUSÃO

Neste estudo sugerimos que a ausência dos ligandos para KIR inibidores, poderá favorecer de uma forma global, a eliminação do CMV nos 12 meses subsequentes ao transplante, o que se verificou nos KIR2DL2, 2DL3 e 3DL1.

Não se observaram diferenças significativas nas frequências genóticas dos KIR em função nos grupos de pares dador/receptor estudados de acordo com a infecção por CMV.

O presente estudo não revelou associações específicas entre a combinação de um KIR inibidor e o respectivo ligando ou de um KIR activador específico e infecção por CMV.

Estes resultados são consistentes com estudos previamente publicados em que se explica o papel das células NK nas mais diversas patologias, evidenciando que a ausência do ligando apresenta um menor controlo inibitório sobre as células NK aumentando a sua aloreactividade.

Globalmente, estes resultados sugerem um papel importante dos KIR inibidores na infecção por CMV em transplantação renal. Assim, a genotipagem KIR em conjunto com a tipagem HLA efectuada por rotina, poderá ajudar no diagnóstico e prognóstico da infecção viral em transplantação renal.

6 – REFERÊNCIAS

- Ahlenstiel, G., M. P. Martin, et al. (2008). "Distinct KIR/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses." J Clin Invest **118**(3): 1017-26.
- Alter, G., J. M. Malenfant, et al. (2004). "CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity." J Immunol Methods **294**(1-2): 15-22.
- Borrego, F., J. Kabat, et al. (2002). "Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells." Mol Immunol **38**(9): 637-60.
- Chan Laurence, K. I. (1997). Outcome and complications of renal transplantation. In disease of the Kidney, Schrier RW, Gottschalk CW.
- Colonna, M., G. Borsellino, et al. (1993). "HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(24): 12000-4.
- Duncan, S. R., W. F. Grgurich, et al. (1994). "A comparison of ganciclovir and acyclovir to prevent cytomegalovirus after lung transplantation." Am J Respir Crit Care Med **150**(1): 146-52.
- Gardiner, C. M. (2008). "Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cells: the how, where and why." Int J Immunogenet **35**(1): 1-8.
- George, M. J., D. R. Snyderman, et al. (1997). "The independent role of cytomegalovirus as a risk factor for invasive fungal disease in orthotopic liver transplant recipients. Boston Center for Liver Transplantation CMVIG-Study Group. Cytogam, MedImmune, Inc. Gaithersburg, Maryland." Am J Med **103**(2): 106-13.

- Hadaya, K., C. de Rham, et al. (2008). "Natural killer cell receptor repertoire and their ligands, and the risk of CMV infection after kidney transplantation." Am J Transplant **8**(12): 2674-83.
- Hirsch, H. H. (2002). "Polyomavirus BK nephropathy: a (re-)emerging complication in renal transplantation." Am J Transplant **2**(1): 25-30.
- Hodson, E. M., C. A. Jones, et al. (2005). "Antiviral medications to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ transplants: a systematic review of randomised controlled trials." Lancet **365**(9477): 2105-15.
- Hsu, K. C., S. Chida, et al. (2002). "The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism." Immunol Rev **190**: 40-52.
- Hsu, K. C., X. R. Liu, et al. (2002). "Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets." J Immunol **169**(9): 5118-29.
- Jobim, M. and L. F. Jobim (2008). "Natural killer cells and immune surveillance." J Pediatr (Rio J) **84**(4 Suppl): S58-67.
- Jordan, M. L., R. Naraghi, et al. (1997). "Tacrolimus rescue therapy for renal allograft rejection--five-year experience." Transplantation **63**(2): 223-8.
- Jordan, M. L., R. Shapiro, et al. (1994). "FK506 "rescue" for resistant rejection of renal allografts under primary cyclosporine immunosuppression." Transplantation **57**(6): 860-5.
- Karre, K., H. G. Ljunggren, et al. (1986). "Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy." Nature **319**(6055): 675-8.

- Kelley, J. and J. Trowsdale (2005). "Features of MHC and NK gene clusters." Transpl Immunol **14**(3-4): 129-34.
- Kunert, K., M. Seiler, et al. (2007). "KIR/HLA ligand incompatibility in kidney transplantation." Transplantation **84**(11): 1527-33.
- Lanier, L. L. (2005). "NK cell recognition." Annu Rev Immunol **23**: 225-74.
- Marangon, A., G. Guelsin, et al. (2009). "Receptores KIR de células Natural Killer." Ciência, Cuidado e Saúde **7**: 153-60.
- Middleton, D., F. Williams, et al. (2005). "KIR genes." Transpl Immunol **14**(3-4): 135-42.
- Moretta, L. and A. Moretta (2004). "Killer immunoglobulin-like receptors." Curr Opin Immunol **16**(5): 626-33.
- Nelson, G. W., M. P. Martin, et al. (2004). "Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis." J Immunol **173**(7): 4273-6.
- Nemati, E., M. Eizadi, et al. (2007). "Cytomegalovirus disease after kidney transplantation: clues to accurate diagnosis." Transplant Proc **39**(4): 987-9.
- Nolan, T., R. E. Hands, et al. (2006). "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR." Nat Protoc **1**(3): 1559-82.
- Parham, P. (2005). "MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival." Nat Rev Immunol **5**(3): 201-14.
- Passweg, J. R., B. Huard, et al. (2007). "HLA and KIR polymorphisms affect NK-cell anti-tumor activity." Trends Immunol **28**(10): 437-41.
- Rajalingam, R. (2007). "Killer cell immunoglobulin-like receptors influence the innate and adaptive immune responses." Iran J Immunol **4**(2): 61-78.

- Robinson, J. and S. G. Marsh (2007). "IPD: the Immuno Polymorphism Database." Methods Mol Biol **409**: 61-74.
- Schellekens, J., E. H. Rozemuller, et al. (2008). "Activating KIRs exert a crucial role on relapse and overall survival after HLA-identical sibling transplantation." Mol Immunol **45**(8): 2255-61.
- Schnitzler, M. A., J. A. Lowell, et al. (2003). "The association of cytomegalovirus seropairing with outcomes and costs following cadaveric renal transplantation prior to the introduction of oral ganciclovir CMV prophylaxis." Am J Transplant **3**(4): 445-51.
- Shaikewitz, S. T. and L. Chan (1994). "Chronic renal transplant rejection." Am J Kidney Dis **23**(6): 884-93.
- Sollinger, H. W. (1995). "Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group." Transplantation **60**(3): 225-32.
- Stern, M., H. Elsasser, et al. (2008). "The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients." Am J Transplant **8**(6): 1312-7.
- Terasaki, P. I., J. M. Cecka, et al. (1996). "Risk rate and long-term kidney transplant survival." Clin Transpl: 443-58.
- Tibbles, L. A. (2008). "Reducing the risk of viral infection in renal transplantation." Transplant Proc **40**(10 Suppl): S48-51.
- Trowsdale, J. (2001). "Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes." Immunity **15**(3): 363-74.
- Uhrberg, M., N. M. Valiante, et al. (1997). "Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes." Immunity **7**(6): 753-63.

- Valiante, N. M., M. Uhrberg, et al. (1997). "Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors." Immunity **7**(6): 739-51.
- Vilches, C. and P. Parham (2002). "KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity." Annu Rev Immunol **20**: 217-51.
- Vilches, C. and P. Parham (2006). "Do NK-cell receptors and alloreactivity affect solid organ transplantation?" Transpl Immunol **17**(1): 27-30.
- Wagtman, N., S. Rajagopalan, et al. (1995). "Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer." Immunity **3**(6): 801-9.
- Waiser, J., K. Budde, et al. (1998). "Effectiveness of deferred therapy with ganciclovir in renal allograft recipients with cytomegalovirus disease." Transplant Proc **30**(5): 2083-5.
- Webb, J. R., S. H. Lee, et al. (2002). "Genetic control of innate immune responses against cytomegalovirus: MCMV meets its match." Genes Immun **3**(5): 250-62.
- Wilson, M. J., M. Torkar, et al. (2000). "Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4778-83.
- Woodle, E. S., J. R. Thistlethwaite, et al. (1996). "A multicenter trial of FK506 (tacrolimus) therapy in refractory acute renal allograft rejection. A report of the Tacrolimus Kidney Transplantation Rescue Study Group." Transplantation **62**(5): 594-9.