

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA DE DO
ADOLESCENTE

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS DOS
GENES KIR E HLA EM SANGUE DE CORDÃO
UMBILICAL E PLACENTÁRIO DE RECÉM-NASCIDOS
A TERMO E PRÉ-TERMO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FERNANDA MARQUEZOTTI

Porto Alegre, Brasil

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS DOS
GENES KIR E HLA EM SANGUE DE CORDÃO
UMBILICAL E PLACENTÁRIO DE RECÉM-NASCIDOS
A TERMO E PRÉ-TERMO**

FERNANDA MARQUEZOTTI

**Orientador: Renato Soibelman Procianoy
Co-orientador: Rita de Cássia Silveira**

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Marquezotti, Fernanda

ESTUDO DE POLIMORFISMOS DOS GENES KIR E HLA EM SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO DE RECÉM-NASCIDOS A TERMO E PRÉ-TERMO / Fernanda Marquezotti. - 2014. 81 f.

Orientador: Renato Soibermann Procianoy.
Coorientadora: Rita de Cássia Silvaira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. KIR. 2. HLA. 3. Pré-termo. 4. Polimorfismo. 5. SCUP. I. Procianoy, Renato Soibermann, orient. II. Silvaira, Rita de Cássia, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

27 / 05 / 2014

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dra. Andrea Lucia Corso
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Prof. Dra. Liane Esteves Daudt
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Prof. Dr. Paulo Roberto Antonacci Carvalho
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família,
especialmente aos meus pais, Ricardo e Rosana
e meu namorado, Guilherme.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que, de alguma forma, colaboraram com a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao corpo docente e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente.

Ao meu orientador, Renato S. Procianoy e à co-orientadora Rita de Cássia Silveira, por me proporcionarem conhecer e me encantar com a neonatologia e pela atenção e disponibilidade de sempre;

Ao professor Luiz Fernando Jobim, que idealizou este trabalho e me abriu as portas do Serviço de Imunologia;

À CAPES e FIPE-HCPA pelo auxílio financeiro à pesquisa;

À Joice Merzoni, pelos ensinamentos em imunologia, atenção e amizade;

À Beatriz Chamum Gil pela amizade e parceria nas disciplinas;

À Rosane Calvi Beuren pelo carinho e ensinamentos na extração do DNA;

À toda equipe do Serviço de Imunologia que se tornou uma família para mim e que sempre me recebeu tão bem;

À Mariana Jobim Wilson pelo incentivo à realização desta pesquisa;

À Pâmela Portela pela colaboração na prática dos experimentos e pela amizade;

À Patricia Salim pelo auxílio com a análise estatística;

À Vania Naomi Hirakata, consultora do GPPG, pela análise estatística deste trabalho;

À Fabiane Steffens, enfermeira do HMIPV, pela colaboração na coleta;

À toda equipe do Centro Obstétrico do HCPA pela convivência e auxílio nas coletas;

Aos recém-nascidos e seus familiares que participaram desta pesquisa;

E aos meus pais, irmãos e namorado que sempre me deram muita força, incentivo e carinho.

RESUMO

Background. O nascimento pré-termo permanece sendo grande causa de mortalidade neonatal. A vulnerabilidade dos prematuros se dá principalmente pelas freqüentes intervenções médicas e por sua imaturidade imunológica. As infecções neonatais aumentam a probabilidade de complicações e prolongam o tempo de internação, aumentando o risco de mortalidade. A atividade das células Natural Killer (NK) em recém-nascidos prematuros está reduzida e associada com maior susceptibilidade a agentes infecciosos. As células NK são capazes de mediar a resposta do sistema imune inato contra células infectadas por vírus e células malignas transformadas, podendo provocar um ataque direto às células alvo. Os principais receptores das células NK são os KIR ou killer immunoglobulin-like-receptors que reconhecem moléculas de HLA classe I.

Objetivo. Investigar o polimorfismo dos genes KIR e HLA de classe I nos recém-nascidos pré-termos de muito baixo peso em comparação com recém-nascidos a termo.

Métodos. Foram genotipados 154 recém-nascidos, 60 pré-termo e 94 a termo, para 16 genes KIR e seus ligantes HLA pelos métodos PCR SSO e PCR SSP, respectivamente.

Resultados. Há diferença estatisticamente significativa ($P < 0.0001$) entre recém-nascidos pré-termo e a termo para o gene KIR2DS4, sendo menos freqüente no grupo de recém-nascidos pré-termos.

Conclusões. A menor frequência do KIR2DS4 evidencia uma imunidade natural deficiente nesse grupo de recém-nascidos prematuros

Palavras chave: pré-termo, receptores KIR, antígenos HLA.

ABSTRACT

Background. Preterm birth remains a major cause of neonatal mortality. Preterm infants are particularly vulnerable because of frequent medical intervention and an immature immune system. Neonatal infections increase the likelihood of complications and prolong hospital stay, increasing the risk of mortality. The activity of natural killer (NK) cells is reduced in preterm neonates and associated with increased susceptibility to infectious agents. NK cells are capable of mediating the innate immune response to virally infected cells and malignantly transformed cells, which might lead to a direct attack on target cells. Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) are the main NK cell receptors, and are known to recognize Human Leukocyte Antigen (HLA) class I molecules.

Objective. To investigate polymorphisms of KIR and HLA class I genes in very low birth weight preterm neonates compared with full-term neonates.

Methods. 154 neonates, 60 preterm and 94 full-term, were genotyped for 16 KIR genes and their HLA ligands by PCR-SSO and PCR-SSP respectively.

Results. There was a statistically significant difference ($P < 0.0001$) between preterm and full-term neonates for the KIR2DS4 gene, which was less frequent in preterm neonates.

Conclusions. The lower frequency of KIR2DS4 indicates a deficient innate immune response in the group of preterm neonates.

Keywords: preterm, KIR receptors, HLA antigens.

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|-----------|
| Tabela 1 | Frequência dos dados clínicos (%) e suas associações em pré-termo e a termo..... | 51 |
| Tabela 2 | Frequência dos dados clínicos (%) e suas associações em AIG pré-termo x PIG pré-termo e AIG a termo x PIG a termo..... | 52 |
| Tabela 3 | Frequencia (%) dos genes KIR, ligantes HLA e suas associações em pré-termo e a termo..... | 53 |
| Tabela 4 | Frequencia (%) dos genes KIR, ligantes HLA e suas associações em AIG pré-termo x PIG pré-termo e AIG a termo x PIG a termo..... | 54 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----------|---|-----------|
| Figura 1 | Célula NK atacando célula tumoral..... | 18 |
| Figura 2 | Domínios dos genes KIR..... | 20 |
| Figura 3 | Haplótipo A e B..... | 21 |
| Figura 4 | Interação dos receptores KIR com as moléculas de HLA..... | 23 |
| Quadro 1 | Correspondência entre KIR e seus ligantes HLA..... | 23 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------------------------|--|
| AGA | <i>Adequate for Gestacional Age</i> |
| AIG | Adequado para Idade Gestacional |
| AT | A termo |
| DAP-12 | Adaptador da molécula |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| dNTPs | <i>deoxynucleotide triphosphates</i> |
| DP | Desvio Padrão |
| EDTA | <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> |
| EN | Enterocolite Necrosante |
| GIG | Grande para Idade Gestacional |
| HCPA | Hospital de Clínicas de Porto Alegre |
| HIV | <i>Human Immunodeficiency Virus</i> |
| HLA | <i>Human Leukocyte Antigen</i> |
| HMIPV | Hospital Materno Infantil Presidente Vargas |
| IC | Intervalo de Confiança de 95% |
| IG | Idade Gestacional |
| INF – γ | <i>Interferon γ</i> |
| ITAMs | <i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i> |
| ITIMs | <i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs</i> |
| ITU | Infecção do Trato Urinário |
| KIR | <i>Killer cell immunoglobulin-like receptors</i> |

| | |
|---------------|--|
| L | <i>Long</i> |
| MHC | Complexo Principal de Histocompatibilidade (<i>Major Histocompatibility Complex</i>) |
| NICU | <i>Neonatal Intensive Care Unit</i> |
| NK | <i>Natural Killer Cell</i> |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PE | Pré-eclâmpsia |
| PIG | Pequeno para Idade Gestacional |
| PN | Peso de nascimento |
| PT | Pré-termo |
| RN | Recém-nascido |
| RNBP | Recém-nascido de Baixo Peso |
| RNMBP | Recém-nascido de Muito Baixo Peso |
| RX | Raio X |
| S | <i>Small</i> |
| SCUP | Sangue de Cordão Umbilical e Placentário |
| SGA | <i>Small for Gestational Age</i> |
| SPSS | <i>Statistical Package for the Social Sciences</i> |
| SSO | <i>Sequence-specific Oligonucleotides</i> |
| SSP | <i>Sequence-specific Primers</i> |
| STORCH | Sífilis, Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes |
| TAE | Tampão Tris-Acetato-EDTA |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |

| | |
|-------------|----------------------------------|
| UM | Última menstruação |
| UTI | Unidade de Tratamento Intensivo |
| UV | Ultra Violeta |
| VLBW | <i>Very Low Birth Weight</i> |
| VM | Ventilação Mecânica |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |

* Algumas siglas foram mantidas na sua versão original em inglês, por serem assim internacionalmente conhecidas.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 17 |
| 3. JUSTIFICATIVA..... | 26 |
| 4. OBJETIVOS..... | 27 |
| 4.1 Geral | 27 |
| 4.2 Específicos | 27 |
| 5. METODOLOGIA | 28 |
| 5.1 Delineamento..... | 28 |
| 5.2 Viabilidade | 28 |
| 5.3 Logística..... | 28 |
| 5.4 Critérios de inclusão | 29 |
| 5.5 Critérios de exclusão | 29 |
| 5.6 Número de pacientes | 29 |
| 5.7 Variáveis em estudo..... | 30 |
| 5.8 Amostra..... | 31 |
| 5.9 Análise estatística | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 5.10 Aspectos Éticos | 33 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 35 |
| 7. ARTIGO | 43 |
| 7.1 Artigo Original (Português) | 43 |
| 7.2 Artigo Original (Inglês)..... | 61 |
| 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 78 |
| ANEXOS | 79 |

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do sistema imunológico é caracterizado por diversos eventos que se iniciam muito cedo na vida fetal (KOTIRANTA-AINAMO et al., 1999). Recém-nascidos (RN), em especial os muito prematuros, não apresentam um sistema imune totalmente competente (JURETIC et al., 2001; PEREZ et al., 2007). O não alcance da maturidade antes do nascimento torna evidente o despreparo desses bebês para a vida fora do útero (DREWS et al., 1995).

Recém-nascidos de muito baixo peso (RNMBP) enfrentam maior risco de infecções (GEFFERS et al., 2008). Na maioria das vezes essas crianças são internadas em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) o que, juntamente à imaturidade imunológica, compõe um cenário próprio para o desenvolvimento de doenças infecciosas (BENJAMIN; STOLL, 2006).

As infecções neonatais trazem grandes preocupações, pois elas aumentam a probabilidade de complicações e prolongam o tempo de internação, aumentando o risco de mortalidade (BENJAMIN; STOLL, 2006).

A atividade das células Natural Killer (NK) em RN de muito baixo peso é diminuta e está associada a uma maior susceptibilidade a agentes infecciosos (MCDONALD et al., 1992).

As células Natural Killer (NK) são linfócitos capazes de mediar a resposta do sistema imune inato contra células infectadas por vírus e células malignas transformadas. Portanto, possuem capacidade de matar tumores ou

células infectadas por vírus, podendo provocar um ataque direto às células alvo (ROBERTSON; RITZ, 1990; YAN et al., 1998).

Quando a expressão do HLA (*Human leukocyte antigen*) de classe I está diminuída, a célula NK pode ser ativada levando à morte da célula alvo. A célula NK é regulada por um balanço entre os sinais gerados a partir de receptores de ativação e de receptores de inibição (MORETTA et al., 1990; VAN KAER, 2007).

Estes receptores são chamados de *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIR) e assemelham-se às imunoglobulinas presentes na superfície celular. Estão localizados no braço longo do cromossomo 19, sendo expressos nas células NK e em alguns linfócitos T. São divididos em grupos funcionais inibidores e ativadores e conforme a interação com seus respectivos ligantes podem gerar ou evitar a lise da célula alvo (SUTO et al., 1996; RAJALINGAM et al., 2001).

O presente trabalho tem como objetivo estudar a associação dos genes KIR e HLA com a baixa imunidade dos recém-nascidos pré-termos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Células NK (*Natural Killer*)

As células *Natural Killer* (NK) são linfócitos que diferem das células T e B, pois são morfologicamente maiores, apresentam citoplasma granular e marcadores de superfície CD16 e CD56 (MCDONALD et al., 1992; GEORGESON et al., 2001; VILCHES; PARHAM, 2002; ; PARHAM, 2005; JOBIM, 2008; ABBAS et al., 2008). Fazem parte do sistema imune inato e representam de 10 a 20% das células mononucleares do sangue periférico e do baço, sendo raras em outros órgãos linfoides (JOBIM, 2008; ABBAS et al., 2008). São capazes de mediar a resposta do sistema imune inato contra células infectadas virais e células malignas transformadas. Portanto, possuem habilidade de matar tumores ou células infectadas por vírus e bactérias. Deste modo, durante a resposta imune, elas podem provocar um ataque direto às células-alvo e interagir com as células dendríticas em tecidos periféricos inflamados (MCDONALD et al., 1992; GEORGESON et al., 2001; VILCHES; PARHAM, 2002; ; PARHAM, 2005). Suas atividades citotóxicas e citolíticas são mediadas por citocinas inflamatórias (LEAVY, 2012), perforinas, granzimas e interferon γ (INF- γ) (Jobim, 2008).

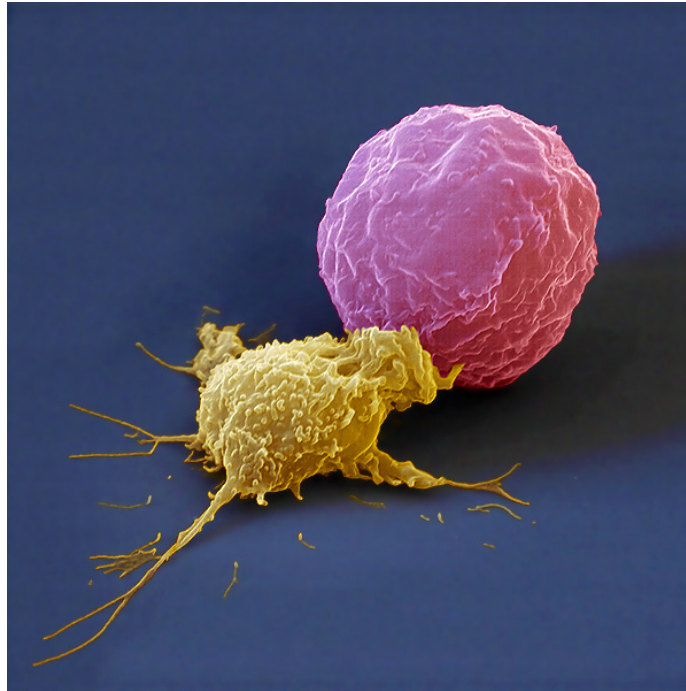


Figura1: Célula NK (amarelo) atacando célula tumoral (rosa). (Fonte: Eye of Science Photo Researchers, Inc.)

A atividade da célula NK é regulada por um balanço entre os sinais gerados a partir de receptores de ativação e receptores de inibição. Os receptores de inibição reconhecem as moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe I, que são expressas geralmente em células saudáveis do corpo, mas normalmente não são expressas por células infectadas ou cancerosas. Células potencialmente perigosas são atacadas quando a expressão do MHC está diminuída ou ausente (ABBAS, 2008).

A vigilância imunológica pode ser realizada pelas células NK, tanto pela expressão enfraquecida ou nula de moléculas HLA nas células alvo, quanto pelo desequilíbrio entre os sinais inibidores e ativadores mediados por receptores existentes nas células NK, conhecidos como *killer immunoglobulin-like receptors* (KIR). Essas moléculas importantes na destruição de células anormais são a expressão de um grupo de genes conhecido como genes KIR (JOBIM, 2008).

2.2 Receptores KIR

Os receptores KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) são representantes da família das imunoglobulinas presentes na superfície celular, sendo expressos nas células NK e em alguns linfócitos T (BARTEN et al., 2001). Estão localizados no cromossomo 19 (19q13.4) e são divididos em grupos funcionais inibitórios (evitam a lise da célula alvo) e ativadores (causam a lise da célula alvo) (WENDE et al., 1999; PARHAM, 2004).

Os receptores KIR são resultado da expressão de um sistema genético muito polimórfico, existindo atualmente mais de 17 genes (DUPONT et al., 1997; HSU et al., 2002).

2.2.1 Nomenclatura KIR

A nomenclatura dos receptores KIR é determinada de acordo com sua estrutura protéica intra e extracelular (Figura 2). Essas moléculas apresentam-se com dois ou três domínios extracelulares (2D e 3D), usados para ligarem-se ao sistema HLA, uma porção transmembrana (TM) e uma cauda intracitoplasmática, que pode ser curta (S ou *short*) e longa (L ou *long*) (SELVAKUMAR et al., 1997; VILCHES et al., 2000; JOBIM, 2008).

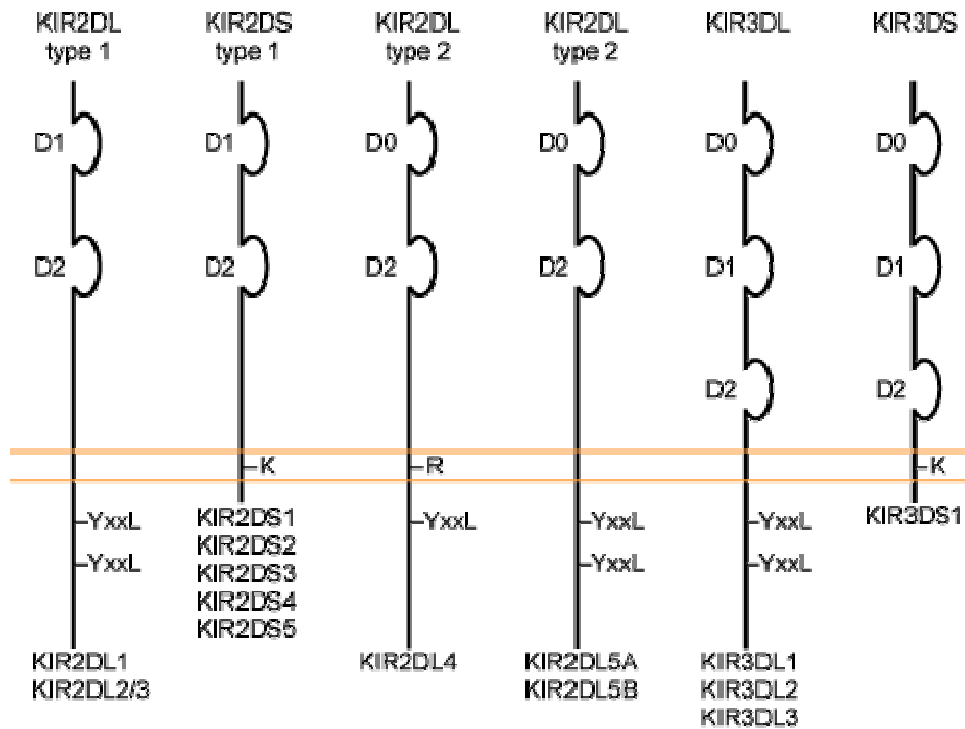


Figura 2: Domínios dos genes KIR

Os receptores das células NK que possuem cadeias citoplasmáticas curtas (caracterizado pela letra “S”) transmitem sinais ativadores através da sua interação com o DAP-12 (adaptador da molécula), que contém motivos moleculares ativadores (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs* – ITAMs). A cadeia citoplasmática longa (caracterizado pela letra “L”) tem 2 motivos moleculares inibitórios (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs* – ITIMs) que iniciam a inibição das células NK e células T com atividade citotóxica pelo recrutamento de fosfatases da tirosina (HSU et al., 2002).

2.2.2 Haplótipos A e B

Os genes KIR são herdados em haplótipos, ou seja, em blocos no mesmo cromossomo. Embora exista um grande número de haplótipos KIR, alguns são mais prevalentes, entre eles os haplótipos “A” e “B” (figura 1). O haplótipo “A” apresenta menos genes e tem como característica a dominância dos genes que inibem os receptores. Haplótipo “A” se define pela presença do KIR2DL1 e KIR2DL3 e, simultaneamente, a ausência do KIR2DL2. Já o tipo “B”, possui mais genes que codificam a ativação destes receptores. Haplótipo “B” se define pela presença do KIR2DL2 e ausência do KIR2DL1 e KIR2DL3. Embora se saiba que existe uma série de outros haplótipos, a literatura fala basicamente dos mais prevalentes, o “A” e o “B” (MARTIN et al., 2004; JOBIM, 2008).

O KIR possui alguns genes chamados “estruturais” ou de “moldura” (*frameworks*). Estes genes estão presentes em quase 100% da população e são eles: 2DL4, 3DL2, 3DL3 e 3DP1 (JOBIM, 2008).

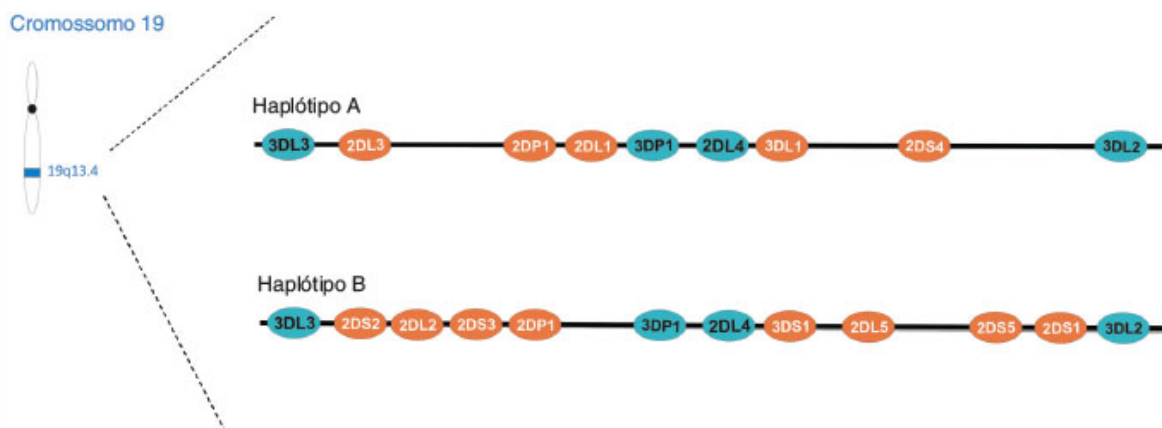


Figura 3: Haplótipos A e B.

2.2.3 Ligantes dos receptores KIR

A atividade da célula NK é parcialmente controlada pela interação entre o receptor KIR das células NK e seus respectivos ligantes HLA de classe I (SAWICKI et al., 2001). Como já foi citado, existem dois tipos de KIR's, os ativadores e os inibidores. O tipo inibidor (L) tem como característica uma longa (*long*) cauda citoplasmática, já os ativadores carregam o símbolo S, devido à cauda mais curta (*short*). Sendo assim, a ausência e a presença dos ligantes inibidores e ativadores pode ser de grande importância na patogênese de doenças. Podendo diminuir ou aumentar atividade da célula NK, melhorando ou piorando variadas doenças em que o papel da imunidade inata é de grande importância (PARHAM, 2005).

As células NK reconhecem as moléculas de HLA de classe I clássicas (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e não clássicas (HLA-E e HLA-G), presentes nas células, por intermédio desta família de receptores de superfície envolvida na sua atividade citolítica (figura 3). O quadro 1 mostra os genes KIR inibidores e ativadores e seus respectivos ligantes (WINTER, 1998; BOYINGTON et al., 2000; PARHAM, 2004; NORMAN; PARHAM, 2005).

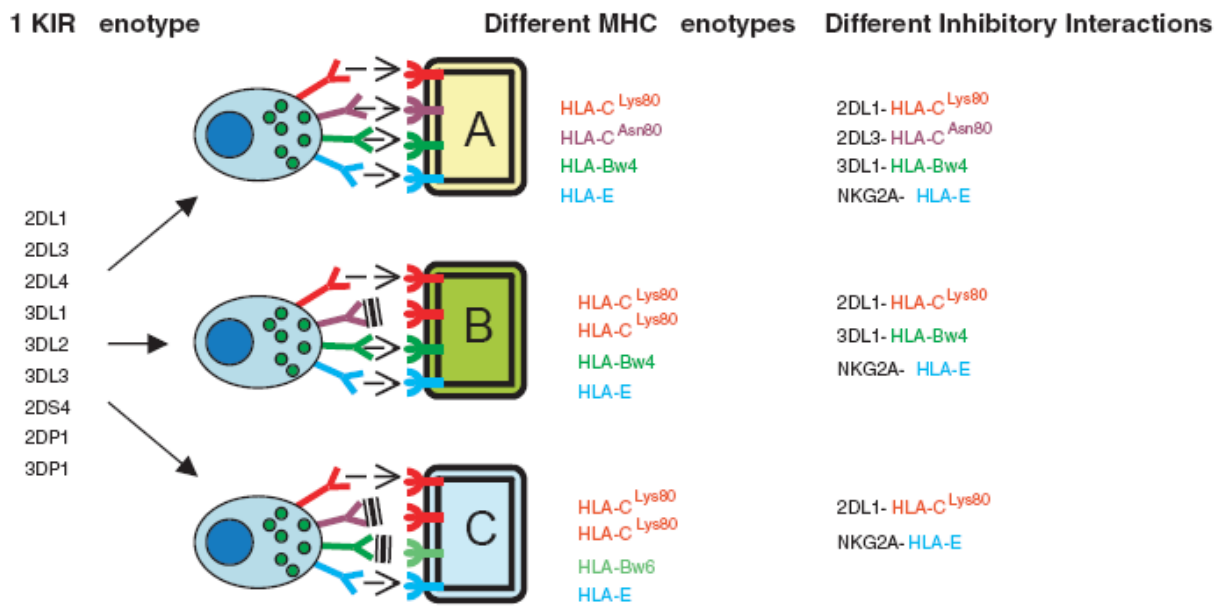


Figura 4: Interação dos receptores KIR com as moléculas de HLA

Quadro 1: Correspondência entre KIR e seus ligantes HLA

| KIR (inibidor) | Ligante HLA |
|-----------------------|---------------------------|
| KIR2DL2 e KIR2DL3 | C1 (Cw 1, 3, 7, 8, 13,14) |
| KIR2DL1 | C2 (Cw 2, 4, 5, 6, 17,18) |
| KIR3DL1 | Bw4 |

| KIR (ativador) | Ligante HLA |
|-----------------------|---------------------------|
| KIR2DS2 | C1 (Cw 1, 3, 7, 8, 13,14) |
| KIR2DS1 | C2 (Cw 2, 4, 5, 6, 17,18) |

2.3 Prematuridade

Define-se como parto prematuro aquele cuja gestação termina antes da 37ª semana ou antes dos 257 dias após o primeiro dia da última menstruação (UM) (RAMOS et al., 2006; WHO, 2012).

Quanto ao peso de nascimento (PN), os recém-nascidos podem ser definidos como baixo peso (<2500g), muito baixo peso (<1500g) e extremo baixo peso (1000g) (RAMOS et al., 2006; STOLL, 2004). Peso de nascimento e idade gestacional (IG) quando associados, classificam os recém-nascidos em pequenos (PIG), adequados (AIG) e grandes (GIG) para idade gestacional. PIG apresentam PN abaixo do percentil 10 para sua IG. GIG possuem PN acima do percentil 90 para sua IG. Já os recém-nascidos com peso entre os percentis 10 e 90 são considerados AIG (RAMOS et al., 2006).

O nascimento pré-termo continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre neonatos (RADES et al.,2004; RAMOS et al., 2006; SILVEIRA et al., 2008; WHO, 2012). A prematuridade é a primeira causa de mortalidade entre recém-nascidos e a segunda entre crianças menores que cinco anos (WHO, 2012). Dentre as complicações mais comuns, estão: síndrome do desconforto respiratório, asfixia, hemorragia intracraniana, sepse (RADES et al.,2004), retinopatia da prematuridade e enterocolite necrosante (OLIVEIRA et al., 2006).

Nascer prematuro, PIG e consequentemente com baixo peso, também são causas indiretas importantes de mortes neonatais. A prevalência global de baixo peso ao nascer é de 15,5%, o que equivale a cerca de 20 milhões de RNBP nascidos a cada ano, 96,5% deles em países em desenvolvimento, como o Brasil (WHO, 2012).

Recém-nascidos prematuros são muito delicados e tal vulnerabilidade se dá principalmente por duas razões: as freqüentes intervenções médicas, que interferem nas suas barreiras naturais de proteção (VM, acessos intra-venosos, etc), e a sua imaturidade imunológica (SHARMA et al., 2012; STRUNK et al., 2011).

A susceptibilidade à infecções ocorre porque a resposta imune inata, que é essencial para proteção contra infecções no início da vida, é deficiente no recém-nascido, em especial nos prematuros. A incidência de infecções em recém-nascidos é, por muitas vezes, dependente da idade gestacional (IG) e do peso de nascimento dessas crianças, atingindo principalmente os prematuros extremos (IG \leq 28 semanas) (SHARMA et al., 2012).

3. JUSTIFICATIVA

Diversos estudos evidenciam que as células *Natural Killer* e os genes KIR têm importante relação com grande parte das doenças infecciosas. A identificação de polimorfismos dos genes KIR e HLA de Classe I em recém-nascidos de muito baixo peso poderia facilitar a compreensão da função das células NK no desenvolvimento de infecções recorrentes durante o período pós-natal.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Investigar o polimorfismo dos genes KIR e HLA classe I do sangue de cordão umbilical em recém-nascidos de muito baixo peso, AIG (Adequados para Idade Gestacional) e PIG (Pequenos para Idade Gestacional) comparando com RN de termo normais.

4.2 Específicos

- Avaliar a frequência dos diversos polimorfismos dos genes KIR através do método PCR-SSO, em recém-nascidos PIG de muito baixo peso e AIG de muito baixo peso e de termo normais;
- Avaliar a frequência dos diversos polimorfismos dos genes HLA classe I (C1, C2 e Bw4) através do método PCR-SSP em recém-nascidos PIG de muito baixo peso e AIG de muito baixo peso e de termo normais.

5. METODOLOGIA

5.1 Delineamento

Estudo transversal incluindo 60 recém-nascidos pré-termos e 94 controles a termo nascidos em dois hospitais terciários de Porto Alegre, Brasil no período de fevereiro de 2011 a janeiro de 2013.

5.2 Viabilidade

Este estudo será desenvolvido com a colaboração dos Serviços de Imunologia e Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Ambos são referência há mais de 30 anos na área do ensino e da pesquisa. Atualmente, no HCPA estão sendo desenvolvidas pesquisas com recém-nascidos de muito baixo peso e também com os genes KIR, porém não há estudos correlacionando os assuntos.

5.3 Logística

Após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) serão coletados dois tubos de sangue (4ml) do cordão umbilical do recém-nascido. Esta amostra será armazenada e será feita uma avaliação das condições do bebê ao nascer com o preenchimento de um Instrumento de Coleta de Dados (Anexo 2).

Em seguida, as amostras coletadas serão levadas ao Laboratório de Imunologia do HCPA para processamento (extração de DNA, PCR e análise).

Os dados obtidos serão armazenados em um “Banco de Dados”, no qual constarão todas as informações referentes à criança.

5.4 Critérios de inclusão

- Recém-nascidos pré-termos;
- Para o grupo controle, foram incluídos recém-nascidos de termo normais;

5.5 Critérios de exclusão

- Recém-nascidos com malformações congênitas, infecções congênitas do grupo STORCH, recém-nascidos de mães HIV positivas, recém-nascidos de mães com infecção bacteriana peri-parto comprovada.

5.6 Número de pacientes

Para o cálculo do tamanho da amostra, consideramos a diferença de prevalência dos genes KIR como descrito em um estudo anterior (Salim et al 2010;. Sung et al 2011). Assumindo nível de 5% de significância, poder de 90% e um 1,8 de risco relativo (RR), uma amostra total de, pelo menos, 148 prematuros e recém-nascidos a termo foi exigido.

5.7 Variáveis em estudo

As variáveis analisadas no estudo foram as seguintes: idade gestacional (em semanas, definida pela melhor estimativa obstétrica por ultrassom no primeiro trimestre), peso de nascimento, tipo de parto (vaginal ou cesariana), sexo, comprimento (cm), perímetro cefálico (cm), uso de corticóide pré-natal, pré-eclampsia materna (definida por pressão arterial maior que 140 x 90 mmHg após a vigésima semana de gestação acompanhada por edema e proteinúria significativa), sepse precoce (hemocultura positiva nas primeiras 72 horas de vida em recém-nascido com achados clínicos de infecção), sepse tardia (hemocultura positiva após as 72 horas de vida em recém-nascido com achados clínicos de infecção), índice de Apgar no 1º e 5º minutos de vida, infecção do trato urinário materno no momento do parto (urocultura positiva), pneumonia do RN, uso de ventilação mecânica, enterocolite necrosante (RX com presença de pneumatose intestinal acompanhada por perfuração ou não de alça intestinal), dias de internação, reinternação, adequação peso/idade gestacional (Curva de Alexander et al., 1996), tempo de bolsa rota (horas), óbito na UTI neonatal, polimorfismo dos genes KIR e HLA.

5.8 Amostra

Extração de DNA

Amostras de sangue de cordão umbilical foram coletadas de cada RN, através de punção venosa, em tubos vacutainer contendo EDTA como anticoagulante. Essas amostras foram centrifugadas para obtenção da camada de leucócitos, a partir da qual o DNA foi extraído, usando o método de Salting-out (MILLER et al., 1988).

Tipagem KIR por PCR-SSO

Os genes KIR foram tipados pelo método de PCR-SSO (RSSOKIR-One Lambda) que identifica a presença ou ausência de 16 genes.

Para amplificação do DNA, preparou-se uma mistura padrão contendo tampão para PCR, dNTPs, primers específicos, Taq polimerase, DNA genômico (20-100 ng/ μ l), e adicionou-se no termociclador.

As condições de temperatura para a reação de PCR foram de 3 minutos de desnaturação a 96°C, seguidos de 5 ciclos de 20s a 96°C, 20s a 60°C e 20s a 72°C. Após 30 ciclos de 10s a 96°C, 15s a 60°C e 20s a 72°C e finalmente um estágio de extensão a 72°C por 10 minutos.

O produto amplificado foi hibridizado com sondas complementares ao DNA e marcado com fluorescência para que fosse possível a leitura no aparelho Luminex. A análise dos resultados foi feita no software HLA Fusion Research, o qual fez a coleta dos dados e a determinação dos genes.

Tipagem HLA por PCR-SSP

A tipagem HLA classe I foi realizada pelo método de PCR-SSP baseado em primers (sequência específica), como descrito em estudos anteriores (BUNCE et al., 1995; JONES et al., 2006).

A amplificação do DNA foi feita através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os primers utilizados para a amplificação foram:

| Gene | Sense (5'- 3') | Anti sense (5'- 3') |
|----------------|--|----------------------------|
| HLA-C1 | CCG CGA GTC CGA GAG GGG GCC GCG AGT CCA AGA GG | CGC GCA GTT TCC GCA GGT |
| HLA-C2 | CCG CGA GTC CGA GAG GGG GCC GCG AGT CCA AGA GG | GCG CAG GTT CCG CAG GC |
| HLA-Bw4 | GGA CCT GCG GAC CCT GCT GAG CCT GCG GAC CCT GCT CCT GCG CAC CGC GCT CC | GCC CAC TTC TGG AAG GTT CT |

Para a amplificação do DNA foi utilizada uma mistura com 1µL de Tampão 10x, 0,3 µL de MgCl₂ 50mM, 0,08µL de dNTP's 25mM, 0,05µL de taq polimerase, 10ng de DNA, 100mM de controle interno e 500mM de primer específico.

A temperatura inicial para amplificação foi 96°C durante 1 minuto, seguido de 5 ciclos de 20s a 96°C, 45s a 70°C e 45s a 72°C. Após 21 ciclos de 25s a 96°C, 50s a 65°C, 30s a 72°C. Em seguida, 4 ciclos de 30s a 96°C, 60s a 55°C, 90s a 72°C e, finalmente 1 ciclo de 1 min. a 20°C.

O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão acetato tris EDTA. A corrida eletroforética durou 20 minutos à 200V, em temperatura ambiente. As bandas foram visualizadas em luz UV através da coloração do brometo de etídio.

Para fazer o gel, diluiu-se 4,5g de agarose em 450mL de TAE 1X e aquecido sem deixar ferver. Foi colocado em banho-maria por 30 minutos, adicionado 10 μ L de brometo de etídio e colocado na cuba de eletroforese. Após o gel adquirir uma consistência firme, aplicou-se 15 μ L da amplificação com 8 μ L do corante Orange G.

5.9 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Diferenças nas frequências de genes foram comparadas entre recém-nascidos prematuros e a termo por meio do teste exato de Fisher. Os valores de “p” foram ajustados usando a correção de Holm para comparações múltiplas. Para análise estratificada, utilizamos a regressão logística múltipla.

5.10 Aspectos Éticos

Para a realização deste estudo, foram utilizadas somente amostras do sangue de cordão umbilical, o que não exigiu manipulação alguma do recém-nascido. Foi solicitada a autorização dos pais ou responsáveis através da

assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 1), sendo que estes receberam uma cópia do documento.

Este projeto foi submetido à aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Hospital Materno Infantil Presidente Vargas antes de ser iniciado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A., Lichtmann A., Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6ª ed. Rio de Janeiro; Elsevier Brasil, 2008.

Alexander GR, Himes JH, Kaufman RB, Mor J, Kogan M. A United States national reference for fetal growth. *Obstet Gynecol* 1996; 87: 163-8.

Barten R, Torkar M, Haude A, Trowsdale J, Wilson MJ. Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors. *Trends Immunol* 2001; 22:52-7.

Benjamin Jr. DK, Stoll BJ. Infection in Late Preterm Infants. *Clin Perinatol* 2006; 33:871-882.

Boyington JC, Motyka SA, Schuck P, Brooks AG, Sun PD. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature* 2000; 405:537-43.

Bunce, M., O'Neill CM, Barnardo MC, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, *et al.* Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens*. 1995; 46:355-367.

Drews MB, Ludwig AC, Leititis JU, Daschner FD. Low birth weight and nosocomial infection of neonates in a neonatal intensive care unit. *Journal of Hospital Infection* 1995; 30:65-72.

Dupont B, Selvakumar A, Steffens U. The killer cell inhibitory receptor genomic region on human chromosome 19q.13.4. *Tissue Antigens* 1997; 49:557-563.

Geffers C, Baerwolff S, Schwab F, Gastmeier P. Incidence of healthcare-associated infections in high-risk neonates: results from the German surveillance system for very-low-birthweight infants. *Journal of Hospital Infection* 2008; 68:214-221.

Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Kovacs A, Kovacs A, Laszlo A. Natural killer cell cytotoxicity is deficient in newborns with sepsis and recurrent infections. *Eur J Pediatr* 2001; 160:478-482.

Hsu K C, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002; 190:40-52.

Jobim, M; Jobim L. F. Natural killer cells and immune surveillance. *J Pediatr (Rio J)*. 2008;84(4 Suppl): S58-67.

Jones DC, Edgar RS, Ahmad T, Cummings JR, Jewell DP, Trowsdale J, et al. Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combinations in ulcerative colitis susceptibility. *Genes Immun.* 2006; 7:576-82.

Juretic E, Juretic A, Uzarevic B, Petroveckii M. Alterations in Lymphocyte Phenotype of Infected Preterm Newborns. *Biol Neonate* 2001; 80:223-227.

Kotiranta-Ainamo A, Apajasalo M, Pohjavuori M, Rautonen N, Rautonen J. Mononuclear cell subpopulations in preterm and full-term neonates: independent effects of gestational age, neonatal infection, maternal pre-eclampsia, maternal betamethason therapy, and mode of delivery. *Clin Exp Immunol* 1999; 115:309-314.

Leavy, O. Natural Killer Cells: Maturation and function of NK cells. *Nature Reviews Immunology.* 2012.

Martin AM, Kulski JK, Gaudieri S, Witt CS, Freitas EM, Trowsdale J, et al. Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. *Gene* 2004; 335:121-31.

McDonald T, Sneed J, Valenski WR, Dockter M, Cooke R, Herrod HG. Natural Killer Cell Activity in Very Low Birth Weight Infants. *Pediatr Research* 1992; 31:376-380.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.

Moretta A, Tambussi G, Bottino C, Tripodi G, Merli A, Ciccone E, et al. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3- CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. *J Exp Med* 1990;171:695-714.

Norman PJ, Parham P. Complex interactions: the immunogenetics of human leukocyte antigen and killer cell immunoglobulin-like receptors. *Semin Hematol* 2005; 42:65-75.

Oliveira CA, Lins CP, Sá RAM, Chaves Netto H, Bornia RG, Silva NR, et al. Síndromes hipertensivas da gestação e repercussões perinatais. *Rev Bras Saude Matern Infant*.2006;6(1):93-8.

Parham P. Influence of KIR diversity on human immunity. *Adv Exp Med Biol* 2005; 560:47-50.

Parham P. Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. *Immunol Lett* 2004; 92:11-3.

Perez A, Gurbindo MD, Resino S, Aguaron A, Munoz-Fernandez MA. NK Cell Increase in Neonates from the Preterm to the Full-Term Period of Gestation. *Neonatology* 2007; 92:158-163.

Rades, E; Bittar, RE, Zugaib, M. Determinantes diretos do parto prematuro eletivo e os resultados neonatais. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2004; 26 (8), 655-662.

Rajalingam R, Hong M, Adams EJ, Shum BP, Guethlein LA, Parham P, Short KIR haplotypes in pygmy chimpanzee (Bonobo) resemble the conserved framework of diverse human KIR haplotypes. *J Exp Med* 2001;193:135–46.

Ramos JGL, Martins-Costa SH, Valério EG, Müller ALL. Nascimento pré-termo. In: Freitas F, Martins-Costa SH, Ramos JGL, Magalhães JA, Rotinas em obstetrícia. *Artmed*: 2006. C. 6. 78-90.

Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990;76:2421-38.

Salim PH, Jobim M, Bredemeier M, Chies JA, Schlottfeldt J, Brenol JC, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes in systemic sclerosis. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology* 2010; 160:325-330.

Sawicki MW, Dimasi N, Natarajan K, Wang J, Margulies DH, Mariuzza RA. Structural basis of MHC class I recognition by natural killer cell receptors. *Immunol Rev* 2001; 181:52-65.

Selvakumar A, Steffens U, Dupont B. Polymorphism and domain variability of human killer cell inhibitory receptors. *Immunol Rev* 1997; 155:183-96.

Sharma AA, Jen R, Butler A, Lavoie PM. The developing human preterm neonatal immune system: a case for more research in this area. *Clin Immunol*. 2012 Oct;145(1):61-8.

Silveira, MF; Santos IS, Barros AL, Matijasevich A, Barros FC, Victora CG. Aumento da prematuridade no Brasil: revisão de estudos de base populacional. *Revista de Saúde Pública*. 2008; 42 (5), 957-964.

Stoll B (2004). Overiw of Mortality and Morbidity. In RM Kliegman; HB Jenson; BF Stanlon & RE Behrman (orgs). *Nelson textbook of pediatricts*. (671-675) Philadelphia: Saunder Elsevier.

Strunk T, Currie A, Richmond P, Simmer K, Burgner D. Innate immunity in human newborn infants: prematurity means more than immaturity. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011 Jan;24(1):25-31.

Suto Y, Maenaka K, Yabe T, Hirai M, Tokunaga K, Tadok K, et al. Chromosomal localization of the human natural killer cell class I receptor family genes to 19q13.4 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1996;35:270-2.

Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol* 2007;19:354-64.

Vilches C, Pando MJ, Parham P. Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D2 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain. *Immunogenetics* 2000; 51:639-4.

Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:217-51.

Wende H, Colonna M, Ziegler A, Volz A. Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4. *Mamm Genome* 1999; 10:154-60.

Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol* 1998; 161:571-7.

World Health Organization, Maternal, newborn, child and adolescent health [internet]. WHO and partners – The Partnership for Maternal, Newborn & Child Health, Save the Children, and the March of Dimes – published a report Born Too Soon: The global action report on preterm birth that included the first ever estimates of preterm birth by country. 2012. Available from: http://www.who.int/maternal_child_adolescent/topics/newborn/care_of_preterm/en/ [accessed 30April 2014].

Yan Y, Steinherz P, Klingemann HG, Dennig D, Childs BH, McGuirk J, et al. Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clin Cancer Res* 1998;4:2859-68.

7. ARTIGO

7.1 Artigo Original (Português)

Estudos de polimorfismos dos genes KIR e HLA em sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) de recém-nascidos a termo e pré-termo

Fernanda Marquezotti, Rita C Silveira, Pâmela Portela, Mariana Jobim Wilson, Luiz Fernando Job Jobim, Renato Soibelman Procianny

Resumo

Background. O nascimento pré-termo permanece sendo grande causa de mortalidade neonatal. A vulnerabilidade dos prematuros se dá principalmente pelas freqüentes intervenções médicas e por sua imaturidade imunológica. As infecções neonatais aumentam a probabilidade de complicações e prolongam o tempo de internação, aumentando o risco de mortalidade. A atividade das células Natural Killer (NK) em recém-nascidos prematuros está reduzida e associada com maior susceptibilidade a agentes infecciosos. As células NK são capazes de mediar a resposta do sistema imune inato contra células infectadas por vírus e células malignas transformadas, podendo provocar um ataque direto às células alvo. Os principais receptores das células NK são os KIR ou killer immunoglobulin-like-receptors que reconhecem moléculas de HLA classe I.

Objetivo. Investigar o polimorfismo dos genes KIR e HLA de classe I nos recém-nascidos pré-termos de muito baixo peso em comparação com recém-nascidos a termo.

Métodos. Foram genotipados 154 recém-nascidos, 60 pré-termo e 94 a termo, para 16 genes KIR e seus ligantes HLA pelos métodos PCR SSO e PCR SSP, respectivamente.

Resultados. Há diferença estatisticamente significativa ($P < 0.0001$) entre recém-nascidos pré-termo e a termo para o gene KIR2DS4, sendo menos freqüente no grupo de recém-nascidos pré-termos.

Conclusões. A menor frequência do KIR2DS4 sugere uma imunidade natural deficiente nesse grupo de recém-nascidos prematuros

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do sistema imunológico é caracterizado por diversos eventos que se iniciam muito cedo na vida fetal¹. Recém-nascidos prematuros não apresentam um sistema imune totalmente competente, tornando-os vulneráveis a infecções, especialmente, os recém-nascidos de muito baixo peso (RNMBP)^{2,3,4,5}. As infecções neonatais aumentam a probabilidade de complicações e prolongam o tempo de internação, aumentando o risco de mortalidade⁶.

A atividade das células Natural Killer (NK) em RNMBP está reduzida e associada com maior susceptibilidade a agentes infecciosos⁷. Essas células são linfócitos capazes de mediar a resposta do sistema imune inato contra células infectadas por vírus e células malignas transformadas, podendo provocar um ataque direto às células alvo^{7,8,9,10}. Quando a expressão do HLA (Human Leukocyte Antigen) de classe I está diminuída ou ausente, a célula NK pode ser ativada levando à lise da célula infectada. A célula NK é regulada por um balanço entre os sinais gerados a partir de receptores de ativação e de

inibição^{11,12}. Estes receptores são chamados de killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) e assemelham-se às imunoglobulinas presentes na superfície celular. Os genes KIR estão localizados no braço longo do cromossomo 19, sendo expressos nas células NK e em alguns linfócitos T. São divididos em grupos funcionais inibidores e ativadores e conforme a interação com seus respectivos ligantes podem ativar ou inibir a lise da célula alvo^{13,14}.

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de investigar o polimorfismo dos genes KIR e HLA de classe I nos recém-nascidos pré-termos de muito baixo peso em comparação com recém-nascidos a termo.

MATERIAIS E MÉTODOS

População

Estudo transversal incluindo 60 recém-nascidos pré-termos e 94 controles a termo nascidos em dois hospitais terciários de Porto Alegre, Brasil no período de fevereiro de 2011 a janeiro de 2013. Foram excluídos da amostra recém-nascidos com malformações congênitas, infecções congênitas do grupo STORCH, filhos de mães HIV positivas ou com infecção bacteriana peri-parto comprovada.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa das duas Instituições participantes. Foram utilizadas somente amostras do sangue de cordão umbilical, o que não exigiu a manipulação do recém-nascido. A autorização dos pais ou responsáveis foi concedido através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Variáveis

As variáveis analisadas no estudo foram as seguintes: idade gestacional (em semanas, definida pela melhor estimativa obstétrica por ultrassom no primeiro trimestre), peso de nascimento, tipo de parto (vaginal ou cesariana), sexo, comprimento (cm), perímetro cefálico (cm), uso de corticóide pré-natal, pré-eclampsia materna (definida por pressão arterial maior que 140 x 90 mmHg após a vigésima semana de gestação acompanhada por edema e proteinúria significativa), sepse precoce (hemocultura positiva nas primeiras 72 horas de vida em recém-nascido com achados clínicos de infecção), sepse tardia (hemocultura positiva após as 72 horas de vida em recém-nascido com achados clínicos de infecção), índice de Apgar no 1º e 5º minutos de vida, infecção do trato urinário materno no momento do parto (urocultura positiva), pneumonia do RN, uso de ventilação mecânica, enterocolite necrosante (RX com presença de pneumatose intestinal acompanhada por perfuração ou não de alça intestinal), dias de internação, reinternação, adequação peso / idade gestacional (Curva de Alexander et. al.¹⁵), tempo de bolsa rota (horas), óbito na UTI neonatal, polimorfismo dos genes KIR e HLA.

Logística

A amostra de sangue total foi devidamente armazenada sob refrigeração (entre 6° e 8°C) enquanto realizava-se a avaliação das condições do recém-nascido ao nascer, com o preenchimento do Instrumento de Coleta de Dados. O tempo médio de armazenamento das amostras pré-teste foi de 15 dias. Em seguida, o material foi processado e analisado no Laboratório de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Processamento das amostras de sangue

Extração de DNA

Amostras de sangue de cordão umbilical foram coletadas através de punção venosa, em tubos vacutainer contendo EDTA como anticoagulante, e armazenadas sob baixas temperaturas até seu processamento. Essas amostras foram centrifugadas para obtenção da camada de leucócitos, a partir da qual o DNA foi extraído, usando o método de “Salting-out”¹⁶.

Os genes KIR foram tipados pelo método de PCR-SSO (RSSOKIR-One Lambda - USA) que identifica a presença ou ausência de 16 genes.

Tipagem KIR por PCR-SSO

Para amplificação do DNA, preparou-se uma mistura padrão contendo tampão para PCR, dNTPs, primers específicos, Taq polimerase, DNA genômico (20-100 ng/μl), e levados ao termociclador.

As condições de temperatura para a reação de PCR foram: 3 minutos de desnaturação a 96°C, seguidos de 5 ciclos de 20s a 96°C, 20s a 60°C e 20s a 72°C. Após 30 ciclos de 10s a 96°C, 15s a 60°C e 20 s a 72°C e finalmente um estágio de extensão a 72°C por 10 minutos.

O produto amplificado foi hibridizado com sondas complementares ao DNA e marcado com fluorescência para que a leitura no aparelho Luminex fosse possível. A análise dos resultados foi realizada no software HLA Fusion Research, o qual coleta os dados e realiza a determinação dos genes.

Tipagem HLA por PCR-SSP

A tipagem HLA classe I foi realizada pelo método de PCR-SSP baseado em primers (sequência específica), como foi descrito em estudos anteriores^{17,18}.

A amplificação do DNA foi feita através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os primers utilizados para a amplificação foram: HLA-C1: Sense CCG CGA GTC CGA GAG GGG GCC GCG AGT CCA AGA GG (5' – 3') e Anti sense CGC GCA GTT TCC GCA GGT (5' – 3'); HLA-C2: Sense CCG CGA GTC CGA GAG GGG GCC GCG AGT CCA AGA GG (5' – 3') e Anti sense GCG CAG GTT CCG CAG GC (5' – 3'); HLA-Bw4: Sense GGA CCT GCG GAC CCT GCT GAG CCT GCG GAC CCT GCT CCT GCG CAC CGC GCT CC (5' – 3') e Anti sense GCC CAC TTC TGG AAG GTT CT (5' – 3').

Para a amplificação do DNA foi utilizado uma mistura com 1µL de Solução Tampão 10x, 0,3 µL de MgCl₂ 50mM, 0,08µL de dNTP's 25mM, 0,05µL de taq polimerase, 10ng de DNA, 100mM de controle interno e 500mM de primer específico.

A temperatura inicial para amplificação foi 96°C durante 1 minuto, seguido de 5 ciclos de 20s a 96°C, 45s a 70°C e 45s a 72°C. Após 21 ciclos de 25s a 96°C, 50s a 65°C, 30s a 72°C. Em seguida, 4 ciclos de 30s a 96°C, 60s a 55°C, 90s a 72°C e, finalmente 1 ciclo de 1 min. a 20°C.

O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão acetato tris EDTA. A corrida eletroforética durou 20 minutos à 200V, em temperatura ambiente. As bandas foram visualizadas em luz UV através da coloração do brometo de etídio.

Para fazer o gel, foi diluído 4,5g de agarose em 450mL de TAE 1X e aquecido sem deixar ferver. Foi colocado em banho-maria por 30 minutos, adicionado 10 μ L de brometo de etídio e colocado na cuba de eletroforese. Após o gel adquirir uma consistência firme, aplicou-se 15 μ L da amplificação com 8 μ L de corante Orange G.

Análise estatística

Para o cálculo do tamanho da amostra, consideramos a diferença de prevalência dos genes KIR como descrito em estudo anterior¹⁹. Assumindo nível de 5% de significância, poder de 90% e um 1,8 de risco relativo (RR), uma amostra total de, pelo menos, 148 prematuros e recém-nascidos a termo foi exigido.

Os dados foram analisados utilizando-se o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Diferenças nas frequências de genes foram comparadas entre recém-nascidos prematuros e a termo por meio do teste exato de Fisher. Os valores de “p” foram ajustados usando a correção de Holm para comparações múltiplas. Para análise estratificada, utilizamos a regressão logística múltipla.

RESULTADOS

Um total de 154 recém-nascidos foram estudados. Destes, 33(55%) eram pré-termos adequados para idade gestacional (AIG) e 27(45%) pré-termos eram pequenos para idade gestacional (PIG). Já dos recém-nascidos termo, 71(75,5%) eram AIG e 23(24,5%) PIG.

Além da menor idade gestacional e peso de nascimento, as frequências de parto cesáreo, do uso de corticóide antenatal e de pré-eclâmpsia materna foram maiores nos recém-nascidos pré-termo comparado aos seus pares a termo (tabela 1). Os demais dados clínicos são similares. A presença de sepse precoce e tardia, enterocolite necrosante, necessidade de ventilação mecânica e taxas de reinternação foi maior nos recém-nascidos pré-termo (tabela 1). As taxas de parto cesáreo e pré-eclâmpsia materna foram maiores nos pré-termo FIG, e entre os recém-nascidos a termo AIG houve maior necessidade de ventilação mecânica comparado com a termo FIG (tabela 2).

As frequências dos genes KIR e HLA em pré-termos (n=60) e a termo (n=94) foram avaliadas; sendo 16 genes KIR e 3 ligantes HLA. Observou-se que a frequência do gene ativador KIR2DS4 foi significativamente menor nos recém-nascidos pré-termo (tabela 3). No entanto, essa diferença não se mantém quando se avalia as frequências dos genes KIR e ligantes HLA em grupos de AIG e FIG pré-termo e termo, respectivamente (tabela 4).

Tabela 1. Frequência dos dados clínicos (%) e suas associações em pré-termo e a termo

| | Pré-termo (n=60) | | A termo (n=94) | | <i>valor p*</i> |
|-----------------------------------|-------------------------|--------|-----------------------|--------|-----------------|
| | N | % | N | % | |
| | média | DP | média | DP | |
| IG | 29,09 | ±3,25 | 39,43 | ±1,34 | <0,001 |
| PN | 1103,9 | ±449,4 | 3257 | ±604,1 | <0,001 |
| Tipo de Parto | | | | | |
| normal | 15 | 25 | 53 | 56,4 | <0,001 |
| cesárea | 45 | 75 | 41 | 43,6 | |
| Sexo do RN | | | | | |
| masculino | 30 | 50 | 45 | 47,9 | 0,869 |
| feminino | 30 | 50 | 49 | 52,1 | |
| Corticóide pré-parto | 47 | 78,3 | 1 | 1,1 | <0,001 |
| Pré-eclâmpsia | 24 | 40 | 4 | 4,3 | <0,001 |
| Sepse Precoce | 4 | 6,7 | 0 | 0 | 0,022 |
| Sepse Tardia | 20 | 33,3 | 0 | 0 | <0,001 |
| Infecção do Trato Urinário | 9 | 15,3 | 17 | 18,1 | 0,825 |
| Pneumonia | 2 | 3,3 | 1 | 1,1 | 0,561 |
| Ventilação Mecânica | 38 | 63,3 | 2 | 2,1 | <0,001 |
| Enterocolite Necrozante | 5 | 8,3 | 0 | 0 | 0,008 |
| Reinternação | 17 | 28,3 | 13 | 13,8 | 0,036 |
| Óbito Neo | 17 | 28,3 | 0 | 0 | <0,001 |

*Teste Exato de Fisher com correção de Holm;

Tabela 2. Frequência dos dados clínicos (%) e suas associações em AIG pré-termo x PIG pré-termo e AIG a termo x PIG a termo

| | AIG pré-termo (n=33) | | | PIG pré-termo (n=27) | | | AIG a termo (n=71) | | | PIG a termo (n=23) | | | valor p* | | |
|-----------------------------------|----------------------|-------|----|----------------------|--------|-------|--------------------|-------|----|--------------------|--------|---|----------|---|--------|
| | N | % | DP | média | DP | média | DP | média | DP | média | DP | N | | % | DP |
| IG | 28,31 | ±2,98 | | 30,04 | ±3,35 | | 39,77 | ±1,15 | | 38,59 | ±1,51 | | | | <0,001 |
| PN | 1162 | 516,4 | | 1033 | 347,51 | | 3522,6 | 419,4 | | 2438,3 | 233,45 | | | | <0,001 |
| Tipo de Parto | | | | | | | | | | | | | | | |
| normal | 12 | 36,4 | | 3 | 11,1 | | 36 | 50,7 | | 17 | 73,9 | | | | 0,058 |
| cesárea | 21 | 63,6 | | 24 | 88,9 | | 35 | 49,3 | | 6 | 26,1 | | | | |
| Sexo do RN | | | | | | | | | | | | | | | |
| masculino | 18 | 54,5 | | 12 | 44,4 | | 34 | 47,9 | | 11 | 47,8 | | | | 1,000 |
| feminino | 15 | 45,5 | | 15 | 55,6 | | 37 | 52,1 | | 12 | 52,2 | | | | |
| Corticóide pré-parto | 25 | 75,8 | | 22 | 81,5 | | 0 | 0 | | 1 | 4,3 | | | | 0,245 |
| Pré-eclâmpsia | 6 | 18,2 | | 18 | 66,7 | | 2 | 2,8 | | 2 | 8,7 | | | | 0,250 |
| Sepse Precoce | 0 | 0 | | 4 | 14,8 | | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | 1,000 |
| Sepse Tardia | 12 | 36,4 | | 8 | 29,6 | | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | 1,000 |
| Infecção do Trato Urinário | 4 | 12,5 | | 5 | 18,5 | | 11 | 15,5 | | 6 | 26,1 | | | | 0,349 |
| Pneumonia | 1 | 3 | | 1 | 3,7 | | 0 | 0 | | 1 | 4,3 | | | | 0,245 |
| Ventilação Mecânica | 22 | 66,7 | | 16 | 59,3 | | 2 | 2,8 | | 0 | 0 | | | | <0,001 |
| Enterocolite Necrozante | 2 | 6,1 | | 3 | 11,1 | | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | 1,000 |
| Reinternação | 10 | 30,3 | | 7 | 25,9 | | 12 | 16,9 | | 1 | 4,3 | | | | 0,176 |
| Óbito Neo | 9 | 27,3 | | 8 | 29,6 | | 0 | 0 | | 0 | 0 | | | | 1,000 |

*Teste Exato de Fisher com correção de Holm;

Tabela 3. Frequencia (%) dos genes *KIR*, ligantes HLA e suas associações em pré-termo e a termo

| Genes KIR e HLA | Pré-termo (n=60) | | A termo (n=94) | | valor p* |
|--------------------|------------------|--------------|----------------|--------------|----------|
| | N | % | N | % | |
| 2DL1 | 59 | 98,3 | 91 | 96,8 | 0,657 |
| 2DL2 | 30 | 50 | 53 | 56,4 | 0,508 |
| 2DL3 | 58 | 96,7 | 89 | 94,7 | 0,706 |
| 2DL4 | 60 | 100.0 | 94 | 100.0 | 1,000 |
| 2DL5 | 39 | 65 | 52 | 55,3 | 0,245 |
| 3DL1 | 52 | 86,7 | 89 | 94,7 | 0,134 |
| 3DL2 | 60 | 100.0 | 94 | 100.0 | 1,000 |
| 3DL3 | 60 | 100.0 | 94 | 100.0 | 1,000 |
| 2DS1 | 29 | 48,3 | 38 | 40,4 | 0,405 |
| 2DS2 | 24 | 40 | 48 | 51,1 | 0,190 |
| 2DS3 | 15 | 25 | 23 | 24,5 | 1,000 |
| 2DS4 | 48 | 80.0 | 91 | 96,8 | <0,001 |
| 2DP1 | 59 | 98,3 | 92 | 97,9 | 1,000 |
| 2DS5 | 29 | 48,3 | 35 | 37,2 | 0,184 |
| 3DS1 | 25 | 41,7 | 39 | 41,5 | 0,968 |
| 3DP1 | 60 | 100.0 | 94 | 100.0 | 1,000 |
| C1 | 53 | 89,8 | 81 | 86,2 | 0,618 |
| C2 | 45 | 76,3 | 71 | 75,5 | 1,000 |
| Bw4 | 34 | 57,6 | 53 | 56,4 | 1,000 |

*Teste Exato de Fisher com correção de Holm;

Grupo C1: HLA-Cw 01, 03, 07 (01-06), 08, 12 (02, 03, 06), 14, 16 (01, 03, 04)

Grupo C2 HLA-Cw 02, 04, 05, 06, 0707, 12 (04, 05), 15, 1602, 17, 18

Table 4. Frequencia (%) dos genes KIR, ligantes HLA e suas associações em em AIG pré-termo x PIG pré-termo e AIG a termo x PIG a termo

| Genes KIR e HLA | AIG pré-termo (n=33) | | PIG pré-termo (n=27) | | valor p* | | AIG a termo (n=71) | | PIG a termo (n=23) | | valor p* |
|-----------------|----------------------|--------------|----------------------|--------------|----------|---|--------------------|--------------|--------------------|--------------|----------|
| | N | % | N | % | | % | N | % | N | % | |
| 2DL1 | 32 | 97 | 27 | 100.0 | 1,000 | | 69 | 97.2 | 22 | 95.7 | 1,000 |
| 2DL2 | 16 | 48,5 | 14 | 51.9 | 1,000 | | 38 | 53,5 | 15 | 65.2 | 0,347 |
| 2DL3 | 32 | 97 | 26 | 96.3 | 1,000 | | 66 | 93 | 23 | 100.0 | 0,329 |
| 2DL4 | 33 | 100.0 | 27 | 100.0 | 1,000 | | 71 | 100.0 | 23 | 100.0 | 1,000 |
| 2DL5 | 20 | 60,6 | 19 | 70.4 | 0,587 | | 40 | 56.3 | 12 | 52.2 | 0,811 |
| 3DL1 | 26 | 78,8 | 26 | 96.3 | 0,063 | | 67 | 94,4 | 22 | 95.7 | 1,000 |
| 3DL2 | 33 | 100.0 | 27 | 100.0 | 1,000 | | 71 | 100.0 | 23 | 100.0 | 1,000 |
| 3DL3 | 33 | 100.0 | 27 | 100.0 | 1,000 | | 71 | 100.0 | 23 | 100.0 | 1,000 |
| 2DS1 | 14 | 42,4 | 15 | 55.6 | 0,437 | | 30 | 42.3 | 8 | 34.8 | 0,628 |
| 2DS2 | 12 | 36,4 | 12 | 44.4 | 0,601 | | 33 | 46.5 | 15 | 65.2 | 0,152 |
| 2DS3 | 7 | 21,2 | 8 | 29.6 | 0,554 | | 17 | 23,9 | 6 | 26.1 | 1,000 |
| 2DS4 | 24 | 72,7 | 24 | 88.9 | 0,195 | | 68 | 95,8 | 23 | 100.0 | 0,574 |
| 2DP1 | 33 | 100.0 | 26 | 96.3 | 0,45 | | 70 | 98.6 | 22 | 95.7 | 0,431 |
| 2DS5 | 16 | 48,5 | 13 | 48.1 | 1,000 | | 28 | 39.4 | 7 | 30.4 | 0,47 |
| 3DS1 | 13 | 39,4 | 12 | 44.4 | 0,794 | | 30 | 42.3 | 9 | 39.1 | 0,813 |
| 3DP1 | 33 | 100.0 | 27 | 100.0 | 1,000 | | 71 | 100.0 | 23 | 100.0 | 1,000 |
| C1 | 31 | 93,9 | 22 | 84.6 | 0,39 | | 62 | 87.3 | 19 | 82.6 | 0,729 |
| C2 | 25 | 75,8 | 20 | 76.9 | 1,000 | | 53 | 74.6 | 18 | 78.3 | 0,789 |
| Bw4 | 18 | 54,5 | 16 | 61.5 | 0,608 | | 41 | 57,7 | 12 | 52.2 | 0,809 |

*Teste Exato de Fisher com correção de Holm;

Grupo C1: HLA-Cw 01, 03, 07 (01-06), 08, 12 (02, 03, 06), 14, 16 (01, 03, 04)

Grupo C2 HLA-Cw 02, 04, 05, 06, 0707, 12 (04, 05), 15, 1602, 17, 18

DISCUSSÃO

O estudo do sangue de cordão umbilical e placentário de recém-nascidos é um importante modelo para a pesquisa da imunidade natural e da vigilância imunológica realizada pelas células NK, tendo em vista a imaturidade imunológica que acontece nesses indivíduos, especialmente com os prematuros. Neste estudo encontramos uma menor frequência do gene ativador KIR2DS4 no sangue do cordão umbilical dos recém-nascidos pré-termo em relação aos recém-nascidos a termo, sem diferenças entre AIG e PIG em ambos os grupos. Os genes KIR ativadores atuam destruindo células alvo infectadas por vírus e bactérias²⁰, o que reforça a importância desses genes na proteção ao recém-nascido a termo por intermédio da resposta imune inata e a vulnerabilidade do prematuro a infecção viral e bacteriana.

Middleton et al.²¹, em um estudo de frequência dos genes KIR em populações pelo mundo, constatou que a frequência do gene KIR2DS4 no Brasil é de 95,6%, em Cuba é de 91,4%, na China é de 97,8% e na Irlanda do Norte é de 98,1%. Em nosso estudo, a frequência encontrada entre os recém-nascidos de termo foi semelhante, 96,8%.

Pesquisas prévias indicam que a presença de ligantes KIR ativadores pode ter efeito protetor sobre determinadas doenças.^{20,22,23} O balanço entre inibição e ativação permite que a célula NK possa auxiliar o organismo na vigilância imunológica natural, mesmo antes da imunidade adquirida se manifestar. Os agentes infecciosos são total ou parcialmente eliminados pela ação das células NK²⁰. Esse sistema tem igual importância na ação contra doenças autoimunes, tumores, pré-eclâmpsia e abortos espontâneos recorrentes. Estudos sugerem que receptores KIR ativadores possam reconhecer a falta ou expressão inadequada das moléculas HLA de classe I

que possuam peptídeos relacionados a algumas patologias ou mesmo outros tipos de ligantes que servem para identificar células anormais^{20,23,24}.

No nosso estudo, não é surpresa que: pré-eclâmpsia (PE), sepse tardia, enterocolite necrosante (EN), uso de ventilação mecânica (VM), uso de corticóide pré-parto e óbito durante internação neonatal foram mais freqüentes no grupo dos recém-nascidos pré-termos²⁵. A vulnerabilidade dos prematuros se dá principalmente por duas razões: as freqüentes intervenções médicas, que interferem nas suas barreiras naturais de proteção (VM, acessos intra-venosos, etc), e a própria imaturidade imunológica^{26, 27}.

A susceptibilidade à infecções ocorre porque a resposta imune inata, que é essencial para proteção contra infecções no início da vida, é deficiente no recém-nascido, em especial nos prematuros²⁶. A incidência de infecções em recém-nascidos é, por muitas vezes, dependente da idade gestacional (IG) e do peso de nascimento dessas crianças, atingindo principalmente os prematuros extremos (IG \leq 28 semanas)²⁶.

Nossos achados sugerem que a prematuridade proporciona uma imunidade inata desfavorável e maior vulnerabilidade ao recém-nascido do que o estado nutricional ao nascimento, uma vez que recém-nascidos AIG e PIG tiveram comportamento do gene ativador KIR2DS4 semelhante. Há muitas especulações acerca da importância do gene KIR ativador 2DS4 estar diminuído nos recém-nascidos prematuros. Poderiam esses indivíduos carregar susceptibilidade genética relacionada ao insucesso em seu desenvolvimento? O desfavorecimento molecular desse grupo contrasta com a normalidade das defesas naturais dos recém-nascidos a termo. Essa diferença poderia estar relacionada à seleção natural onde indivíduos nascidos prematuramente estariam mais predispostos a infecções e outras patologias indesejadas?

Curiosamente, a relação KIR/HLA também está ligada a síndromes reprodutivas, como a pré-eclâmpsia. Isto propõe que o reconhecimento do HLA-C do feto pelo KIR das células NK maternas possam agir como um grande fator seletivo, provocando um nascimento prematuro e, conseqüentemente, um desenvolvimento incompleto do sistema imune inato ²². Os genes KIR e HLA são altamente polimórficos. Cada gestação é caracterizada por diferentes combinações de KIR materno X HLA do feto o que pode determinar o sucesso gestacional ou então, questões como a PE e abortos espontâneos ²³.

A menor frequência do KIR2DS4 sugere uma imunidade natural deficiente nesse grupo de recém-nascidos prematuros. Apesar das evidências, outros estudos devem ser desenvolvidos com a finalidade de comprovar quais fatores estão associados à vulnerabilidade do prematuro. O seguimento dos recém-nascidos desse estudo se faz necessário, visto que um levantamento dos desfechos como infecções recorrentes são bastante relevantes.

REFERÊNCIAS

1. Kotiranta-Ainamo A, Apajasalo M, Pohjavuori M, et al. Mononuclear cell subpopulations in preterm and full-term neonates: independent effects of gestational age, neonatal infection, maternal pre-eclampsia, maternal betamethason therapy, and mode of delivery. Clin Exp Immunol 1999; 115:309-314.
2. Juretic E, Juretic A, Uzarevic B, et al. Alterations in Lymphocyte Phenotype of Infected Preterm Newborns. Biol Neonate 2001; 80:223-227.

3. Perez A, Gurbindo MD, Resino S, et al. NK Cell Increase in Neonates from the Preterm to the Full-Term Period of Gestation. *Neonatology* 2007; 92:158-163.
4. Drews MB, Ludwig AC, Leititis JU, et al. Low birth weight and nosocomial infection of neonates in a neonatal intensive care unit. *Journal of Hospital Infection* 1995; 30:65-72.
5. Geffers C, Baerwolff S, Schwab F, et al. Incidence of healthcare-associated infections in high-risk neonates: results from the German surveillance system for very-low-birthweight infants. *Journal of Hospital Infection* 2008; 68:214-221.
6. Benjamin Jr. DK, Stoll BJ. Infection in Late Preterm Infants. *Clin Perinatol* 2006; 33:871-882.
7. McDonald T, Sneed J, Valenski WR, et al. Natural Killer Cell Activity in Very Low Birth Weight Infants. *Pediatr Research* 1992; 31:376-380.
8. Parham P. Influence of KIR diversity on human immunity. *Adv Exp Med Biol* 2005; 560:47-50.
9. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:217-51.
10. Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, et al. Natural killer cell cytotoxicity is deficient in newborns with sepsis and recurrent infections. *Eur J Pediatr* 2001; 160:478-482.
11. Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol* 2007;19:354-64.
12. Moretta A, Tambussi G, Bottino C, Tripodi G, Merli A, Ciccone E, et al. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3-

- CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. *J Exp Med* 1990;171:695-714.
13. Suto Y, Maenaka K, Yabe T, Hirai M, Tokunaga K, Tadok K, et al. Chromosomal localization of the human natural killer cell class I receptor family genes to 19q13.4 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1996;35:270-2.
 14. Rajalingam R, Hong M, Adams EJ, Shum BP, Guethlein LA, Parham P, Short KIR. Haplotypes in pygmy chimpanzee (Bonobo) resemble the conserved framework of diverse human KIR haplotypes. *J Exp Med* 2001;193:135–46.
 15. Alexander GR, Himes JH, Kaufman RB, Mor J, Kogan M. A United States national reference for fetal growth. *Obstet Gynecol.* 1996;87:163-8.
 16. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
 17. Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MCNM, et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens.* 1995; 46:355-367.
 18. Jones DC, Edgar RS, Ahmad T, et al. Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combinations in ulcerative colitis susceptibility. *Genes Immun.* 2006; 7:576-82.
 19. Salim PH, Jobim M, Bredemeier M, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes in systemic sclerosis. *British Society for*

- Immunology, Clinical and Experimental Immunology 2010; 160:325-330.
20. Jobim M, Jobim LF. Natural killer cells and immune surveillance. *J Pediatr (Rio J)*. 2008;84(4 Suppl):S58-67.
 21. Middleton D, Meenagh A, Moscoso J, Arnaiz-Villena A. Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents. *Tissue Antigens* 2008. 71:105-113.
 22. Espeli M, Niederer HA, Traherne JA, Trowsdale J, Smith KG. Genetic variation, Fcγ receptors, KIRs and infection: the evolution of autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2010 Dec;22(6):715-22.
 23. Chazara O, Xiong S, Moffett A. Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance. *J Leukoc Biol*. 2011 Oct;90(4):703-16.
 24. Hiby S. E. *et al*. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med*. Oct 18, 2004; 200(8): 957–965.
 25. Oliveira CA, Lins CP, Sá RAM, Chaves Netto H, Bornia RG, Silva NR, *et al*. Síndromes hipertensivas da gestação e repercussões perinatais. *Rev Bras Saude Matern Infant*.2006;6(1):93-8.
 26. Sharma AA, Jen R, Butler A, Lavoie PM. The developing human preterm neonatal immune system: a case for more research in this area. *Clin Immunol*. 2012 Oct;145(1):61-8.
 27. Strunk T, Currie A, Richmond P, Simmer K, Burgner D. Innate immunity in human newborn infants: prematurity means more than immaturity. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011 Jan;24(1):25-31.

7.2 Artigo Original (Inglês)

Study of KIR and HLA polymorphisms in placental/umbilical cord blood from full-term and preterm neonates

*Fernanda Marquezotti, Rita C Silveira, Pâmela Portela, Mariana Jobim Wilson,
Luiz Fernando Job Jobim, Renato Soibelman Procianny*

Abstract

Background. Preterm birth remains a major cause of neonatal mortality. Preterm infants are particularly vulnerable because of frequent medical intervention and an immature immune system. Neonatal infections increase the likelihood of complications and prolong hospital stay, increasing the risk of mortality. The activity of natural killer (NK) cells is reduced in preterm neonates and associated with increased susceptibility to infectious agents. NK cells are capable of mediating the innate immune response to virally infected cells and malignantly transformed cells, which might lead to a direct attack on target cells. Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) are the main NK cell receptors, and are known to recognize Human Leukocyte Antigen (HLA) class I molecules.

Objective. To investigate polymorphisms of KIR and HLA class I genes in very low birth weight preterm neonates compared with full-term neonates.

Methods. 154 neonates, 60 preterm and 94 full-term, were genotyped for 16 KIR genes and their HLA ligands by PCR-SSO and PCR-SSP respectively.

Results. There was a statistically significant difference ($P < 0.0001$) between preterm and full-term neonates for the KIR2DS4 gene, which was less frequent in preterm neonates.

Conclusions. The lower frequency of KIR2DS4 indicates a deficient innate immune response in the group of preterm neonates.

INTRODUCTION

The development of the immune system is characterized by a number of events that begin very early during fetal life.¹ Preterm neonates lack a fully competent immune system, making them vulnerable to infections, especially very low birth weight (VLBW) infants.^{2,3,4,5} Neonatal infections increase the likelihood of complications and prolong hospital stay, increasing the risk of mortality.⁶

The activity of natural killer (NK) cells is reduced in VLBW infants and associated with increased susceptibility to infectious agents.⁷ NK cells are a type of lymphocyte capable of mediating the innate immune response to virally infected cells and malignantly transformed cells, which might lead to a direct attack on target cells.^{7,8,9,10} When the expression of human leukocyte antigen (HLA) class I molecules is reduced or absent, NK cells can be activated leading to lysis of infected cells. NK cell function is regulated by a balance between signals transmitted via activating and inhibitory receptors.^{11,12} These receptors are called killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) and look like immunoglobulin found on cell surface. The KIR genes are located on the long arm of chromosome 19 and are expressed on NK cells and some T lymphocytes. KIRs can be functionally divided into inhibitory and activating

groups and may trigger or prevent target cell lysis based on the interaction with their ligands.^{13,14}

This study aimed to investigate polymorphisms of KIR and HLA class I genes in VLBW preterm neonates compared with full-term neonates.

MATERIALS AND METHODS

Population

We carried out a cross-sectional study of 60 preterm neonates and 94 full-term controls at two tertiary care centers in Porto Alegre, southern Brazil, from February 2011 to January 2013. Neonates with congenital malformations, congenital infections (STORCH screen), born to HIV-positive mothers or with confirmed peripartum bacterial infection were excluded from the sample.

The study was approved by the Research Ethics Committee of the two participating institutions. Written informed consent was obtained from the parents or legal guardians before blood samples were collected. Only samples of umbilical cord blood were used, and the infants were not handled for any study procedure.

Variables of interest

While the condition of the neonate at birth was assessed, a data collection instrument was completed for each patient. The following variables were analyzed in this study: gestational age (in days, determined by best obstetric estimate using first trimester ultrasound), birth weight, mode of delivery (vaginal or cesarean), sex, length (cm), head circumference (cm), use of

antenatal corticosteroids, maternal preeclampsia (defined as blood pressure >140/90 mmHg after 20 weeks' gestation with edema or significant proteinuria), early-onset sepsis (a positive blood culture within the first 72 h of life in neonates with clinical evidence of infection), late-onset sepsis (a positive blood culture after 72 h of life in neonates with clinical evidence of infection), Apgar scores at 1 and 5 min after birth, maternal urinary tract infection at delivery (positive urine culture), neonatal pneumonia, use of mechanical ventilation, necrotizing enterocolitis (determined by radiographic evidence of pneumatosis intestinalis with or without intestinal perforation), length of hospital stay (days), readmission, appropriateness of birth weight (growth curve by Alexander et al.¹⁵), duration of membrane rupture (min), death in the neonatal intensive care unit (NICU), and polymorphisms of KIR and HLA genes.

Processing of blood samples

Umbilical cord blood samples of preterm neonates and full-term controls were drawn through venipuncture into Vacutainer tubes containing EDTA as anticoagulant. Whole blood samples were stored at 6–8°C for 15 days until they were processed and analyzed in the Laboratory of Immunology at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Blood samples were then centrifuged to obtain the leukocyte layer, and DNA was extracted using a salting out procedure.¹⁶

KIR genotyping by PCR-SSO

The KIR genes were genotyped by polymerase chain reaction with sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO) (KIR SSO Genotyping Test –

RSSOKIR; One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA), which detects the presence or absence of 16 genes.

For DNA amplification, a standard mixture containing PCR buffer, dNTPs, specific primers, Taq polymerase, and genomic DNA (20–100 ng/μL) was prepared and incubated in a thermal cycler. PCRs were performed under the following conditions: 3-min denaturation at 96°C, followed by 5 cycles of 20 s at 96°C, 20 s at 60°C, and 20 s at 72°C; then 30 cycles of 10 s at 96°C, 15 s at 60°C, and 20 s at 72°C, followed by a 10-min extension at 72°C. The amplified product was hybridized with probes that were complementary to the expected DNA and labeled with fluorescent dyes for analysis on a Luminex platform. The results were analyzed using HLA Fusion™ software (One Lambda Inc.), which acquires data and assigns genotypes.

HLA class I genotyping by PCR-SSP

The HLA class I alleles were genotyped by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP), as described elsewhere.^{17,18} PCR was performed and the following primers were used for gene amplification: HLA-C1 (sense 5' -CCG CGA GTC CGA GAG GGG GCC GCG AGT CCA AGA GG- 3' and antisense 5' -CGC GCA GTT TCC GCA GGT- 3'); HLA-C2 (sense 5' -CCG CGA GTC CGA GAG GGG GCC GCG AGT CCA AGA GG- 3' and antisense 5' -GCG CAG GTT CCG CAG GC- 3'); and HLA-Bw4 (sense 5' -GGA CCT GCG GAC CCT GCT GAG CCT GCG GAC CCT GCT CCT GCG CAC CGC GCT CC- 3' and antisense 5' -GCC CAC TTC TGG AAG GTT CT- 3').

DNA amplification was performed using a mixture containing 1 μL of 10X buffer solution, 0.3 μL of 50 mM MgCl₂, 0.08 μL of 25 mM dNTPs, 0.05 μL of

Taq polymerase, 10 ng of DNA, 100 mM of internal control primer, and 500 mM of specific primer. Reactions were cycled in a DNA thermal cycler with initial denaturation at 96°C for 1 min, followed by 5 cycles of 20 s at 96°C, 45 s at 70°C, and 45 s at 72°C. Then, 21 cycles of 25 s at 96°C, 50 s at 65°C, and 30 s at 72°C, followed by 4 cycles of 30 s at 96°C, 60 s at 55°C, 90 s at 72°C, and a final extension of 1 min at 72°C.

The amplified product was analyzed by electrophoresis in 1% (w/v) agarose gel in Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer. The gel was run for 20 min at 200 V at room temperature. The bands were visualized under UV light by ethidium bromide staining. The gel was made by dissolving 4.5 g agarose in 450 mL 1X TAE buffer and heating (without boiling). The solution was placed in a boiling water bath for 30 min, 10 µL of ethidium bromide was added, and the gel was placed in the electrophoresis tank. After the agarose gel solidified, 8 µL of Orange G dye was added to 15 µL of the PCR sample.

Statistical analysis

Sample size calculation was based on a difference in the prevalence of KIR genes as described in a previous study.¹⁹ Assuming 5% level of level of significance and 90% power and a 1,8 of relative risk (RR), a total sample of at least 148 preterm and full-term neonates was required.

Data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences in gene frequencies were compared between preterm neonates and full-term controls using Fisher's exact test. P-values were adjusted using the Holm correction for

multiple comparisons. Multiple Regression Logistic was used in the stratified analysis.

RESULTS

A total of 154 neonates were included in this study. Of these, 33 (55%) were preterm neonates appropriate for gestational age (AGA) and 27 (45%) were preterm neonates small for gestational age (SGA). Among full-term neonates, 71 (75.5%) were AGA and 23 (24.5%) were SGA.

Preterm neonates showed lower gestational age and birth weight and higher frequency of cesarean delivery, use of antenatal corticosteroids and maternal preeclampsia than their full-term peers (Table 1). Other clinical data were similar between the two groups. Presence of early- and late-onset sepsis, necrotizing enterocolitis, need for mechanical ventilation and readmission rates were higher in preterm neonates (Table 1). The highest rates of cesarean delivery and maternal preeclampsia were observed in preterm SGA neonates. Full-term AGA neonates had greater need for mechanical ventilation than full-term SGA neonates (Table 2).

The frequencies of KIR and HLA genes (16 KIR genes and 3 HLA ligands) were analyzed in all 60 preterm and 94 full-term neonates. The frequency of the activating KIR2DS4 gene was significantly lower in preterm neonates (Table 3). However, this difference was not maintained when we evaluated the frequencies of KIR genes and HLA ligands in the subgroups of preterm and full-term AGA and SGA neonates (Table 4).

Table 1. Frequency of clinical data (%) and their associations in preterm and full-term neonates

| | Preterm (n=60) | | Full-term (n=94) | | <i>p-value*</i> |
|-----------------------------------|-----------------------|--------|-------------------------|--------|-----------------|
| | N | % | N | % | |
| | mean | SD | mean | SD | |
| Gestational age | 29.09 | ±3.25 | 39.43 | ±1.34 | <0.001 |
| Birth weight | 1103.9 | ±449.4 | 3257 | ±604.1 | <0.001 |
| Mode of delivery | | | | | |
| Vaginal | 15 | 25 | 53 | 56.4 | <0.001 |
| Cesarean | 45 | 75 | 41 | 43.6 | |
| Gender of the neonate | | | | | |
| Male | 30 | 50 | 45 | 47.9 | 0.869 |
| Female | 30 | 50 | 49 | 52.1 | |
| Antepartum corticosteroids | 47 | 78.3 | 1 | 1.1 | <0.001 |
| Preeclampsia | 24 | 40 | 4 | 4.3 | <0.001 |
| Early-onset sepsis | 4 | 6.7 | 0 | 0 | 0.022 |
| Late-onset sepsis | 20 | 33.3 | 0 | 0 | <0.001 |
| Urinary tract infection | 9 | 15.3 | 17 | 18.1 | 0.825 |
| Pneumonia | 2 | 3.3 | 1 | 1.1 | 0.561 |
| Mechanical ventilation | 38 | 63.3 | 2 | 2.1 | <0.001 |
| Necrotizing enterocolitis | 5 | 8.3 | 0 | 0 | 0.008 |
| Readmission | 17 | 28.3 | 13 | 13.8 | 0.036 |
| Death in the NICU | 17 | 28.3 | 0 | 0 | <0.001 |

SD, standard deviation; NICU, neonatal intensive care unit.

*Fisher's exact test with Holm correction.

Table 2. Frequency of clinical data (%) and their associations in preterm AGA x SGA neonates and full-term AGA x SGA neonates

| | Preterm AGA (n=33) | | | Preterm SGA (n=27) | | | Full-term AGA (n=71) | | | Full-term SGA (n=23) | | | p-value* |
|-----------------------------------|--------------------|-------|--------|--------------------|--------|--------|----------------------|-------|-------|----------------------|--------|--------|----------|
| | N | % | SD | N | % | SD | N | % | SD | N | % | SD | |
| Gestational age | 28.31 | ±2.98 | ±3.35 | 30.04 | ±3.35 | ±3.35 | 39.77 | ±1.15 | ±1.15 | 38.59 | ±1.51 | ±1.51 | <0.001 |
| Birth weight | 1162 | 516.4 | 347.51 | 1033 | 347.51 | 347.51 | 3522.6 | 419.4 | 419.4 | 2438.3 | 233.45 | 233.45 | <0.001 |
| Mode of delivery | | | | | | | | | | | | | |
| Vaginal | 12 | 36.4 | 11.1 | 3 | 11.1 | 11.1 | 36 | 50.7 | 50.7 | 17 | 73.9 | 73.9 | 0.058 |
| Cesarean | 21 | 63.6 | 88.9 | 24 | 88.9 | 88.9 | 35 | 49.3 | 49.3 | 6 | 26.1 | 26.1 | |
| Gender of the neonate | | | | | | | | | | | | | |
| Male | 18 | 54.5 | 44.4 | 12 | 44.4 | 44.4 | 34 | 47.9 | 47.9 | 11 | 47.8 | 47.8 | 1.000 |
| Female | 15 | 45.5 | 55.6 | 15 | 55.6 | 55.6 | 37 | 52.1 | 52.1 | 12 | 52.2 | 52.2 | |
| Antepartum corticosteroids | 25 | 75.8 | 81.5 | 22 | 81.5 | 81.5 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4.3 | 4.3 | 0.245 |
| Preeclampsia | 6 | 18.2 | 66.7 | 18 | 66.7 | 66.7 | 2 | 2.8 | 2.8 | 2 | 8.7 | 8.7 | 0.25 |
| Early-onset sepsis | 0 | 0 | 14.8 | 4 | 14.8 | 14.8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.000 |
| Late-onset sepsis | 12 | 36.4 | 29.6 | 8 | 29.6 | 29.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.000 |
| Urinary tract infection | 4 | 12.5 | 18.5 | 5 | 18.5 | 18.5 | 11 | 15.5 | 15.5 | 6 | 26.1 | 26.1 | 0.349 |
| Pneumonia | 1 | 3 | 3.7 | 1 | 3.7 | 3.7 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4.3 | 4.3 | 0.245 |
| Mechanical ventilation | 22 | 66.7 | 59.3 | 16 | 59.3 | 59.3 | 2 | 2.8 | 2.8 | 0 | 0 | 0 | <0.001 |
| Necrotizing enterocolitis | 2 | 6.1 | 11.1 | 3 | 11.1 | 11.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.000 |
| Readmission | 10 | 30.3 | 25.9 | 7 | 25.9 | 25.9 | 12 | 16.9 | 16.9 | 1 | 4.3 | 4.3 | 0.176 |
| Death in the NICU | 9 | 27.3 | 29.6 | 8 | 29.6 | 29.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.000 |

AGA, appropriate for gestational age; SGA, small for gestational age; SD, standard deviation

*Fisher's exact test with Holm correction.

Table 3. Frequency (%) of KIR genes, HLA ligands and their associations in preterm and full-term neonates

| KIR and HLA genes | Preterm (n=60) | | Full-term (n=94) | | p-value* |
|-------------------|----------------|--------------|------------------|--------------|----------|
| | N | % | N | % | |
| 2DL1 | 59 | 98.3 | 91 | 96.8 | 0.657 |
| 2DL2 | 30 | 50 | 53 | 56.4 | 0.508 |
| 2DL3 | 58 | 96.7 | 89 | 94.7 | 0.706 |
| 2DL4 | 60 | 100.0 | 94 | 100.0 | 1.000 |
| 2DL5 | 39 | 65 | 52 | 55.3 | 0.245 |
| 3DL1 | 52 | 86.7 | 89 | 94.7 | 0.134 |
| 3DL2 | 60 | 100.0 | 94 | 100.0 | 1.000 |
| 3DL3 | 60 | 100.0 | 94 | 100.0 | 1.000 |
| 2DS1 | 29 | 48.3 | 38 | 40.4 | 0.405 |
| 2DS2 | 24 | 40 | 48 | 51.1 | 0.19 |
| 2DS3 | 15 | 25 | 23 | 24.5 | 1.000 |
| 2DS4 | 48 | 80.0 | 91 | 96.8 | <0.001 |
| 2DP1 | 59 | 98.3 | 92 | 97.9 | 1.000 |
| 2DS5 | 29 | 48.3 | 35 | 37.2 | 0.184 |
| 3DS1 | 25 | 41.7 | 39 | 41.5 | 0.968 |
| 3DP1 | 60 | 100.0 | 94 | 100.0 | 1.000 |
| C1 | 53 | 89.8 | 81 | 86.2 | 0.618 |
| C2 | 45 | 76.3 | 71 | 75.5 | 1.000 |
| Bw4 | 34 | 57.6 | 53 | 56.4 | 1.000 |

C1 group: HLA-Cw 01, 03, 07 (01-06), 08, 12 (02, 03, 06), 14, 16 (01, 03, 04).

C2 group: HLA-Cw 02, 04, 05, 06, 0707, 12 (04, 05), 15, 1602, 17, 18.

*Fisher's exact test with Holm correction.

Table 4. Frequency (%) of KIR genes, HLA ligands and their associations in preterm AGA x SGA neonates and full-term AGA x SGA neonates

| KIR and HLA genes | Preterm AGA (n=33) | | Preterm SGA (n=27) | | p-value* | Full-term AGA (n=71) | | Full-term SGA (n=23) | | p-value* |
|-------------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|----------|----------------------|--------------|----------------------|--------------|----------|
| | N | % | N | % | | N | % | N | % | |
| 2DL1 | 32 | 97 | 27 | 100.0 | 1.000 | 69 | 97.2 | 22 | 95.7 | 1.000 |
| 2DL2 | 16 | 48.5 | 14 | 51.9 | 1.000 | 38 | 53.5 | 15 | 65.2 | 0.347 |
| 2DL3 | 32 | 97 | 26 | 96.3 | 1.000 | 66 | 93 | 23 | 100.0 | 0.329 |
| 2DL4 | 33 | 100.0 | 27 | 100.0 | 1.000 | 71 | 100.0 | 23 | 100.0 | 1.000 |
| 2DL5 | 20 | 60.6 | 19 | 70.4 | 0.587 | 40 | 56.3 | 12 | 52.2 | 0.811 |
| 3DL1 | 26 | 78.8 | 26 | 96.3 | 0.063 | 67 | 94.4 | 22 | 95.7 | 1.000 |
| 3DL2 | 33 | 100.0 | 27 | 100.0 | 1.000 | 71 | 100.0 | 23 | 100.0 | 1.000 |
| 3DL3 | 33 | 100.0 | 27 | 100.0 | 1.000 | 71 | 100.0 | 23 | 100.0 | 1.000 |
| 2DS1 | 14 | 42.4 | 15 | 55.6 | 0.437 | 30 | 42.3 | 8 | 34.8 | 0.628 |
| 2DS2 | 12 | 36.4 | 12 | 44.4 | 0.601 | 33 | 46.5 | 15 | 65.2 | 0.152 |
| 2DS3 | 7 | 21.2 | 8 | 29.6 | 0.554 | 17 | 23.9 | 6 | 26.1 | 1.000 |
| 2DS4 | 24 | 72.7 | 24 | 88.9 | 0.195 | 68 | 95.8 | 23 | 100.0 | 0.574 |
| 2DP1 | 33 | 100.0 | 26 | 96.3 | 0.45 | 70 | 98.6 | 22 | 95.7 | 0.431 |
| 2DS5 | 16 | 48.5 | 13 | 48.1 | 1.000 | 28 | 39.4 | 7 | 30.4 | 0.47 |
| 3DS1 | 13 | 39.4 | 12 | 44.4 | 0.794 | 30 | 42.3 | 9 | 39.1 | 0.813 |
| 3DP1 | 33 | 100.0 | 27 | 100.0 | 1.000 | 71 | 100.0 | 23 | 100.0 | 1.000 |
| C1 | 31 | 93.9 | 22 | 84.6 | 0.39 | 62 | 87.3 | 19 | 82.6 | 0.729 |
| C2 | 25 | 75.8 | 20 | 76.9 | 1.000 | 53 | 74.6 | 18 | 78.3 | 0.789 |
| Bw4 | 18 | 54.5 | 16 | 61.5 | 0.608 | 41 | 57.7 | 12 | 52.2 | 0.809 |

AGA, appropriate for gestational age; SGA, small for gestational age.

C1 group: HLA-Cw 01, 03, 07 (01-06), 08, 12 (02, 03, 06), 14, 16 (01, 03, 04).

C2 group: HLA-Cw 02, 04, 05, 06, 0707, 12 (04, 05), 15, 1602, 17, 18.

*Fisher's exact test with Holm correction.

DISCUSSION

The study of placental/umbilical cord blood from neonates provides an important model for studying innate immunity and immune surveillance mediated by NK cells, given the immunological immaturity of these individuals, especially of preterm infants. In this study, we found a lower frequency of the activating KIR2DS4 gene in umbilical cord blood from preterm neonates as compared to full-term neonates, with no difference between AGA and SGA neonates in any of the groups. Activating KIR genes act by killing target cells infected with viruses or bacteria,²⁰ which reinforces the important role of these genes in the protection of full-term neonates via innate immune response and in the vulnerability of preterm neonates to viral and bacterial infection.

Middleton et al.²¹, in frequency study of KIR genes in worldwide populations verified that KIR2DS4 gene frequency in Brazil is 95.6%, in Cuba 91.4%, China 97.8% and in Northern Ireland 98.1%. In our study, the frequency found among newborns at term was similar, 96.8%.

Previous studies indicate that the presence of ligands for activating KIRs may have protective effects against certain diseases.^{20,22,23} The balance between inhibition and activation allows NK cells to assist the body in the innate immune surveillance even before the development of acquired immunity. Infectious agents are completely or partially eliminated by the action of NK cells.²⁰ This system is equally important against autoimmune diseases, tumors, preeclampsia, and recurrent miscarriage. Studies suggest that activating KIR receptors might recognize absence or inadequate expression of HLA class I molecules that have disease-related peptides or even other types of ligands that can detect abnormal cells.^{20,23,24}

In our study, not surprisingly, preeclampsia, late-onset sepsis, necrotizing enterocolitis, use of mechanical ventilation, use of antenatal corticosteroids and death in the NICU were more common among preterm neonates.²⁵ Preterm infants are particularly vulnerable to infections mainly due to immaturity of the innate immune system and frequent invasive medical procedures that interfere with their natural protective barriers, such as mechanical ventilation and intravenous access.^{26,27} Susceptibility to infection is increased because the innate immune response, which is essential for protection against infection early in life, is deficient in the neonate, particularly in preterm neonates.²⁶ The incidence of infection in neonates is often dependent on gestational age and birth weight, affecting mainly extremely preterm infants (gestational age ≤ 28 weeks).²⁶

Our findings suggest that preterm birth leads to unfavorable innate immunity, and that this prematurity is more closely related to the increased vulnerability of the neonate to infections than nutritional status at birth, since the activating KIR2DS4 gene had a similar pattern of expression in AGA and SGA neonates. There has been much speculation about the importance of the decreased expression of the activating KIR2DS4 gene in preterm neonates. Would these individuals be carriers of genetic susceptibility that could be related to their unsuccessful development? The molecular disadvantage observed in this group contrasts with the normal innate defenses of full-term neonates. Would this difference be related to natural selection, in which individuals born prematurely would be more prone to infections and other undesirable diseases?

Interestingly, the KIR/HLA interaction is also related to reproductive disorders, such as preeclampsia. This suggests that recognition of fetal HLA-C by maternal KIR may act as a major selective factor causing preterm birth and,

consequently, incomplete development of the innate immune system.²² KIR and HLA genes are highly polymorphic. Each pregnancy is characterized by different combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes, which may determine the success of pregnancy or lead to issues such as preeclampsia and miscarriage.²³

In conclusion, the lower frequency of KIR2DS4 indicates a deficient innate immune response in the group of preterm neonates. Despite these findings, further studies should be conducted in order to determine which factors are associated with vulnerability of the preterm infant. Follow-up of neonates in this study is required, because investigation of outcomes such as recurrent infections is of great relevance.

REFERENCES

1. Kotiranta-Ainamo A, Apajasalo M, Pohjavuori M, et al. Mononuclear cell subpopulations in preterm and full-term neonates: independent effects of gestational age, neonatal infection, maternal pre-eclampsia, maternal betamethason therapy, and mode of delivery. *Clin Exp Immunol* 1999; 115:309-314.
2. Juretic E, Juretic A, Uzarevic B, et al. Alterations in Lymphocyte Phenotype of Infected Preterm Newborns. *Biol Neonate* 2001; 80:223-227.
3. Perez A, Gurbindo MD, Resino S, et al. NK Cell Increase in Neonates from the Preterm to the Full-Term Period of Gestation. *Neonatology* 2007; 92:158-163.

4. Drews MB, Ludwig AC, Leitis JU, et al. Low birth weight and nosocomial infection of neonates in a neonatal intensive care unit. *Journal of Hospital Infection* 1995; 30:65-72.
5. Geffers C, Baerwolff S, Schwab F, et al. Incidence of healthcare-associated infections in high-risk neonates: results from the German surveillance system for very-low-birthweight infants. *Journal of Hospital Infection* 2008; 68:214-221.
6. Benjamin Jr. DK, Stoll BJ. Infection in Late Preterm Infants. *Clin Perinatol* 2006; 33:871-882.
7. McDonald T, Sneed J, Valenski WR, et al. Natural Killer Cell Activity in Very Low Birth Weight Infants. *Pediatr Research* 1992; 31:376-380.
8. Parham P. Influence of KIR diversity on human immunity. *Adv Exp Med Biol* 2005; 560:47-50.
9. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:217-51.
10. Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, et al. Natural killer cell cytotoxicity is deficient in newborns with sepsis and recurrent infections. *Eur J Pediatr* 2001; 160:478-482.
11. Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol* 2007;19:354-64.
12. Moretta A, Tambussi G, Bottino C, Tripodi G, Merli A, Ciccone E, et al. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3- CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. *J Exp Med* 1990;171:695-714.
13. Suto Y, Maenaka K, Yabe T, Hirai M, Tokunaga K, Tadok K, et al. Chromosomal localization of the human natural killer cell class I receptor

- family genes to 19q13.4 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1996;35:270-2.
14. Rajalingam R, Hong M, Adams EJ, Shum BP, Guethlein LA, Parham P, Short KIR. Haplotypes in pygmy chimpanzee (Bonobo) resemble the conserved framework of diverse human KIR haplotypes. *J Exp Med* 2001;193:135–46.
 15. Alexander GR, Himes JH, Kaufman RB, Mor J, Kogan M. A United States national reference for fetal growth. *Obstet Gynecol.* 1996;87:163-8.
 16. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
 17. Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MCNM, et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens.* 1995; 46:355-367.
 18. Jones DC, Edgar RS, Ahmad T, et al. Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combinations in ulcerative colitis susceptibility. *Genes Immun.* 2006; 7:576-82.
 19. Salim PH, Jobim M, Bredemeier M, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes in systemic sclerosis. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology* 2010; 160:325-330.
 20. Jobim M, Jobim LF. Natural killer cells and immune surveillance. *J Pediatr (Rio J).* 2008;84(4 Suppl):S58-67.
 21. Middleton D, Meenagh A, Moscoso J, Arnaiz-Villena A. Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid,

- Oriental and Black populations from different continents. *Tissue Antigens* 2008. 71:105-113.
22. Espeli M, Niederer HA, Traherne JA, Trowsdale J, Smith KG. Genetic variation, Fcγ receptors, KIRs and infection: the evolution of autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2010 Dec;22(6):715-22.
23. Chazara O, Xiong S, Moffett A. Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance. *J Leukoc Biol*. 2011 Oct;90(4):703-16.
24. Hiby S. E. *et al*. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med*. Oct 18, 2004; 200(8): 957–965.
25. Oliveira CA, Lins CP, Sá RAM, Chaves Netto H, Bornia RG, Silva NR, *et al*. Síndromes hipertensivas da gestação e repercussões perinatais. *Rev Bras Saude Matern Infant*. 2006;6(1):93-8.
26. Sharma AA, Jen R, Butler A, Lavoie PM. The developing human preterm neonatal immune system: a case for more research in this area. *Clin Immunol*. 2012 Oct;145(1):61-8.
27. Strunk T, Currie A, Richmond P, Simmer K, Burgner D. Innate immunity in human newborn infants: prematurity means more than immaturity. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011 Jan;24(1):25-31.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há muito tempo o meio científico e assistencial volta seu olhar ao recém nascido prematuro. Crianças nascidas sob essas condições necessitam de cuidados especiais, pois o parto precoce interrompe o desenvolvimento do feto gerando um alto índice de morbi mortalidade neonatal. Dentre as morbidades neonatais está a susceptibilidade à infecções, o que aumenta a probabilidade de complicações e prolonga o tempo de internação, aumentando o risco de mortalidade.

As células *natural killer* (NK) fazem parte da imunidade inata e esta age como a primeira linha de defesa de nosso organismo, nos protegendo desde o nascimento. As células NK procuram diferenciar células sadias de células tumorais, infectadas por vírus ou bactérias, destruindo as não saudáveis. Tal ação é mediada pela relação entre os receptores KIR das células NK e seus ligantes HLA.

O objetivo deste estudo foi avaliar a frequência dos genes KIR e seus ligantes HLA de Classe I em recém nascidos pré-termo e de termo, com a finalidade de nortear futuros estudos sobre a imunidade inata dessa população. Avaliamos 154 crianças, 60 pré-termo e 94 a termo e observamos que a frequência do gene KIR2DS4 foi significativamente menor nos pré-termos.

A menor frequência do KIR2DS4 sugere uma imunidade natural deficiente no grupo de recém-nascidos prematuros. Apesar das evidências, outros estudos devem ser desenvolvidos com a finalidade de comprovar quais fatores estão associados à vulnerabilidade do prematuro. O seguimento dos recém-nascidos desse estudo se faz necessário, visto que um levantamento dos desfechos como infecções recorrentes são bastante relevantes.

ANEXOS

Anexo I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Convidamos os Srs. Pais ou responsáveis de recém-nascidos no Serviço de Neonatologia do HCPA para participar do Projeto de Pesquisa: **“Estudo de polimorfismos dos genes KIR e HLA relacionado às infecções recorrentes em recém-nascidos de muito baixo peso”**.

Esta é uma atividade de Pesquisa vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS e tem como objetivo investigar o polimorfismo dos genes KIR e HLA classe I do sangue de cordão umbilical em recém-nascidos de muito baixo peso, AIG (Adequados para Idade Gestacional) e PIG (Pequenos para Idade Gestacional) comparando com RN de termo normais, e as possíveis infecções nesses recém-nascidos durante seus primeiros 12 meses de vida.

Diversos estudos evidenciam que as células Natural Killer e os genes KIR têm importante relação com grande parte das doenças infecciosas. A identificação de polimorfismos dos genes KIR e HLA de Classe I em bebês de muito baixo peso poderão facilitar a compreensão da função das células NK no desenvolvimento de infecções recorrentes durante o período pós-natal.

Para que o estudo seja realizado, solicitamos que autorize a coleta de dados do seu filho, sem qualquer custo de participação. Os dados informados serão mantidos em sigilo absoluto.

A criança não sofrerá nenhuma intervenção para esta pesquisa, será feita apenas a coleta de 4 ml do sangue do cordão umbilical logo após o nascimento, não havendo contato com o bebê e evitando qualquer risco e/ou desconforto para mãe ou para a criança. A amostra terá os genes KIR e HLA tipados e analisados. Após a análise, a amostra de sangue coletada será devidamente descartada.

Eu, _____, responsável pelo RN de _____ fui informado sobre os objetivos do estudo e sua justificativa. Fui esclarecido sobre procedimentos aos quais meu filho será submetido.

Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e sei que poderei entrar em contato para maiores esclarecimentos com o pesquisador responsável, Dr. Renato Soibermann Procianoy, pelo telefone (51) 99826976, a pesquisadora Fernanda Marquezotti, pelo telefone (51) 81238530 ou no Serviço de Neonatologia do HCPA (Ramiro Barcelos, 2.350 – 11º andar / sala 1123, Bairro Santa Cecília – Porto Alegre) pelo telefone (51) 33598794. O Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA também estará disponível pelo telefone (51) 3359 8304.

Este documento foi elaborado em duas vias, ficando uma com o familiar responsável.

Porto Alegre, ____/____/____

Responsável

Pesquisador

Anexo II - Instrumento de Coleta de Dados

| | | | |
|--|---|--|---------|
| NOME | | REGISTRO | |
| Dados do Nascimento | | | |
| DATA NASCIMENTO | | RESPONSÁVEL | |
| SEXO 1.F, 2.M | IG | Adequação IG 1.AIG, 2.PIG | |
| TIPO DE PARTO 1.V, 2.V+F, 3.C | | APGAR 1 | APGAR 5 |
| PN (g) | COMP (cm) | PC(cm) | |
| Mãe com pré eclampsia 1.SIM, 2. NÃO | Uso de corticóide Mãe/RN 1.SIM, 2. NÃO | Escore SNAPPE-II (valor) | |
| Ventilação mecânica 1.SIM, 2. NÃO | Asfixia neonatal 1.SIM, 2. NÃO | Enterocolite necrosante 1.SIM, 2. NÃO | |
| Óbito 1.SIM, 2. NÃO | Observações | | |
| Análise laboratorial – SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL | | | |
| ORDEM | GENE | RESULTADO | |
| 1 | 2DL1 (A) | | |
| 2 | 2DL1 (B) | | |
| 3 | 2DL2 (A) | | |
| 4 | 2DL2 (B) | | |
| 5 | 2DL3 (A) | | |
| 6 | 2DL3 (B) | | |
| 7 | 2DL5 (A) | | |
| 8 | 2DL5 (B) | | |
| 9 | 2DS1 (A) | | |
| 10 | 2DS1 (B) | | |
| 11 | 2DS2 (A) | | |
| 12 | 2DS2 (B) | | |
| 13 | 2DS3 (A) | | |
| 14 | 2DS3 (B) | | |
| 15 | 2DS4 (A) | | |
| 16 | 2DS4 (B) | | |
| 17 | 2DS5 | | |
| 18 | 3DL1 (A) | | |
| 19 | 3DL1 (B) | | |
| 20 | 3DS1 (A) | | |
| 21 | 3DS1 (B) | | |
| 22 | 2DP1 (A) | | |
| 23 | 2DP1 (B) | | |