

Características de atividade das células natural killer em pacientes com esclerose sistêmica

Patricia Hartstein Salim¹, Mariana Jobim², Markus Bredemeier³, José Artur Bogo Chies⁴,
João Carlos Tavares Brenol⁵, Luiz Fernando Jobim⁶, Ricardo Machado Xavier⁷

RESUMO

Introdução: Estudos têm relatado um aumento da expressão das células *natural killer* (NK) no sangue periférico de pacientes com esclerose sistêmica (ES). Essas células fazem parte da imunidade inata, reconhecendo células infectadas por meio dos receptores *killer immunoglobulin-like receptor* (KIR), que apresentam acentuado polimorfismo. Um novo modelo foi proposto prevendo a atividade das células NK, avaliando o excesso de ativação (EA), excesso de inibição (EI) ou se a célula está funcionalmente em equilíbrio (*balance*, B) (neutra). **Objetivo:** Avaliar a atividade das células NK em pacientes com ES e comparar com grupo-controle. **Método:** Cento e dez pacientes com ES e 115 controles foram estudados. Foi aplicado um novo modelo que prevê a atividade das células NK. Para esse método, considerou-se cada célula com seu respectivo ligante KIR/HLA-C e Bw4. A nomenclatura utilizada foi EA, EI e B. **Resultados:** Nossos resultados mostraram que 63,5% dos controles saudáveis apresentavam o fenótipo KIR caracterizado por EI, em comparação com 39,1% dos pacientes com ES ($P = 0,001$). Considerando-se somente indivíduos com presença de KIR2DL2 (KIR2DL2+), encontramos 34,7% de EI em controles sadios e 10,9% em pacientes com ES ($P < 0,001$). **Conclusão:** Em nosso estudo, o modelo que prevê a ação das células NK mostrou que controles sadios têm maior frequência de EI quando comparados a pacientes com ES, sugerindo um efeito protetor do EI contra o desenvolvimento da ES. Outros estudos, porém, devem ser realizados para confirmar nossos dados.

Palavras-chave: receptores KIR, células *natural killer*, escleroderma sistêmico, autoimunidade.

© 2013 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

INTRODUÇÃO

A esclerose sistêmica (ES) é uma rara doença autoimune caracterizada por disfunção endotelial e fibrose tecidual. É uma doença difusa do tecido conjuntivo, podendo afetar diversos sistemas orgânicos (principalmente digestivo e respiratório). Há duas formas de apresentação da ES, limitada e difusa, diferenciadas pela extensão do envolvimento cutâneo.¹

Suas principais características são deposição excessiva de colágeno, lesões vasculares e alterações da imunidade celular e humoral.²

Existem evidências de que certos quadros genéticos favorecem a progressão da inflamação crônica para o processo fibrótico. A participação do sistema imune é sugerida pela presença de células mononucleares infiltradas em lesões, anormalidades nas células T auxiliares e na função dos monócitos,³

Recebido em 20/12/2011. Aprovado, após revisão, em 13/12/2012. Os autores declaram a inexistência de conflito de interesse. Comitê de Ética: 05-549. Suporte Financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do HCPA (Fipe-HCPA).

Serviço de Reumatologia e Serviço de Imunologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – HCPA, UFRGS.

1. Doutoranda em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

2. Doutora em Medicina, UFRGS; Médica Imunologista, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA, UFRGS

3. Doutor em Medicina, UFRGS; Médico do Serviço de Reumatologia, Hospital Nossa Senhora da Conceição, Grupo Hospitalar Conceição – HNSC-GHC

4. Doutor em Ciências da Vida, Especialidade em Imunologia, Université de Paris V; Professor Associado do Departamento de Genética, UFRGS

5. Doutor em Medicina, UFRGS; Professor Associado do Departamento de Medicina Interna, UFRGS

6. Doutor em Medicina, Médico Imunologista, Chefe do Serviço de Imunologia, HCPA-UFRGS; Professor Associado do Departamento de Medicina Interna, UFRGS

7. Doutor em Imunologia, Shimane Medical University; Professor Associado, UFRGS; Chefe do Serviço de Reumatologia, HCPA-UFRGS

Correspondência para: Ricardo Machado Xavier. Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, sala 645. CEP: 90035-003. Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: rmaxavier@hcpa.ufrgs.br

liberação de várias citocinas e redução da atividade das células *natural killer* (NK).⁴

As células NK apresentam receptores, denominados *killer immunoglobulin-like receptor* (KIR), que são representantes da família das imunoglobulinas presentes na superfície celular. Esses receptores estão divididos em grupos funcionais inibitórios (evitam a lise da célula-alvo) e ativadores (causam a lise da célula-alvo).⁵ O receptor inibidor reconhece o HLA de classe I específico, prevenindo o ataque das células NK contra células normais; em contrapartida, o receptor ativador é acionado quando os receptores KIR inibidores não reconhecem a célula-alvo, acionando as células NK para a destruição.⁶ A capacidade de atacar as próprias células que não possuem expressão do HLA-I é conhecida como *missing self-recognition*. Essa hipótese tem sido amparada por diversas constatações independentes, demonstrando que os antígenos HLA realmente protegem as células da lise por células NK fornecendo sinais negativos que inibem a função das células NK.⁷

Teoricamente, qualquer combinação ligante inibitória KIR-HLA deve ser capaz de neutralizar a ativação. A função das células NK é regulada por sinais positivos e negativos transmitidos por meio de pares de receptores ativadores e inibitórios. *In vivo*, as células NK estão sob o domínio de receptores inibitórios para os ligantes HLA-I próprios.⁸ Assim, as funções efetoras ocorrem apenas quando os sinais de ativação são capazes de superar a inibição da sinalização. Esta é obtida pelo predomínio de ativação das interações receptor-ligante ou pela falta de ligante inibitório do receptor.⁹

Um novo modelo foi proposto recentemente por Nelson *et al.*¹⁰ e prevê que, dependendo do genótipo, um determinado indivíduo poderia ser enquadrado em um de três grupos, de acordo com as características da atividade de suas células NK: 1) predominantemente sob o controle de receptores inibitórios (maior inibição); 2) controlada equitativamente por receptores inibitórios e ativadores (relativamente neutro); ou 3) predominantemente sob o controle de receptores ativadores (maior ativação). De modo semelhante, indivíduos que estão deficientes em ligantes para receptores inibidores (como é o caso entre homocigotos para HLA-Cw do grupo 1 ou 2) terão menos células NK sob o controle inibitório que indivíduos com todos os ligantes presentes.

Até o momento, apenas dois trabalhos avaliaram a atividade das células NK por esse modelo – um em diabetes¹¹ e o outro em psoríase.¹² Devido à escassez de estudos sobre o assunto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade das células NK em um grupo de pacientes com ES comparando-o com um grupo-controle.

PACIENTES E MÉTODOS

Todos os participantes receberam a explicação sobre o teor da pesquisa e, de forma livre e voluntária, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, sem que sua decisão comprometesse a relação entre médico e paciente. O estudo, em todos os seus princípios e metodologias, obteve a aprovação do Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Pacientes

Foram incluídos neste estudo 110 pacientes com ES provenientes do Ambulatório de Reumatologia do Serviço de Reumatologia do HCPA. Todos estavam diagnosticados de acordo com os critérios do *American College of Rheumatology* 1987,¹³ ou pelos critérios de LeRoy e Medsger¹⁴ para formas precoces de ES. Pacientes com síndromes de superposição com outras doenças difusas do tecido conjuntivo (exceto síndrome de Sjögren) foram excluídos do estudo.

Controles

Como grupo-controle foram analisados 115 indivíduos não aparentados registrados voluntariamente para serem possíveis doadores de medula óssea (REDOME), provenientes do Serviço de Imunologia do HCPA. Foram excluídos da amostra indivíduos com doenças crônicas e agudas, assim como os que apresentavam história familiar de doenças genéticas (doenças ligadas ao cromossomo X, doenças autossômicas ou anormalidades cromossômicas).

Estudo imunogenético

As amostras de DNA foram extraídas pelo método de *salting out*¹⁵ e amplificadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). A sequência dos *primers* para a reação de PCR foi a descrita por Gómez-Lozano *et al.*¹⁶

Para a amplificação do DNA utilizou-se uma mistura com 1 µL de *Buffer* 10x, MgCl₂ 50 nM, dNTP's 25 mM, 0,5 U taq polimerase, 10 ng de DNA, 100 nm de controle interno e 500 mM de *primer* específico. A temperatura inicial para a amplificação foi de 94°C durante 3 minutos. Depois, houve 4 ciclos com 15 s a 94°C, 15 s a 65°C e 30 s a 72°C. Em seguida, 21 ciclos com 15 s a 94°C, 15 s a 60°C e 30 s a 72°C. Para finalizar, 5 ciclos com 15 s a 94°C, 60 s a 55°C e 120 s a 72°C. O produto ficou mais 420 s a 72°C.

O produto do PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão tris-acetato-EDTA (TAE), e a corrida eletroforética ocorreu em 20 min a 200 V, em temperatura ambiente. As bandas foram

visualizadas e fotografadas em luz UV por coloração do brometo de etídio.

Análise estatística

Aplicou-se o modelo que prevê a atividade das células NK, fundamentado da seguinte forma: a) KIR2DS1 e/ou KIR2DS2 com HLA-Cw homocigoto para grupo 1 ou 2 (combinação de suscetibilidade – excesso de ativação); b) KIR2DS1 e/ou KIR2DS2 com grupo HLA-Cw heterocigoto; c) falta de KIR2DS1 ou KIR2DS2 com grupo HLA-Cw homocigoto (combinação relativamente neutra – equilíbrio, *balance*); e d) falta de KIR2DS1 ou KIR2DS2 com grupo HLA-Cw heterocigotos (combinação de proteção – excesso de inibição). Os resultados foram avaliados pelo teste de qui-quadrado de Pearson, pelo programa SPSS 16.0. Considerou-se estatisticamente significativo um valor de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

O perfil genético dos pacientes pode ser observado na Tabela 1. Como podemos observar, a presença de todos os genes KIR tende a apresentar um fator de proteção ao desenvolvimento da ES. Verificamos que 1,77% dos pacientes com ES apresentam esse perfil genético, comparado a 13,9% do grupo-controle com esse mesmo perfil ($P < 0,001$). Os outros perfis genéticos não apresentaram diferença significativa.

A ativação da célula NK pode ser previsível pela possível combinação da ativação ou inibição de receptores com a molécula HLA-C. Essa previsão indica que, dependendo do genótipo, um indivíduo pode ter mais células NK com excesso de ativação, equilíbrio ou excesso de inibição. Em nosso estudo, constatamos que os pacientes com ES apresentam excesso de ativação, quando comparados ao grupo-controle (Tabela 2). Dos 110 pacientes com ES, 34 (29,6%) tiveram excesso de ativação, comparado a 22 (19,1%) dos 115 indivíduos saudáveis. Ao analisar o excesso de inibição em cada grupo, conferimos que o grupo-controle apresentou maior frequência desse perfil.

Estudos anteriores evidenciaram que a presença do gene inibidor KIR2DL2 em pacientes pode estar relacionada a um fator de proteção para desenvolver a ES. Para testar essa hipótese, estratificamos os pacientes de acordo com presença e ausência desse gene (Tabela 3). Ao considerar somente pacientes com 2DL2 positivo, identificamos que o grupo-controle apresenta excesso de inibição (34,7%) em relação aos pacientes com a doença (10,9%), com uma diferença estatisticamente significativa ($< 0,001$). Quando analisamos o estado das células em equilíbrio ou o excesso de ativação na presença do gene 2DL2, não encontramos diferença estatística significativa. Os pacientes com ES apresentam 10,2% em excesso de ativação e 10% em equilíbrio, similar aos controles, que apresentam 16,5% e 11,3%, respectivamente. Avaliando

Tabela 1

Frequência do perfil genético do sistema KIR em pacientes com esclerose sistêmica (n = 110) e controles (n = 115)^y

Perfil KIR	2DL1	2DL2	2DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	3DS1	3DL1	Esclerose sistêmica, %	Grupo-controle, %
#1	+	-	+	-	-	-	+	-	+	23,4	24,3
#2	+	-	+	+	-	-	+	+	+	4,34	7,0
#3	+	-	+	-	+	-	+	-	+	6,08	0,0
#4	+	-	+	+	+	-	+	+	+	1,77	0,0
#5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,77 ^a	13,9 ^a
#6	+	+	+	-	+	-	+	-	+	9,73	13,9
#7	+	-	+	-	-	-	+	+	+	9,73	0,0
#8	+	+	-	-	-	-	+	-	+	0,0	6,1
#9	+	+	+	+	+	-	+	+	+	0,0	4,3
#10	+	+	+	-	+	+	+	-	+	2,6	4,3
#11	+	+	-	-	+	+	+	-	+	4,34	3,5
#12	+	-	+	+	+	+	+	+	+	5,21	0,0
#13	+	-	-	-	-	-	+	-	+	3,5	0,0
Outros*										22,6	21,7

^yAnálise estatística realizada por meio do teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson.

*Perfil genético observado em somente uma pessoa foi combinado (outros).

^aP = 0,00085; razão de chances = 0,11; intervalo de confiança de 95% (0,012–0,497). Os outros perfis genéticos não tiveram significância estatística.

Tabela 2

Análise da ação das células *natural killer* em pacientes com esclerose sistêmica (n = 110) e grupo-controle (n = 115)

	Controles		Esclerose sistêmica		P*
	n	%	n	%	
Excesso de ativação	22	19,1	34	29,6	0,001
Equilíbrio	20	17,4	36	31,3	
Excesso de inibição	73	63,5	40	39,1	

*Teste de qui-quadrado de Pearson.

Tabela 3

Previsão de ação das células *natural killer* em pacientes e controles estratificados por presença ou ausência de KIR2DL2

	KIR2DL2 positivo			KIR2DL2 negativo		
	EA	B	EI	EA	B	EI
Controles	16,5%	11,3%	34,7%	2,6%	6,1%	26,1%
Pacientes	10,2%	10,0%	10,9%	20,9%	20,9%	29,10%
P*	NS	NS	< 0,001	< 0,001	0,001	NS

EA: excesso de ativação; B: equilíbrio; EI: excesso de inibição; NS: não significativo.

*Teste de qui-quadrado de Pearson.

pacientes com ausência do gene KIR2DL2, encontramos resultados diversos. A frequência de excesso de inibição nos pacientes (29,1%) é semelhante à do grupo-controle (26,1%). Por conseguinte, o estado da célula em excesso de ativação e equilíbrio apresenta frequência menor em indivíduos sadios (2,6% e 6,1%, respectivamente) em comparação com pacientes com ES (20,9% e 20,9%, respectivamente).

DISCUSSÃO

A ES é uma doença multifatorial complexa. A hipótese mais aceita sobre a patogênese da ES é que a ativação do sistema imune é desencadeada pela interação entre fatores ambientais e predisposição genética.¹⁷ Alguns fatores genéticos podem influenciar a suscetibilidade para desenvolvê-la. A história familiar representa o maior fator de risco identificado; no entanto, o risco absoluto para cada membro da família é baixo (< 1%). O risco relativo em parentes de primeiro grau é de 10 a 16, e entre gêmeos monozigóticos é de 10 a 27.¹⁸ Muitos estudos sugerem que a suscetibilidade genética sozinha não é suficiente para induzir a doença.

Em nosso estudo, observamos que 9,73% dos pacientes com ES apresentam o ativador 2DS2 e o inibidor 2DL2, com ausência dos ativadores 2DS1, 2DS3 e 3DS1, comparado a 13,9% do grupo-controle, podendo existir uma proteção também nesse perfil. Ao analisar o perfil de pacientes com

ausência do inibidor 2DL2 e dos ativadores 2DS1, 2DS2 e 2DS3, encontramos esse perfil somente em pacientes com ES (9,73%). Inversamente, o perfil com presença do inibidor 2DL2 e ausência dos ativadores só foi encontrado no grupo-controle (6,1%), assim como a presença de todos os genes (incluindo o ativador 2DS2 e o inibidor 2DL2) foi encontrada em maior frequência no grupo-controle, comparado ao grupo de pacientes. Esses dados mostram a importância do inibidor 2DL2 no desenvolvimento da ES, e vão ao encontro de um estudo anterior, que mostrou aumento da frequência do ativador KIR2DS2 na ausência do inibidor KIR2DL2 em pacientes com ES.¹⁹ Recentemente, usando dados dos mesmos pacientes envolvidos no presente estudo, relatamos um efeito protetor do gene inibidor 2DL2 no desenvolvimento da ES.²⁰ Essa combinação de genes KIR também tem sido observada na patogênese de outras doenças reumáticas. Na artrite reumatoide, a presença de KIR2DS2 foi relacionada à vasculite;²¹ na artrite psoriásica, observou-se associação de KIR2DS2 na ausência de ligantes de KIR2DL2 com maior risco de desenvolvimento da doença.¹¹ Também há evidências que sugerem o envolvimento da combinação KIR2DS2+/KIR2DL2- na patogênese da síndrome de Sjögren.²²

Estudos recentes sugerem que os genes HLA-I podem ter um papel na suscetibilidade e na expressão em doenças autoimunes como artrite reumatoide, espondilite anquilosante e lúpus eritematoso sistêmico, por meio da interação com receptores KIR. Com base no raciocínio de que um KIR ativador, como o KIR2DS2, pode favorecer o desenvolvimento de ES se o ligante para qualquer KIR2DL1 ou KIR2DL2/3 estiver em falta (ou seja, homocigotos para um grupo de ligantes HLA-Cw), empregou-se o novo modelo proposto por Nelson *et al.*,¹⁰ que se encaixa adequadamente em nossa compreensão da expressão e da função do KIR, e que apresenta um suporte estatístico mais robusto para o papel do KIR na suscetibilidade à ES que o modelo anterior.

Estudos prévios associando os genes KIR na ES evidenciaram importantes resultados referentes à suscetibilidade à doença. Porém, nenhum deles avaliou o perfil de ação das células NK em pacientes e controles – foram avaliados apenas os genes isoladamente. Nosso estudo mostrou que os indivíduos sadios apresentam excesso de inibição quando comparados a pacientes com ES (P < 0,001), o que corrobora um estudo realizado em pacientes com diabetes,²³ em que se encontrou excesso de inibição em controles (25,71%) quando comparados a pacientes (1,02%). Entretanto, em outro estudo, ao analisar tal modelo em pacientes com psoríase, não se encontrou diferença estatística entre pacientes e controles (P = 0,822).¹²

Quando estratificamos os pacientes pelo gene que estava associado à ES (KIR2DL2), encontramos excesso de inibição nos controles com presença do KIR2DL2 ($P < 0,001$). Quando esse gene estava ausente, houve prevalência de excesso de ativação ($P < 0,001$) e de equilíbrio ($P = 0,001$) nos pacientes com ES, sugerindo papel importante desse gene no desenvolvimento da doença. Essas observações corroboram ainda mais a hipótese de uma proteção dominante conferida por alguns genes KIR inibitórios.

CONCLUSÃO

O desequilíbrio entre o número de KIR ativador/inibidor parece ser importante para a suscetibilidade e a proteção contra a doença. Se modelos perspicazes são utilizados na análise de dados, a interação entre os genes KIR/HLA-C pode indicar o papel das células NK na patologia da doença. Níveis adicionais de variações, como polimorfismos alélicos, precisam ser investigados, assim como são necessários novos estudos de associação de genes KIR com outras desordens autoimunes. Os resultados sugerem que as experiências com a função das células NK podem ser mais informativas.

REFERENCES

REFERÊNCIAS

1. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr., et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15:202–6.
2. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF. Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Mol Immunol* 2004; 41:1123–8.
3. Krieg T, Abraham D, Lafyatis R. Fibrosis in connective tissue disease: the role of the myofibroblast and fibroblast-epithelial cell interactions. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(Suppl 2):S4.
4. Kraling BM, Maul GG, Jimenez SA. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiology* 1995; 63:48–52.
5. Moretta A, Sivori S, Vitale M, Pende D, Morelli L, Augugliaro R, et al. Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med* 1995; 182:875–9.
6. Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, Moretta A. Different checkpoints in human NK-cell activation. *Trends Immunol* 2004; 25:670–8.
7. Yu J, Venstrom JM, Liu XR, Hasan RS, O'Reilly R, Pring J, et al. Breaking tolerance to self, circulating natural killer cells expressing inhibitory KIR for non-self HLA exhibit effector function following T-cell depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2009; 113:3875.
8. Boyton RJ, Altmann DM. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 149:1–6.
9. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 2009; 457 (7229), 557.
10. Nelson GW, Martin MP, Gladman D, Wade J, Trowsdale J, Carrington M. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol* 2004; 173:4273–6.
11. Martin MP, Nelson G, Lee JH, Pellett F, Gao X, Wade J, et al. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol* 2002; 169:2818–22.
12. Jobim M, Jobim LF, Salim PH, Cestari TF, Toresan R, Gil BC, et al. A study of the killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 in a Caucosoid Brazilian population with psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* 2008; 72:392–6.
13. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Committee. Arthritis Rheum* 1980; 23:581–90.
14. LeRoy EC, Medsger TA Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001; 28:1573–6.
15. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
16. Gómez-Lozano N, Vilches C. Genotyping of human killer-cell immunoglobulin-like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence-specific primers: an update. *Tissue Antigens* 2002; 59:184–93.
17. Tan FK. Systemic sclerosis: the susceptible host (genetics and environment). *Rheum Dis Clin North Am* 2003; 29:211.
18. Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum* 2001; 44:1359.
19. Momot T, Koch S, Hunzelmann N, Krieg T, Ulbricht K, Schmidt RE, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. *Arthritis Rheum*. 2004; 50:1561–5.
20. Salim PH, Jobim M, Bredemeier M, Chies JA, Schlottfeldt J, Brenol JC, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2010; 160:325–30.
21. Majorczyk E, Pawlik A, Łuszczek W, Nowak I, Wiśniewski A, Jasek M, et al. Associations of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with complications of rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2007; 8:678–83.
22. Lowe DP, Cook MA, Bowman SJ, Briggs DC; UK Sjögrens Interest Group. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2009; 48:359–62.
23. Shastry A, Sedimb SK, Rajalingam R, Nikitina-Zake L, Rumba I, Wiggell H, et al. Combination of KIR 2DL2 and HLA-C1 (Asn 80) confers susceptibility to type 1 diabetes in Latvians. *Int J Immunogenet* 2008; 35:439–46.