

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Mariana Sampaio Leite Jobim Wilson

**ASSOCIAÇÃO DO GENE KIR2DS1 NA PSORÍASE VULGAR EM POPULAÇÃO
CAUCASÓIDE BRASILEIRA**

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre
2008

Mariana Sampaio Leite Jobim Wilson

**ASSOCIAÇÃO DO GENE KIR2DS1 NA PSORÍASE VULGAR EM POPULAÇÃO
CAUCASÓIDE BRASILEIRA**

Dissertação para obtenção do título de Mestre
apresentada à Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Médicas

Orientador: Prof. Gilberto Schwartzmann

Porto Alegre

2008

W751a **Wilson, Mariana Sampaio Leite Jobim**

Associação do gene KIR2DS1 na psoríase vulgar em população caucasóide brasileira / Mariana Sampaio Leite Jobim Wilson ; orient. Gilberto Schwartzmann. – 2008.

67 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2008.

1. Psoríase 2. Genética 3. Raça caucasóide I. Schwartzmann, Gilberto II. Título.

NLM: WR205

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Aos meus pais, Luiz Fernando e Regina, e ao meu irmão Eduardo pelo incentivo e carinho.

Ao meu marido Timothy, pela cumplicidade, apoio e amor.

Ao meu filho Gabriel, por ser minha maior alegria.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Gilberto Schwartzmann, pela acolhida como orientador e estímulo na realização desta pesquisa.

Ao Professor Luiz Fernando Jobim, pela indispensável colaboração no desenvolvimento do trabalho laboratorial.

A Professora Tânia Cestari, pelo incentivo e oportunidade de trabalhar com seus pacientes.

Aos colegas de laboratório, Patrícia Salim, Realdete Toresan, Jeanine Schlottfeldt, Beatriz Chamun Gil, Adriane Külzer e Mônica Krüger por todo auxílio teórico e prático.

Aos pacientes que participaram deste estudo, minha sincera gratidão.

RESUMO

A psoríase vulgar (PV) é uma doença crônica e inflamatória da pele, cuja patogênese e influência genética permanecem pouco esclarecidas. Estudos anteriores indicam uma associação entre essa patologia e os receptores do tipo imunoglobulina das células “natural killer” (KIR). Na pesquisa atual, analisamos 15 genes KIR e os alelos do sistema HLA-Cw06 em 79 pacientes caucasóides brasileiros com PV e em 110 controles saudáveis, usando a técnica de PCR com oligonucleotídeos de seqüência específica (PCR-SSO) e também pela técnica de PCR com *primers* específicos (PCR-SSP). Observamos um aumento significativo do gene ativador KIR2DS1 no grupo de pacientes com PV (KIR2DS1, 46 de 79 casos ou 58,2%; comparativamente a 40 dos 110 controles ou 36,4% - $p < 0,0062$). Além disso, uma associação entre o gene KIR2DS1 e o alelo Cw0602 foi documentada em 26,5% dos pacientes com PV, enquanto somente 5,4% dos controles apresentaram essa combinação ($p < 0,001$). Esses resultados sugerem que o gene ativador KIR2DS1 possa conferir susceptibilidade para PV na população estudada.

ABSTRACT

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease, whose pathogenesis and genetic background remains unclear. Considering that previous studies have suggested an association of Psoriasis Vulgaris (PV) and killer immunoglobulin-like receptors (KIRs), we typed 15 KIR genes and HLA-Cw in 79 Brazilian Caucasoid patients with PV and 110 healthy controls, by PCR using sequence specific oligonucleotides (PCR-SSO) and PCR with specific primers (PCR-SSP). We observed a significant increase in the frequency of the activating KIR2DS1 gene in the PV group (KIR2DS1, 46 of 79 cases (58.2%) versus 40 of 110 controls (36.4%) $p < 0.0062$). Furthermore, an association of KIR2DS1 with Cw 0602+ in 26.5% of PV patients was documented, while it was shown in only 5.4% of controls ($p < 0.001$). These results suggest that activating KIR2DS1 gene may confer susceptibility to PV in this population.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Psoríase Vulgar ou em placa

FIGURA 2. Psoríase crônica generalizada

FIGURA 3. Psoríase pustular generalizada

FIGURA 4. Placa de psoríase mostrando hiperplasia da epiderme, alongamento das papilas e paraqueratose

FIGURA 5. Microabscessos de Munro, infiltrado de neutrófilos e paraqueratose

FIGURA 6. Desenho ilustrativo das camadas da pele

FIGURA 7. Célula T (azul) interagindo com célula dendrítica

FIGURA 8. Célula NK lesando a célula tumoral

FIGURA 9. Interação dos receptores KIR com as moléculas de HLA

FIGURA 10. Interação da célula NK com a célula alvo

FIGURA 11. Diferenças na estrutura dos genes KIR, baseadas na cauda citoplasmática e no número de domínios

FIGURA 12. Haplótipo A na primeira linha; haplótipos B na segunda e terceira linha

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP – Artrite Psoriática

CD – Célula Dendrítica

CLA – Antígenos Leucocitários Cutâneos

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid - Etileno diamino tetra-acético

GM-CSF – Fator estimulatório de colônias de granulócitos monócitos

HIV – Human Immunodeficiency Virus - Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA – Human Leukocyte Antigen - Antígenos de Histocompatibilidade Humana

ICAM 1– Intercellular Adhesion Molecule 1 - Molécula de Adesão Intercelular 1

IL – Interleukin - Interleucina

INF – Interferon

KIR - Killer Immunoglobulin Like Receptor – Receptor do tipo Imunoglobulina da Célula NK

MgCl - Cloreto de Magnésio

NK - Natural Killer Cells - Células Matadora Naturais

NK-T - Natural Killer T Cells - Células Matadora Naturais tipo T

PCR – Polimerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase

PCR-SSO - PCR baseado em seqüência de oligonucleotídeos específicos

PCR-SSP - PCR baseado em seqüência de primers específicos

PSORS - Locos da susceptibilidade de Psoríase

PV - Psoríase Vulgar

TCR – T cell receptor - Receptor de célula T

TGF – Tumor Growth Factor - Fator de Crescimento Tumoral

Th - Linfócito T helper – Linfócito T auxiliar

TNF – Tumor Necrosis Factor - Fator de Necrose Tumoral

TNRF – Tumor Necrosis receptor Family - Família dos Receptores de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1. REVISÃO DA LITERATURA	12
1.1 PSORÍASE	12
1.1.1 Manifestações clínicas	12
1.1.2 Susceptibilidade genética para PV	15
1.1.3 Histopatologia.....	15
1.1.4 Fisiopatologia da Psoríase	17
1.2 Células Natural Killer	20
1.2.1 Funções da célula NK	21
1.3 Genes KIR	23
1.3.1 Nomenclatura dos genes KIR.....	25
2. JUSTIFICATIVA.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo primário	28
3.1.2 Objetivos secundários	28
4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA.....	29
5. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS.....	34
6. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM PORTUGUÊS	47
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	61
ANEXO.....	63
ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	63
ANEXO II - PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS.....	66
ANEXO III - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-REDOME .	67

INTRODUÇÃO

As células “natural killer” (NK), assim como os linfócitos T e B, são originadas na medula óssea. As primeiras fazem parte do sistema imune inato, tendo a habilidade de destruir células alogênicas, células modificadas por vírus e células tumorais. Além disso, podem secretar citocinas, as quais modulam o sistema imune adaptativo. Essas últimas, através dos seus receptores de superfície, podem ser ativadas ou não, no sentido de destruir as suas células-alvo (1, 2).

As células NK reconhecem as moléculas de HLA (“human leucocyte antigen” ou antígeno leucocitário humano) de classe I, presentes nas células-alvo, por intermédio de uma família de receptores de superfície envolvida na sua atividade citolítica. Os principais receptores das células NK são os KIR (“killer immunoglobulin-like receptors” ou receptores de tipo imunoglobulina “killer”) (2, 3).

A atividade citolítica da célula NK depende da integridade do HLA de classe I, expresso na superfície da célula-alvo e de um KIR específico, expresso na célula NK. Quando existir a interação apropriada entre o KIR e o HLA de classe I, acontece a inibição da célula NK, não ocorrendo o ataque da célula-alvo. Caso contrário, a essa última é destruída (4).

Os genes KIR que codificam estes receptores estão localizados no cromossomo 19q13.4, junto com todos os outros genes do complexo de receptores leucocitários (5). A família KIR é altamente polimórfica e o seu funcionamento regula a função da célula NK, além de interferir na fisiopatologia de várias doenças, entre elas a psoríase, a esclerose sistêmica, a diabetes tipo 1, a doença de Crohn, a colite ulcerativa, a imunodeficiência humana adquirida (AIDS), a hepatite C, a bronquiectasia idiopática, os abortos espontâneos de repetição, a endometriose e o câncer. (6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18).

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Psoríase

Psoríase é uma doença inflamatória da pele, crônica, não-contagiosa, de causa ainda desconhecida. Caracteriza-se pelo aparecimento de lesões róseas ou avermelhadas, recobertas de escamas secas e esbranquiçadas. É importante também referir que as características clínicas da doença causam grande impacto na qualidade de vida dos pacientes (19).

A prevalência da doença é difícil de se obter devido à falta de critérios validados, porém reconhece-se que varia muito entre as etnias (19). A população caucasóide é a mais comumente afetada, tendo prevalência de 1,5%, enquanto que em japoneses a prevalência reduz para 0,3% (19, 20, 21). Outro fator de influência benéfica parece ser a latitude próxima ao Equador graças ao maior recebimento de luz solar; além disso, incide em homens e mulheres igualmente (19). A doença pode manifestar-se em qualquer idade, contudo ocorre geralmente perto dos 20 anos e entre 50 e 60 anos (20), tendo a idade média de 33 anos (19,21).

1.1.1 Manifestações clínicas

O tipo mais comum é a psoríase vulgar (PV) ou em placas com 90 % dos casos. Caracterizam-se por placas escamosas secas e aderentes, bem delimitadas e de cor avermelhada. As lesões são geralmente simétricas, de tamanho variado, afetando geralmente a face de extensão dos membros, especialmente joelhos e cotovelos, couro cabeludo, região lombo-sacra e umbigo. A evolução é crônica, com períodos de exacerbação e de acalmia (figuras 1 e 2) (19,22).

A psoríase gutata ou em gota, mais comum em crianças ou em jovens, pode ter início com pequenas lesões após infecção estreptocócica do grupo A; nestes casos, a cura espontânea é bem provável. Apresentações menos comuns são a psoríase pustular, com quadro generalizado com lesões eritemato-escamosas e pustulosas, levando à leucocitose e à febre com comprometimento do estado geral do paciente (figura 3) (19,22,23).

A artrite psoriática ocorre em uma parcela dos pacientes com psoríase e cursa com quadro de inflamação nas cartilagens e nas articulações, desenvolvendo dor, dificuldades nos movimentos e alterações na forma das articulações. A psoríase eritrodérmica, por sua vez, difere das outras pelo seu caráter de intenso eritema e de discreta descamação (22).

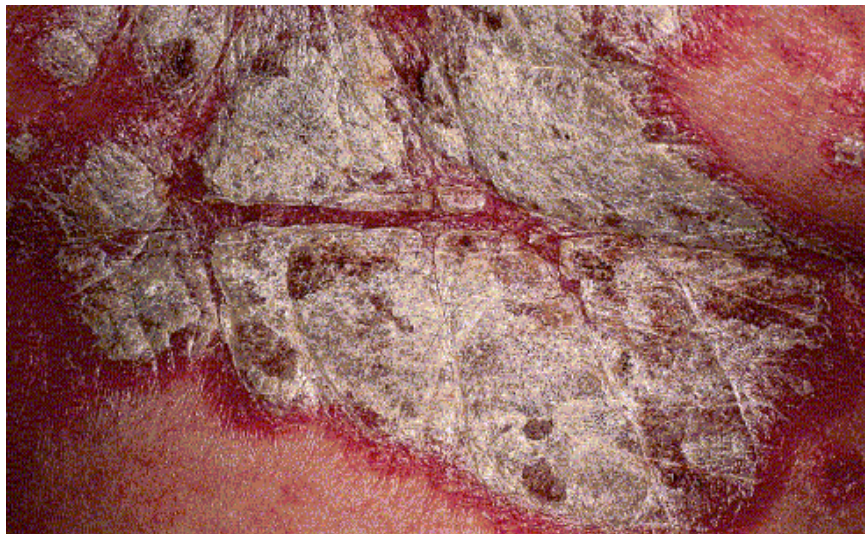


Figura 1: psoríase vulgar ou em placa (24)



Figura 2: psoríase crônica generalizada (24)

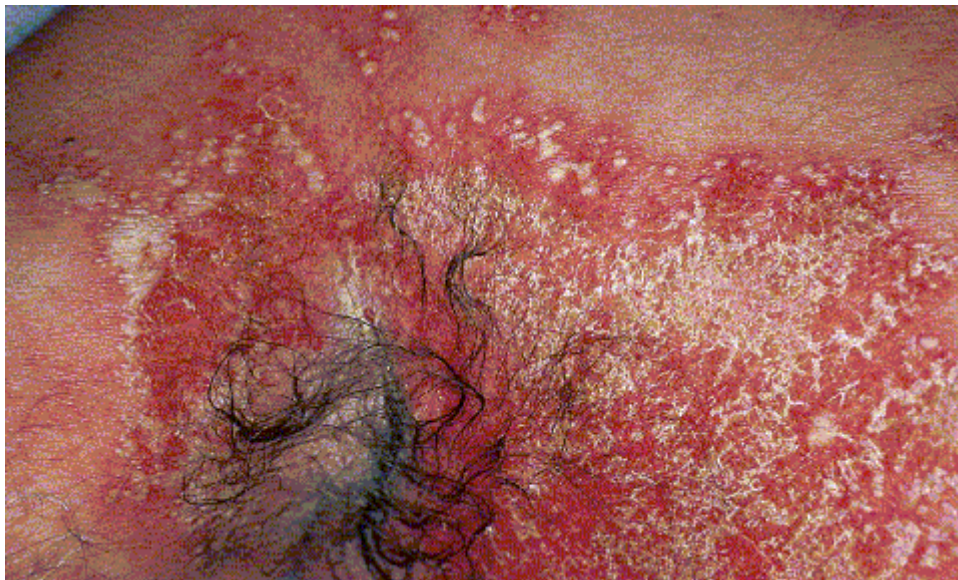


Figura 3: psoríase pustular generalizada (24)

1.1.2 Susceptibilidade genética para PV

A predisposição à doença é genética, ficando muito mais provável em parentes de primeiro e de segundo grau. Mais ou menos 30% dos pacientes com PV apresenta algum familiar com a doença (25). É necessário destacar também que o risco de PV em gêmeos monozigóticos é de duas a três vezes maior do que dizigóticos (26).

Ainda, é importante frisar que a psoríase possui associação com alguns antígenos leucocitários, entre eles HLA-Cw6, B13, B17, Bw57, DR4. Mesmo que a doença varie conforme as populações, o Cw6 permanece o mais prevalente; outro aspecto é que indivíduos com Cw6 têm 10 vezes mais chance de desenvolver a doença (27,28).

Estudos recentes descreveram o gene da susceptibilidade, PSORS1, localizado na região do cromossomo 6 do HLA (29), cuja presença aparece mais na psoríase precoce. Por outro lado, a psoríase gutata possui maior relação com o Cw6 e com as infecções pós-estreptocócicas (30).

Em uma minoria de casos, o desenvolvimento da doença segue o padrão mendeliano (autossômico dominante ou recessivo), de um único gene responsável. Existe um consenso de que múltiplos genes estão envolvidos na doença (PSORS1-9), além de fatores ambientais importantes (19, 29).

Importa também mencionar que os fatores implicados na exacerbação da doença são muitos, como trauma cutâneo, infecções (principalmente estreptococo beta-hemolítico), drogas como lítio, beta-bloqueadores, antiinflamatórios não-hormonais, cloroquina, tetraciclina, interferon, HIV, abuso de álcool e estresse emocional (31,32).

1.1.3 Histopatologia

Na lesão da psoríase, encontram-se três achados histológicos típicos: hiperplasia epidermal, edema e dilatação dos vasos da papila, infiltrado inflamatório denso composto de leucócitos T CD8+ e neutrófilos. A presença de agrupamentos de neutrófilos granulares na epiderme forma os conhecidos microabscessos de Munro (figura 4) (22,23).

Outros achados são a acantólise (perda de adesão entre as células epidérmicas), o desaparecimento da camada granulosa, a paraqueratose (alteração da queratinização), a hiperqueratose (espessamento da camada córnea) e o infiltrado inflamatório (figura 5 e 6) (22,23).

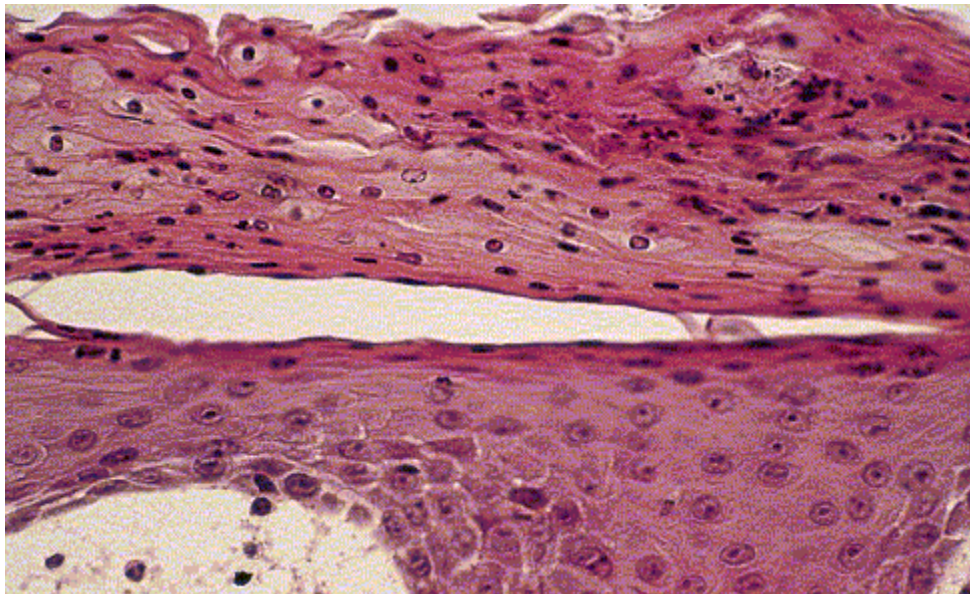


Figura 4: microabscessos de Munro. Infiltrado de neutrófilos e paraqueratose (24)

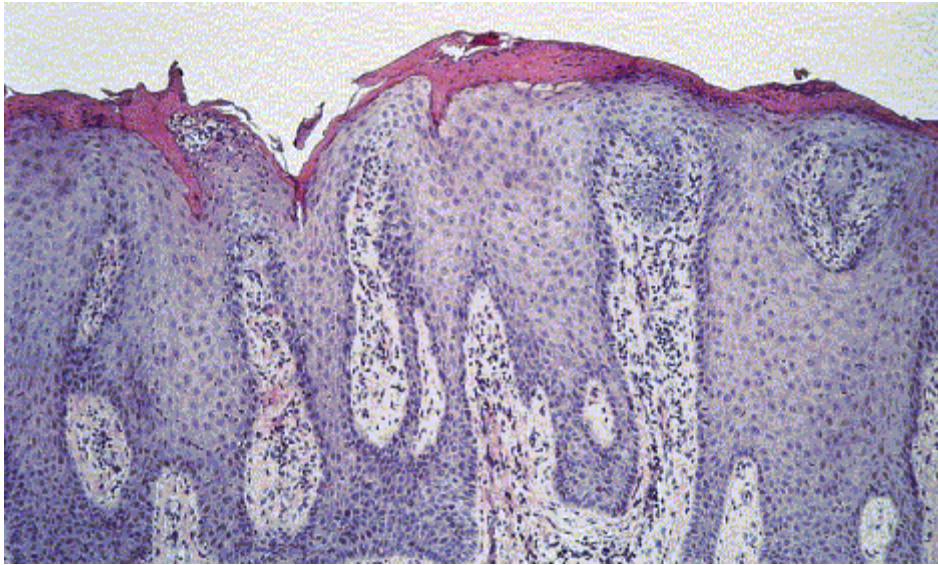


Figura 5: placa de psoríase, evidenciando hiperplasia da epiderme, alongamento das papilas e paraqueratose (24)

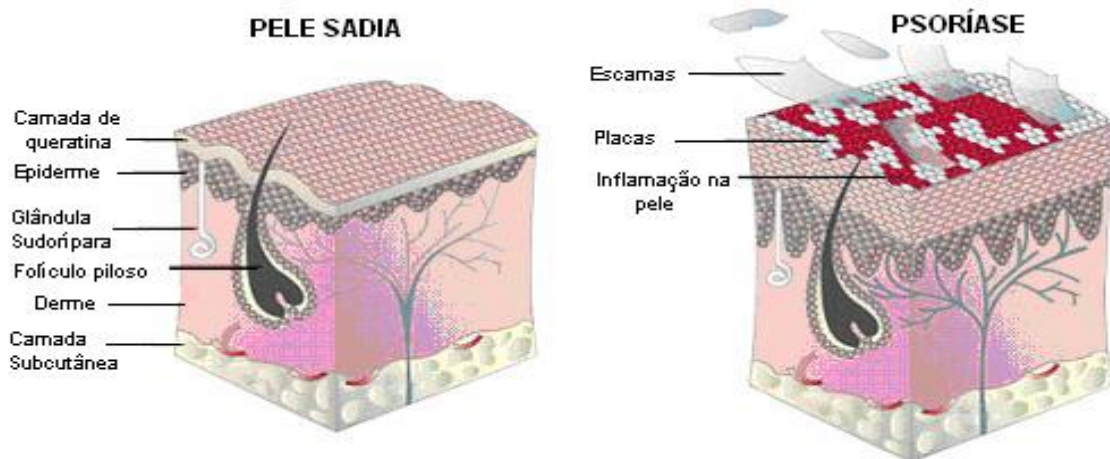


Figura 6: camadas da pele, demonstrando infiltrado inflamatório e perda de adesão das células (33)

1.1.4 Fisiopatologia da psoríase

Os primeiros relatos de alterações na pele compatíveis com a psoríase foram no Antigo Testamento. Até o final dos anos 70, supunha-se que a hiperproliferação de

queratinócitos associada à diferenciação epidérmica anormal fosse a causa primária da psoríase (34). No entanto, nos anos 80 e 90 três observações levaram a crer que era uma doença mediada por células T ativadas (35).

A primeira delas foi com uso da ciclosporina A que fazia redução da proliferação da célula T e da produção de citocinas (36). O uso do anti CD4, também modulador da célula T, igualmente favorecia a melhora da doença (37). A segunda observação se deu quando os pacientes psoriáticos receberam transplante de célula-tronco de doador sadio, devido a outra doença de base, e tiveram as suas lesões curadas. No entanto, se um paciente sadio recebesse medula de um doador com psoríase, freqüentemente se observava o desenvolvimento da doença (38).

Atualmente se reconhece a hiperplasia epidérmica como uma reação à ativação do sistema imune em regiões focais da pele, o que, por sua vez, é mediada por linfócitos T CD8+ e CD4+, que se acumulam na pele doente, assim como o aumento de citocinas da resposta Th1, como IL2, IL12, INF α e INF γ , levando a uma disfunção dos queratinócitos (39). A maioria das células CD4+ migra para a derme em locais de placas novas e de lesões já estabelecidas, enquanto as células CD8+ permanecem na epiderme. Ainda, a maioria das células T na pele expressa altos níveis de HLA de classes II e CD25 (IL-2), demonstrando, pois, atividade das células (40).

É motivo de controvérsia como as placas de psoríase se estabelecem e permanecem ativas, precisamente de que modo a célula T se mantém em atividade. Não resta dúvida de que a doença é auto-imune, no entanto até agora não foi definido qual seria o auto-antígeno - o mais provável é que fosse a própria queratina (19).

A imunofenotipagem das células T da pele psoriática mostra que são basicamente células T de memória: CD2+, CD3+, CD45RO, CLA+, CD45RO (célula T de memória), com a maioria expressando marcadores ativadores, como HLA-DR, CD25 (receptor de IL-2) e CD27 (40). Os CLA (antígenos leucocitários cutâneos) são subtipos de linfócitos de memória que residem na pele doente (40,41).

Atualmente, as células dendríticas (CD), sobretudo as células de Langerhans, e os peptídeos antimicrobianos endógenos (especialmente as catecolaminas) têm sido considerados na patologia da psoríase. As células de Langerhans agem como sentinelas do sistema imune, reconhecem e capturam antígenos, além de migrarem para os linfonodos – ainda, apresentam antígenos aos linfócitos T. Após esta interação, os linfócitos T de memória tornam-se ativados e uma complexa rede de citocinas e fatores de crescimento são liberados, mantendo um ciclo vicioso que facilita ainda mais a interação da célula T com as CD (figura 7) (20,42,43).

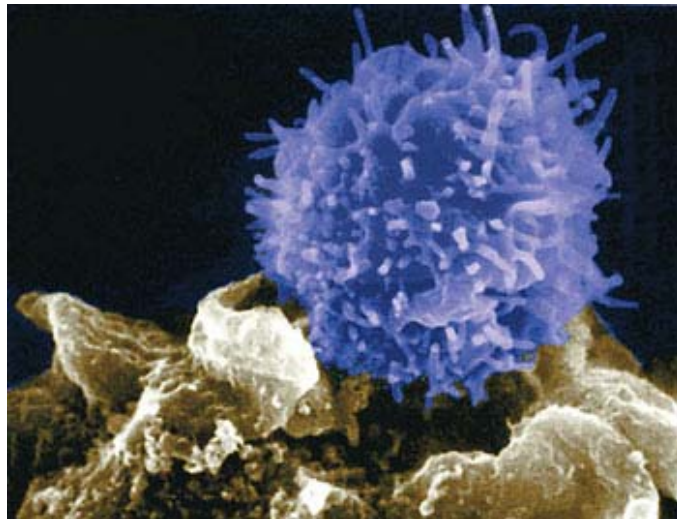


Figura 7: célula T (azul), interagindo com célula dendríticas (44)

Esta cascata de citocinas pode ser desencadeada por diversos fatores, como trauma, HIV, medicações. Dentre as primeiras, as mais importantes estão o $\text{INF}\gamma$, produzido pelos linfócitos Th1 e $\text{TNF}\alpha$, derivado da CD e do queratinócito. Este último é uma citocina pró-inflamatória potente, justificando o sucesso da terapêutica com anti-TNF.(43) O envolvimento das moléculas de adesão intercelular1 (ICAM1) e as selectina-E também facilitam o tráfego das células T (19,20).

A superexpressão dos antimicrobianos endógenos (catecolaminas e β defensinas) na pele psoriática, em contraponto com a diminuição destes peptídeos na dermatite

atópica, está relacionada a menos eventos infecciosos na psoríase (45). Recentemente, estudos na área clínica e de ciência básica têm evidenciado que o sistema imunológico inato assim como o adaptativo apresenta grande importância na iniciação e na manutenção da doença. Uma vez que a epiderme tem grande valor de proteção contra agressões ambientais, a hiperplasia epidérmica forma um componente fundamental para a resposta imune inata.

Desta forma, as células NK/NK-T fazem parte do infiltrado inflamatório, assim como os neutrófilos e os leucócitos (20). Todavia, as células NK, além de fazer parte do infiltrado, também possuem papel na regulação do sistema imune, principalmente pela sua participação na ativação das CD. O resultado final da interação é a ativação das células NK, gerando fenômenos de proliferação, citotoxicidade e produção de $\text{INF}\gamma$, enquanto as CD, vão ser capazes de ativar as células T, gerando o ciclo vicioso típico da doença (20).

1.2 CÉLULAS NATURAL KILLER

As células NK são linfócitos que diferem das células T e B. Morfologicamente são maiores e apresentam citoplasma granular. Sua distribuição é cerca de 10 a 15 % dos linfócitos do sangue, mas também está presente, em menor frequência, no pulmão, no trato gastrointestinal e no útero. As células NK são raras nos linfonodos e na medula óssea e não circulam pela linfa (46).

As células NK são precursoras da medula óssea e não dependem do timo para maturação; diversamente dos outros linfócitos, elas estão em constante renovação. Distingue-se, por sua vez, as células NK pela falta do receptor de célula T (TCR) e imunoglobulina e pela presença de antígenos de superfície CD56 e/ou CD16 (46).

A produção de citocinas por estas células é bastante variada, entre elas IL3, IL5, IL10, IL13, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{TGF-}\beta$ 1, GM-CSF, $\text{INF-}\gamma$. A liberação das citocinas regula a atividade do sistema imune, principalmente a função de macrófagos, linfócitos,

hemácias e células dendríticas. É importante referir também que a liberação de INF- γ possui uma particular importância na resposta Th1 (47).

A ativação das células NK por citocinas, principalmente IL-2, através das cadeias β e γ das células e do receptor (IL-2R), aumenta bastante a atividade citotóxica e de proliferação celular. A IL-15, que é produzida principalmente por macrófagos, também apresenta um papel importante na ativação celular, aumentando a resposta contra vírus. Os mecanismos de citotoxicidade podem ser por destruição da célula-alvo, devido às perforinas, ou por apoptose, mediada por receptores da superfamília dos receptores de necrose tumoral (TNRF) (46,47).

1.2.1 FUNÇÕES DA CÉLULA NK

1.2.1.1) Defesa contra células tumorais

A célula NK tem a capacidade de atacar as células tumorais e a deficiência dessas últimas leva à expansão do tumor; entretanto, elas não possuem a capacidade de inibir o seu desenvolvimento. Ainda, a atividade de morte da célula tumoral dá-se particularmente pelas citocinas IL-12, IL-15 e IL-18 (figura 8) (46).

1.2.1.2) Defesa contra infecções

As células NK possuem um papel fundamental na defesa contra vírus e outros patógenos intracelulares como bactérias e parasitas. Além disso, o mecanismo da célula contra infecções virais ocorre principalmente através da liberação de IL-12 com ativação das perforinas (46).

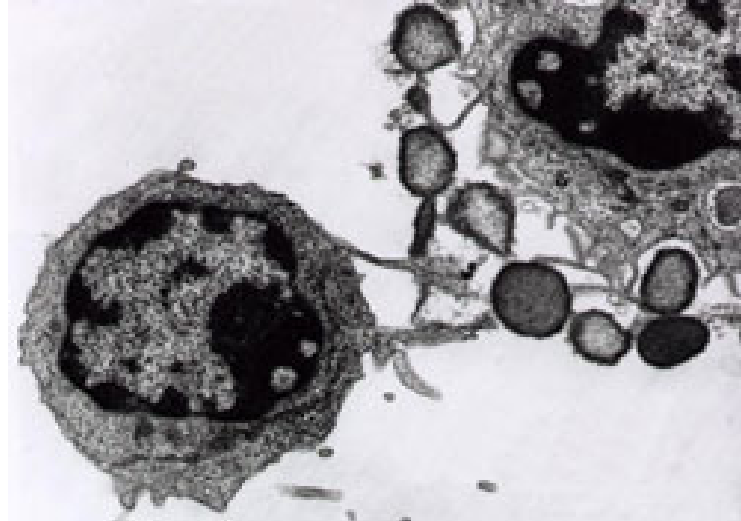


Figura 8: célula NK lesando a célula tumoral (46)

1.2.1.3) Regulação da imunidade e da auto-imunidade

Sabe-se que as células NK/NK-T são importantes na prevenção de determinadas doenças auto-imunes. A importância pode ser devido à fabricação de citocinas que regulam a resposta da célula T e com isso interferindo em toda resposta imune e auto-imune. Entretanto, o mecanismo para esta proteção ainda não é conhecido (46).

1.3 GENES KIR

Os receptores KIR (“killer immunoglobulin like receptors”) são representantes da família das imunoglobulinas presentes na superfície celular, sendo expressos principalmente em células NK e em alguns linfócitos T. Os genes KIR que codificam estes receptores estão localizados no cromossomo 19q13.4, junto com todos os outros genes do complexo de receptores leucocitários (48,49).

É necessário ressaltar que a família KIR é altamente polimórfica, tendo atualmente mais de 17 genes. A descoberta do KIR adicionou mais uma importante função às moléculas do HLA, codificados no cromossomo 6. Sobre as células NK, elas

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 9 e tabela 1) (48,49).

Outros receptores da célula NK, que também interagem com o HLA de classe I clássico e não-clássico, são os receptores de lectina. Eles apresentam o mesmo mecanismo de ativação e de inibição dos receptores KIR (50).

Receptor KIR	Ligante específico
KIR2DL1 e KIR2DS1	Grupo 2 (HLA Cw 2, 4, 5, 6)
KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS2	Grupo 1 (HLA Cw 1, 3, 7, 8)

Tabela 1 - receptores KIR com os seus respectivos ligantes HLA

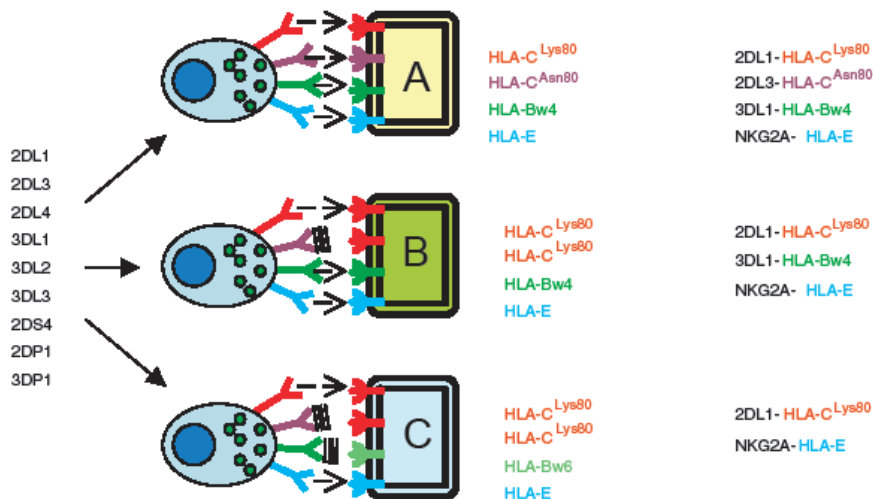


Figura 9: interação dos receptores KIR com as moléculas de HLA (51)

Deste modo, a atividade da célula NK depende de um determinado antígeno HLA de classe I e de um KIR específico, ativador ou inibidor, expresso na célula NK. Quando existir a interação de um subtipo de KIR inibidor, com determinado HLA de classe I, isso é um evento protetor para as células saudáveis, já que inibe a destruição espontânea mediada pelas células NK (figura 10) (49, 50).

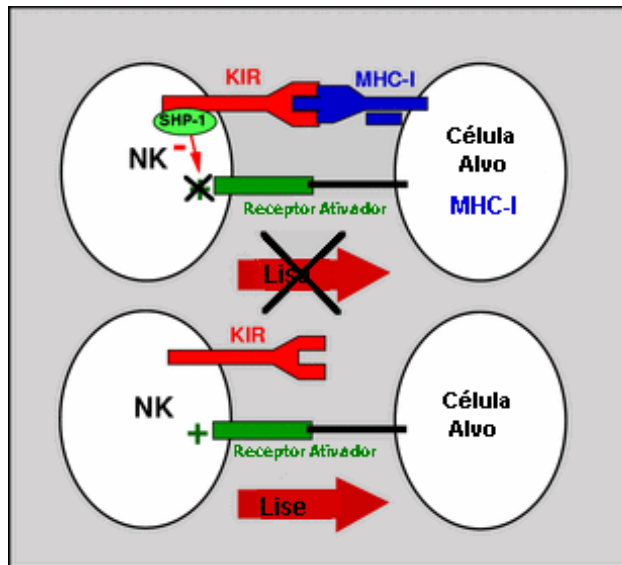


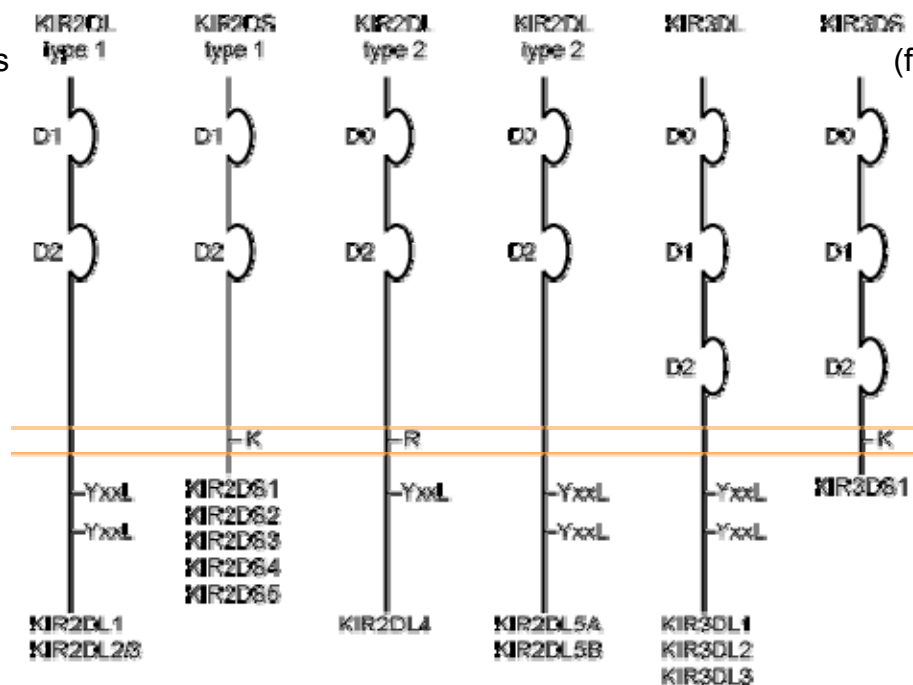
Figura 10: interação da célula NK com a célula-alvo (52)

1.3.1 Nomenclatura dos genes KIR

A nomenclatura mais usada é a baseada na estrutura da calda citoplasmática do gene (L para “long” – cauda longa – ou S para “short” – cauda pequena) e no número de domínios extracelulares de imunoglobulina (“Domains”) (2D ou 3D – 2 domínios extracelulares ou 3 domínios extracelulares) (*HUGO-endorsed nomenclatures*). Os genes KIR com cauda longa são inibidores e os de cauda curta

são

ativadores (53).



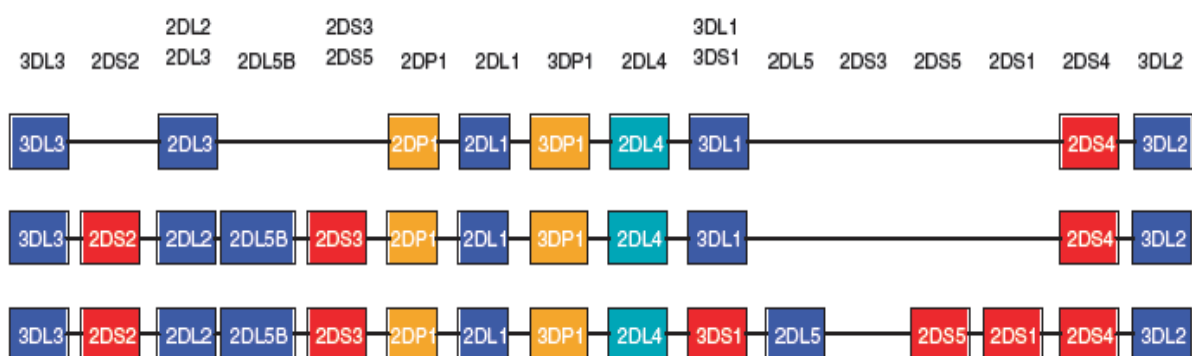
(figura 11)

Figura 11: diferenças na estrutura dos genes KIR, baseadas na calda citoplasmática e no número de domínios (54)

A ordem dos genes KIR no cromossomo foi determinada em duas categorias, ou seja, haplótipo “A” e “B”. Embora se saiba que exista uma série de outros haplótipos, a literatura trata basicamente dos mais prevalentes, o “A” e o “B”.

O haplótipo A apresenta sete locus e tem como característica um maior número de receptores inibitórios. Define-se, pois, pela presença de *2DL1*, *2DL3*, *2DL4*, *2DS4*, *3DL1*, *3DL2* e *3DL3*. O único receptor estimulatório no haplótipo A é o *2DS4*, enquanto no haplótipo B são inúmeras as combinações de *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS5*, *3DS1* e *2DS4*. Já o tipo B, possui mais genes que codificam a ativação destes receptores. Caracteriza-se, pois, pela presença do KIR2DL2 e ausência do KIR2DL1 e KIR2DL3 (figura 12) (55).

Os genes *2DL4*, *3DP1*, *3DL2* e *3DL3* estão presentes em ambos os haplótipos e por isso são chamados de “framework” (estruturais) (49, 55).



Legenda: haplótipo A na primeira linha; haplótipo B na segunda e terceira linha .

Figura 12: representação ilustrativa dos haplótipos A e B (51)

1.3.2 KIR e Doenças

Devido à diversidade de haplótipos dos genes KIR, isso pode sugerir que o efeito desses receptores é variável em diferentes doenças, conferindo proteção contra determinada doença ou predisposição à outra (56).

Em 2002 foi publicado um estudo que evidenciou susceptibilidade aumentada para desenvolver artrite psoriática entre indivíduos com 2DS1 e/ou 2DS2, mas somente se houver ausência dos receptores inibitórios 2DL1 e 2DL2/3. O estudo sugere que a falta de ligantes inibitórios diminuiria a atividade da célula NK e até a ativação de célula T. Com isso, restaria uma maioria de receptores ativadores e não haveria a compensação dos receptores inibidores – deste modo, ocorreria, pois, a contribuição para a progressão da doença (57).

Outra publicação de interesse foi realizada por japoneses em 2004. A pesquisa comparou 96 japoneses com PV com 50 controles – os resultados foram bastante satisfatórios. A frequência de KIR2DS1 e KIR2DL5 evidenciou-se bem aumentada em comparação com o controle, através do método de PCR-SSP (PCR baseado na seqüência de *primers* específicos). O KIR2DS1 foi encontrado em 43 dos 96 casos (45 %) versus 14 dos 50 controles (28%). Quanto ao 2DL5, 46 dos 96 casos (48%) versus 15 dos 50 controles (30%), ($p < 0.05$ para ambos) (58).

Autores poloneses analisaram os genes KIR em 116 pacientes com PV e 123 controles e também encontraram uma associação do KIR2DS1 e a doença ($p < 0,0009$) (59). Em contraste, um grupo chinês obteve resultados não-significativos quanto ao gene KIR2DS1, quando investigou a tipagem gênica de 178 pacientes com PV e 203 controles (60).

Recentemente há uma tendência de se avaliar as várias combinações HLA/KIR e de se reproduzir modelos de ativação e de inibição das células NK/NK-T. Dependendo do genótipo e da presença ou da ausência do ligante HLA-C, indivíduos poderiam ter quatro níveis de resposta celular, a saber, o excesso de ativação, o balanço, o excesso de inibição ou o indeterminado (61,62).

2. JUSTIFICATIVA

Embora existam relatos na literatura sobre polimorfismos nos genes KIR em PV em diversas etnias, as informações ainda são limitadas e não encontramos nenhuma publicação na literatura internacional indexada, quanto ao estudo destes genes na população caucasóide brasileira. Considerando-se a relevância do estudo destes polimorfismos para o entendimento da susceptibilidade à psoríase, optou-se por este tema nesta dissertação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo primário

Estudar a associação do gene KIR2DS1 com a ocorrência de PV em uma população caucasóide brasileira.

3.1.2 Objetivos secundários

- a) Estudar a presença de polimorfismo dos genes KIR em população controle e em grupo de pacientes com PV, ambos caucasóides.
- b) Avaliar a frequência dos genes HLA de classe I (locos C) em pacientes com PV e em grupo-controle caucasóide.

c) Padronizar uma técnica de PCR-SSP para a análise do polimorfismo dos genes KIR, permitindo a sua tipagem.

4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

1. Hamerman J A, Ogasawara K, Lanier L L. NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 29-35.
2. Vilches C, Parham P: KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 217-51.
3. Boyton RJ, Altmann DM. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptor and human antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 149: 1-8.
4. Biassoni R, Cantoni C, Marras D: Human natural killer cell receptors: insights into their molecular function and structure. *J Cell Med* 2003 7(4) :376-87.

5. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotype and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002; 190: 40-52.
6. Suzuki Y, Hamamoto Y, Ogasawara Y et al. Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1133-6.
7. Pellett F, Siannis F, Vukin I et al. KIRs and autoimmune disease: studies in systemic lupus erythematosus and scleroderma *Tissue Antigens* 2007; 69: 106-8.
8. Momot T, Koch S, Hunzelmann N et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1561-5.
9. Van der Slik AR, Alizadeh BZ, Koeleman BP, Roep BO, Giphart MJ. Modelling KIR-HLA genotype disparities in type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 2007; 69: 101-5.
10. Van der Slik AR, Koeleman BP, Verduijn W et al. KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. *Diabetes* 2003; 52: 2639-42.
11. Hollenbach J, Saeteurn K, Bose N. KIR gene in Crohn's disease. 2007; 68: 87.
12. Jones DC, Edgar RS, Ahmad T et al. Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combination in ulcerative colitis susceptibility. *Genes Immun* 2006; 7: 576-82.
13. Qi Y, Martin MP, Gao X et al. KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. *PLoS Pathog* 2006; 2: 79.
14. Rauch A, Laird R, McKinnon E et al. Influence of inhibitory killer immunoglobulin-like receptors and their HLA-C ligands on resolving hepatitis C virus infection. *Tissue Antigens* 2007; 69: 237-40.
15. Boyton RJ, Smith J, Ward R et al. HLA-C and killer cell immunoglobulin-like receptor genes in idiopathic bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 327-33.
16. Wang S, Zhao YR, Jiao YL et al. Increased activating killer immunoglobulin-like receptor genes and decreased specific HLA-C alleles in couples with recurrent spontaneous abortion. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 360: 696-701.

17. Kitawaki J, Xu B, Ishihara H et al. Association of Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor Genotypes with Susceptibility to Endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58: 481-6.
18. Passweg JR, Huard B, Tiercy JM, Roosnek E. HLA and KIR polymorphisms affect NK-cell anti-tumor activity. *Trends Immunol* 2007; 28: 437-41.
19. Griffiths MEC, Barker NWNJ. Pathogenesis and clinical features of Psoriasis. *Lancet* 2007; 370: 263-71.
20. Sabat R, Philipp S, Hoflich C et al. Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatology* 2007; 16: 779-798.
21. Nevitt GJ, Hutchinson PE. Psoriasis in the community: prevalence, severity and patients' beliefs and attitudes towards the disease. *Br J Dermatol* 1996; 135: 533-7.
22. Fitzpatrick's. Dermatology in general medicine vol 1. 6 ed. Mc Graw Hill. 2003.
23. Sampaio e Riviti. Dermatologia, 2 ed, Artes medicas
24. Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP. Electronic Image Collection for Dermatology. Elsevier 2003.
25. Andressen C, Henseler T. Inheritance of psoriasis. Analysis of 2053 family histories. *Hautarzt* 1982; 33: 214-17.
26. Farber EM, Nall NL, Watson W. Natural history of psoriasis in 61 twins pairs. *Arch Dermatol* 1974; 109: 207-11.
27. Schon MP, Boehncke WH. Psoriasis. *N Engl Med* 2005; 352: 1899-1912.
28. Christophers E. Psoriasis – epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26: 314-320.
29. Bowcock AM, Krueger JG. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 699-711.
30. Asumalahti K, Ameen M, Suomela S et al. Genetic analysis of PSORS1 distinguishes guttate psoriasis and palmoplantar pustulosis. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 627-32.
31. Telfer NR, Chalmers RJ, Whale K, Colman G. The role of Streptococcal infection in the initiation of guttate psoriasis. *Arch Dermatol* 1992; 128: 39-42.
32. Tsankov N, Angelova I, Kazandjieva J. Drug-induced psoriasis. Recognition and management. *Am J Clin Dermatol* 2000; 1: 159-165.
33. Psoriasis more than cosmetic. Disponível em: www.fda.gov/fdac/features/2004/504-psoriasis.HTML. Acesso em 15/01/2008.

34. Voorhees JJ. Pathophysiology of psoriasis. *Annu Rev Med* 1977; 28: 467-73.
35. Barker JN. Psoriasis as a T cell-mediated autoimmune disease. *Hosp Med* 1998; 59: 530-33.
36. Mueller W, Herrmann B. Cyclosporin A for psoriasis. *N Engl J Med* 1979; 301: 555.
37. Nicolas JF, Chamchick N, Thivolet J et al. CD4 antibody in treatment of generalized pustular psoriasis. *Lancet* 1991; 338: 320-321.
38. Eedy DJ, Burrows D, Bridges JM et al. Clearance of severe psoriasis after allogenic bone marrow transplantation. *BMJ* 1990; 300: 908.
39. Austin LM, Ozawa M, Kikuchi T et al. The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 752-9.
40. Vissers WH, Arndtz CH, Muys L. Memory effector (CD45RO+) and cytotoxic (CD8+) T cells appear early in the margin zone of spreading psoriatic lesions in contrast to cells expressing natural killer receptors, which appear late. *Br J Dermatol* 2004; 150: 852-9.
41. Davison SC, Ballsdon A, Allen MH et al. Early migration of cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) positive cells involving psoriatic plaques. *Exp Dermatol* 2001; 10: 280-85.
42. Cumberbatch M, Singh M, Dearman RJ. Impaired Langerhans cell migration in psoriasis. *J Exp Med*. 2006; 17: 203: 953-60.
43. Nickoloff B, Nestle F: Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J of Clin Invest* 2004; 113: 1664-75.
44. The Berkeleylab view, computer identify T cell turn-ons. Disponível em www.lbl.gov/publications/currents/archive/oct-03-2003.HTML. Acesso em 15/01/2008.
45. Ong PY, Ohtake T, Brandt C. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2002; 347: 1151-60.
46. Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT et al. Clinical Immunology – principles and practice. Vol 1. 2 ed. Toronto: Mosby 2001.

47. O'Connor GM, Hart MO, Gardiner. Putting the natural killer in its place. *Immunol* 2006; 117: 1-10.
48. Vilches C, Parham P: KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 217-51.
49. Biassoni R, Cantoni C, Marras D: Human natural killer cell receptors: insights into their molecular function and structure. *J Cell Med* 2003; 7: 376-87.
50. Parham P. Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. *Immunology Letters* 2004; 92: 11-13.
51. Williams AP, Bateman AR, Khakoo SI. Hanging in balance. KIR and their role in disease. *Mol Interv* 2005; 5: 226-46.
52. Immunology Central Online Cells of the Immune Response System FAQs. Disponível em: www.immunologycentral.com. Acesso em 12/10/2005.
53. Hsu K, Chida S: The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotype and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 190:40-52, 2002.
54. Carrington M, Norman P. The KIR Gene Cluster. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mono_003. Acesso em 14/01/2008.
55. Uhrberg M, Parham P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics* 2002; 54: 221-229.
56. Boyton RJ, Altmann DM. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptor and human antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 149: 1-8.
57. Martin MP, Nelson G, Lee JH et al. Cutting edge: susceptibility to Psoriatic Arthritis: influence of activating killer Ig like receptor gene in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol* 2002; 169: 2818-22
58. Suzuki Y, Hamamoto Y, Ogasawara Y et al. Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1133-6.

59. Luszczyk W, Manczak M, Cisto M et al. Gene for the Activating Natural Killer Cell Receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to Psoriasis Vulgaris. *Hum Immunol* 2004; 65: 758-66.
60. Chang YT, Chou CT, Shiao YM et al. The killer cell immunoglobulin-like receptor genes do not confer susceptibility to psoriasis vulgaris independently in Chinese. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2335-8.
61. Nelson GW, Martin MP, Gladman D et al. 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.
62. Holm SJ, Sakuraba K, Mallbris L et al. Distinct HLA-C/KIR genotype profile associated with Guttate Psoriasis. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 721-30.
63. Gilhar A, Ullmann Y, Kerner H et al. Psoriasis is mediated by a cutaneous defect triggered by activated immunocytes: Induction of Psoriasis by cells with natural killer receptors. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 384-91.
64. Marcenaro E, Ferranti B, Moretta A. NK-DC interaction: On the usefulness of auto-aggression. *Autoimmunity Reviews* 2005; 4: 520-25.

5. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

KILLER CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS (KIR) GENE KIR2DS1 IS ASSOCIATED WITH PSORIASIS VULGARIS IN A CAUCASOID BRAZILIAN POPULATION

Mariana Jobim¹, Luiz Fernando J. Jobim¹, Patrícia H. Salim¹, Tania F. Cestari², Realdete Toresan¹, Beatriz C. Gil¹, Jeanine Schlottfeldt¹ & Gilberto Schwartzmann³

¹Departament of Immunology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil;

²Departament of Dermatology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil;

³Postgraduate Course in Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

Correspondence: Mariana Jobim MD, Departament of Immunology, Hospital de Clínicas, Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, Brazil. E-mail: mjobim@hcpa.ufrgs.br

KEY WORDS: HLA, Killer cell immunoglobulin-like receptor, Natural killer cell, PCR, Psoriasis Vulgaris

ABSTRACT:

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease, whose pathogenesis and genetic background remains unclear. Considering that previous studies have suggested an association of Psoriasis Vulgaris (PV) and killer immunoglobulin-like receptors (KIRs), we typed 15 KIR genes and HLA-Cw in 79 Brazilian Caucasoid patients with PV and 110 healthy controls, by PCR using sequence-specific oligonucleotides (PCR-SSO) and PCR with specific primers (PCR-SSP). We observed a significant increase in the frequency of the activating KIR2DS1 gene in the PV group (KIR2DS1, 46 of 79 cases (58.2%) versus 40 of 110 controls (36.4%) $p < 0.0062$). Furthermore, an association of KIR2DS1 with Cw 0602+ in 26.5% of PV patients was documented, while it was shown in only 5.4% of controls ($p < 0.001$). These results suggest that activating KIR2DS1 gene may confer susceptibility to PV in this population. In addition, an association of KIR2DS1 gene with the HLA-Cw 0602+ was observed.

INTRODUCTION

NK cell function is regulated by a variety of activating and inhibitory receptors, which are expressed on the cell surface. HLA class I molecules are recognized by natural killer (NK) cell immunoglobulin-like receptors (KIR) (1). These receptors are key components of the innate immune system and participate in the early response against infected or transformed cells, through the production of cytokines and direct toxic effects (2, 3).

Dimorphisms in the HLA-Cw α 1 domain, characterized by amino acid positions Ser77/Asn80 and Asn77/Lys80, define serologically distinct allotypes of HLA-Cw (Cw group 1 and group 2, respectively). Group 1, or C1, consists of HLA- Cw1, -Cw3, -Cw7,-Cw8; and Group 2, or C2, consists of HLA-Cw2, -Cw4, -Cw6. KIR2DS2, -2DL2 e -2DL3 recognize C1, while KIR2DS1 and -2DL1 recognize C2 (4).

Up to now, 17 KIR genes and pseudogenes were identified. Most studies on KIR genes have focused on populations from Europe, Asia and North America, while Central and South America, Oceania, and Africa remain poorly studied (5,6).

In a recent study, two Amerindian and one Caucasoid population from Argentine were evaluated. While the Amerindians showed similarities to Asian individuals, the Caucasoid population did not. In contrast, similar frequencies in the distribution of KIR genes were found in Mexicans Mestizos, Caucasian and Mediterranean individuals (5,6).

Because of KIR specificity for HLA class I allotypes, and their extensive polymorphisms, it is reasonable to imagine that KIR gene variation affects resistance and susceptibility to several diseases with an autoimmune basis, such as psoriasis, psoriatic arthritis, rheumatoid arthritis, diabetes and others (3,7).

Psoriasis Vulgar (PV) is a multifactorial skin disease whose pathogenesis is still obscure (8,9). The research for a genetic predisposition to this disease has been intense, especially on the MHC region on the chromosome 6p21.3. That is where the locus *PSORS1* resides, which confers susceptibility to psoriasis. An association of psoriasis and the human leukocyte antigen (HLA)-Cw*06 has also been reported (10,11,12).

The activating gene KIR2DS1 has been independently associated with PV and psoriatic arthritis (PA) in both Japanese, American and Polish populations (13,14,15) However, that same association was not been observed in the Chinese population (16).

In the present study, we examined the relationship between PV patients and healthy controls with 15 KIR genes. To the best of our knowledge, this is the first report of studies of KIR genes, especially KIR2DS1, in Brazilian Caucasoid individuals with psoriasis and related diseases versus healthy controls.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

Blood samples from 79 unrelated Caucasoid Brazilians with PV were collected after obtaining an informed consent and authorization of the ethical committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, and according to the Declaration of Helsinki. Patients with inflammatory arthritis associated with psoriasis were excluded from the study. Control samples from 110 unrelated healthy bone marrow donors were used.

DNA Extraction & PCR

Blood samples were collected into tubes containing EDTA. DNA was extracted using salting-out procedure (17). DNA samples were genotyped using PCR-SSP for 15 KIR genes (2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 3DS1, 2DS4, 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL2 e 3DL3, 2DP1). The PCR primers and conditions were based on previous reports (18). Internal control was included in each PCR reaction. The combination for 10 μ l volume reactions, was used 10 ng of genomic DNA, 500 nM specific primers, 2.5 U of Taq polymerase, 0.08 μ l of PCR buffer, 0.3 μ l MgCl and 10 μ l of distilled water was amplified by the Gene Amp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA).

Temperature cycling conditions for PCR reaction were as follows: denaturation for 3 min at 94°C, followed by 4 cycles of 15 s at 94°C, 15 s at 65°C, 15 s at 72°C; 21 cycles of 15 s at 94°C, 15 s at 60°C, 30 s at 72°C; 5 cycles of 15 s at 94°C, 1 min at 55°C, 2 min at 72°C and a final elongation step at 72°C for 7 min.

Resulting products were visualized under ultraviolet light after electrophoresis in 1% agarose gels containing ethidium bromide. Ambiguous analyses results were revised by PCR sequence-specific oligonucleotides using typing kits from Lifecodes (LABtypeSSO®). Genotyping for HLA-Cw alleles was also done using specific primers, described before (19).

Statistical analysis

Comparison of the KIR gene frequency with the control group was performed by Fisher's exact test. Odds ratio, confidence interval and significance values were calculated using SPSS 12.0. Bonferroni correction was used to adjust for the number of genes used.

RESULTS

Seventy-nine Brazilian Caucasoid patients diagnosed with PV and 110 healthy controls were typed and compared for 15 KIR genes. The frequency of the activating gene KIR2DS1 was increased in PV group compared to the control group (58.2% vs 36.4%, $p:0.003$; when corrected $p:0.0062$; table I). HLA-Cw*0602 also had a strong association with PV patients (36.7% vs 17.3%, OR: 2.77, $p: 0.004$).

Because of the interaction of KIR2DS1 with C2, the results were further analyzed by comparing the difference of the absence or the presence of both receptors. The same was done with Cw*0602. As expected we found an increase in KIR2DS1+/C2+ and KIR2DS1+/Cw*0602 + ($p:0.009$; $p:0.001$) (table 2).

Considering the model tested before, the NK/NKT state is predicted by the possible combination of activation and inhibition receptors with HLA-C. This predicts that depending on the genotype, an individual can have more NK cells that are: excess of activation (EA), balanced (B), excess of inhibition (EI) and undetermined (U) (8,20). Both groups had similar proportions of B and EA ($p: 0.099$; $p:0.572$). The proportion of individuals classified as having more EI cells was increased on controls (59.1% vs 43.0%, $p: 0.039$; table 3).

On the other hand, patients carrying Cw*0602 receptors had an increase of EI groups (78.9% vs 41.4%; $p:0.017$), when compared to controls. However once compared to Cw*0602 negatives, there was no significant differences between the two groups (table 4).

DISCUSSION

The aim of this study was to examine the relationship between PV patients and healthy controls with 15 KIR genes. Our results showed that in this specific population, the activator gene KIR2DS1 is increased in PV group (58.2% vs 36.4%; OR: 2.43; $p: 0.003$; corrected $p: 0.045$; table 1).

Polish authors also studied this gene in 116 PV patients with PV and 123 controls, and found an association with KIR2DS1 ($p < 0,0009$; Luczcek et al)(15) . Japanese authors have also reported on the same association for the genes KIR2DL5 and KIR2DS1 ($p < 0,05$; Suzuki et al) (13). Notably, the KIR2DL5 did not show variation in our series. In contrast, a Chinese group has recently investigated the association of KIR genes with PV in 178 patients and 203 controls, failing to confirm these results (16).

KIR2DS1 gene showed also an increased frequency in PA patients. The association with PA, however, was for both KIR2DS1 and KIR2DS2, but only if their homologous inhibitory receptors, KIR2DL1 and KIR2DL2/3 were absent (21).

The above mentioned observations suggest that susceptibility to psoriasis, PA and other autoimmune-related disorders could be determined, at least in part, by the imbalance between signaling of activating and inhibitory KIR receptors in the presence or the absence of a certain ligand HLA class I (8,20,22). A similar theory could also be proposed for patients with diabetes type 1 and rheumatoid arthritis (23,24).

Considering the interaction of HLA-C ligands and KIR genes, our study demonstrates an association between the presence of KIR2DS1 and C2, and with HLA*0602 in PV patients ($p: 0.009$; $p: 0.001$; table 2). A similar study in PA positive and negative

North American Caucasian individuals versus controls was performed (14). A significant increase in KIR2DS1 in PA positive, and not in PA negative cases and controls was observed. These results might suggest that KIR2DS1 susceptibility could be due to PA and not the psoriasis condition. We disagree with that assumption, as in our study patients with history of inflammatory arthritis were excluded from analysis.

A number of autoimmune disorders have been associated with KIR genes, especially the presence of activating KIR genes, lack of their inhibitors and interaction of KIR/HLA. In our study, an association of KIR2DS1 gene with the HLA-Cw 0602+ was observed. It appears that KIR2DS1 in fact contributes to the vulnerability to HLA-Cw*0602-related diseases. However, this risk is not the same in every population. Patients with guttate psoriasis, for instance, were associated to a different HLA-C/KIR genotype profile (20).

Recently, a Canadian study typed 304 patients with systemic lupus erythematosus and 90 with scleroderma for KIR genes and HLA-Cw, and compared with 416 Caucasian controls. In both diseases, KIR2DS1 in the absence of KIR2DS2 was increased. Furthermore, activating KIR2DS1 and/or 2DS2 was more prevalent in patients than controls. Similar results were shown in patients with scleroderma (25,26).

In patients with rheumatoid arthritis, KIR2DS2 gene was associated with the absence of opposing inhibitory receptors and the occurrence of vasculitis (24). KIR2DS4 was a risk factor for rheumatoid arthritis, regardless of corresponding HLA-Cw4 (27). Furthermore, KIR2DL2 and KIR2DS2 were more frequent among rheumatoid arthritis patients with extra-articular manifestations and vasculitis (28).

The presence of activated KIR2DS2/HLA-ligand and lack of inhibitory response was also a risk factor in type 1 diabetes, suggesting that autoimmunity in this disease was associated with a decrease in inhibitory KIR-HLA genotype combinations (29).

KIR genes and HLA class I may play a role in the susceptibility to other illnesses such as Crohn's disease, ulcerative colitis, human immunodeficiency virus (HIV),

hepatitis C, idiopathic bronchiectasis, recurrent spontaneous abortions, endometriosis and cancer (30,31,32,33,34,35,36,37,38).

Recently, a model of susceptibility and protection to PA, which could apply to other immune disorders, was developed. The assumption is that various HLA/KIR combinations could produce differences in NK/NK-T cell activation. Depending on the genotype and the presence or lack of HLA-C ligands, individuals could have different level of cell response: (A) excess of activation, (B) balance, (C) excess of inhibition, or (D) undetermined (8-20).

In summary, KIR genotypes may differ in their content, in the balance between genes encoding activating and inhibitory receptors, as well as by allelic polymorphism at the individual KIR genes (39). Several studies have found an association between autoimmune disorders and the activity of HLA/KIR. Our study suggesting that activating KIR2DS1 gene confers susceptibility to PV, and that an association of KIR2DS1 gene with the HLA-Cw 0602+ may exists, adds to list of original contributions to this subject.

CONFLITS OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Department of Immunology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

REFERENCES

1. Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2005; 17: 29-35.
2. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11: 237-44.

3. Williams AP, Bateman AR, Khakoo SI. Hanging in balance. KIR and their role in disease. *Mol Interv* 2005; 5: 226-46.
4. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotype and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002; 190: 40-52.
5. Flores AC, Marcos CY, Paladino N et al. KIR genes polymorphism in Argentinean Caucasoid and Amerindian population. *Tissue Antigen* 2007; 69: 568-76.
6. Contreras G, Aláez C, Murguá A, Garcia D, Flores H, Gorodezky C. Distribution of killer cell-immunoglobulin-like receptors in Mexican Mestizos. *Tissue Antigens* 2007; 69: 125-9.
7. 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.
8. Cameron AL, Kirby B, Frei W, Griffiths CE. Natural killer and natural killer-T cells in psoriasis. *Arch of Dermatol Res* 2002; 294: 363-69.
9. Gilhar A, Ullmann Y, Kerner H et al. Psoriasis is mediated by a cutaneous defect triggered by activated immunocytes: Induction of Psoriasis by cells with natural killer receptors. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 384-91.
10. Capon F, Munro M, Baker J, Trembath R. Searching for the Major Histocompatibility Complex Psoriasis Susceptibility Gene. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 745-51.
11. Gudjonsson JE, Karason A, Antonsdottir AA et al. HLA-Cw6-Positive and HLA-Cw6-Negative Patients with Psoriasis Vulgaris have Distinct Clinical Features. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 362-65.
12. Gudjonsson JE, Karason A, Antonsdottir AA et al. Psoriasis patients who are homozygous for the HLA-Cw*0602 allele have a 2.5-fold increased risk of developing psoriasis compared with Cw6 heterozygotes. *Br J Dermatol* 2003; 148: 233-35.
13. Suzuki Y, Hamamoto Y, Ogasawara Y et al. Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1133-6.

14. Williams F, Meenagh A, Sleator C et al. Activation killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 is associated to psoriatic arthritis. *Hum Immunol* 2005; 66: 836-41
15. Luszczyk W, Manczak M, Cisto M et al. Gene for the Activating Natural Killer Cell Receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to Psoriasis Vulgaris. *Hum Immunol* 2004; 65: 758-66.
16. Chang YT, Chou CT, Shiao YM et al. The killer cell immunoglobulin-like receptor genes do not confer susceptibility to psoriasis vulgaris independently in Chinese. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2335-8.
17. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 1215.
18. Gomez-Lozano N, Vilches C. Genotyping of human killer-immunoglobulin-like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence-specific primers an update. *Tissue Antigens* 2002; 59: 84-93.
19. Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primers mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995; 46: 355-67.
20. Holm SJ, Sakuraba K, Mallbris L, Wolk K, Stahle M, Sanches FO. Distinct HLA-C/KIR genotype profile associated with Guttate Psoriasis. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 721-30.
21. Martin MP, Nelson G, Lee JH et al. Cutting edge: susceptibility to Psoriatic Arthritis: influence of activating killer Ig like receptor gene in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol* 2002; 169: 2818-22
22. Ploski R, Luszczyk W, Kusnierczyk P, Nockowski P, Cisto M, Krajewski P et al. A role for KIR gene variants other than KIR2DS1 in conferring susceptibility to psoriasis. *Hum Immunol* 2006; 67: 521-26
23. Van der Slik AR, Koeleman BP, Verduijn W et al. KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. *Diabetes* 2003; 52: 2639-42.
24. Yen JH, Moore BE, Nakajima T et al. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 2001; 193: 1159-67.

25. Pellett F, Siannis F, Vukin I et al. KIRs and autoimmune disease: studies in systemic lupus erythematosus and scleroderma *Tissue Antigens* 2007; 69:106-8.
26. Momot T, Koch S, Hunzelmann N et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1561-5.
27. Yen JH, Lin CH, Tsai WC et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene's repertoire in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2006; 35: 124-7.
28. Majorczyk E, Pawlik A, Luszczek W et al. Associations of *killer cell immunoglobulin-like receptor* genes with complications of rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2007 (unpublished data).
29. Van der Slik AR, Alizadeh BZ, Koeleman BP, Roep BO, Giphart MJ. Modelling KIR-HLA genotype disparities in type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 2007; 69: 101-5.
30. Boyton RJ, Altmann DM. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptor and human antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 149: 1-8.
31. Hollenbach J, Saeteurn K, Bose N. KIR gene in Crohn's disease. 2007; 68: 87.
32. Jones DC, Edgar RS, Ahmad T et al. Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combination in ulcerative colitis susceptibility. *Genes Immun* 2006; 7: 576-82.
33. Qi Y, Martin MP, Gao X et al. KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. *PLoS Pathog* 2006; 2: 79.
34. Rauch A, Laird R, McKinnon E et al. Influence of inhibitory killer immunoglobulin-like receptors and their HLA-C ligands on resolving hepatitis C virus infection. *Tissue Antigens* 2007; 69: 237-40.
35. Boyton RJ, Smith J, Ward R et al. HLA-C and killer cell immunoglobulin-like receptor genes in idiopathic bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 327-33.
36. Wang S, Zhao YR, Jiao YL et al. Increased activating killer immunoglobulin-like receptor genes and decreased specific HLA-C alleles in couples with recurrent spontaneous abortion. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 360: 696-701.
37. Kitawaki J, Xu B, Ishihara H et al. Association of Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor Genotypes with Susceptibility to Endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58: 481-6.

38. Passweg JR, Huard B, Tiercy JM, Roosnek E. HLA and KIR polymorphisms affect NK-cell anti-tumor activity. *Trends Immunol* 2007; 28: 437-41.
39. Parham P. Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. *Immunology Letters* 2004; 92: 11-13.

TABLES

TABLE 1- Frequency of KIR genes and HLA-Cw*0602 in 79 PV cases and 110 controls.						
Genes/Alleles	Patients		Controls		OR (CI)	P ^{a, b}
2DL1	97.5%	(77/79)	97.3%	(107/110)	1.0(-5.5- 5.9)	0.99
2DL2	65.8%	(52/79)	66.4%	(73/110)	0.97(-14.2-15.4)	0.99
2DL3	86.1%	(68/79)	85.5%	(94/110)	1.05(-10.6 - 11.8)	0.99
2DL4	100.0%	(79/79)	100.0%	(110/110)	0(-1.1 - 1.1)	0.99
2DS2	57.0%	(45/79)	60.0%	(66/110)	0.88(-12.3 - 18.3)	0.76
2DS3	32.9%	(26/79)	33.6%	(37/110)	0.99(14.0 - 15.4)	0.99
2DS5	32.9%	(26/79)	29.1%	(32/110)	1.2(-10.7 - 18.3)	0.63
2DS1	58.2%	(46/79)	36.4%	(40/110)	2.43(6.6 - 37.0)	0.003
3DL1	100.0%	(79/79)	96.4%	(106/110)	0(-1.0 - 8.2)	0.14
3DL2	100.0%	(79/79)	98.2%	(108/110)	0(-1,8 - 5.6)	0.51
3DS1	44.3%	(35/79)	41.8%	(46/110)	0(-12.9 - 17.9)	0.76
3DL3	100.0%	(79/79)	97.3%	(107/110)	0(-1.4 - 6.8)	0.26
2DL5	57.0%	(45/79)	52.7%	(58/110)	1.18(-11.2 - 19.8)	0.65
2DP1	97.5%	(77/79)	96.4%	(106/110)	1.45(-5.9 - 7.7)	0.99
2DS4	98.7%	(78/79)	96.4%	(106/110)	2.94(-3.1 - 7.7)	0.40
HLA-Cw*0602	36.7%	(29/79)	17.3%	(19/110)	2.77(5.6 A 33.3)	0.004*

^a Determined by Fisher's Exact Test
^b $\alpha=0.05$ without correction; $\alpha=0.0033$ with Bonferroni's correction
* $\alpha=0.05$ without correction; $\alpha=0.00625$ with Bonferroni's correction

TABLE 2 - KIR2DS1 positive together with presence and absence of the corresponding C2 ligant and Cw0602					
	Control		Patients		P-value^{a,b}
KIR2DS1+/ C2 +	21.81%	(24/110)	39.24%	(31/79)	0.009
KIR2DS1+/ C2 -	15.45%	(17/110)	20.25%	(16/79)	0.44
KIR2DS1+/Cw0602+	5.4%	(6/110)	26.5%	(21/79)	0.001
C2 ligant: HLA-Cw 2, -Cw4, -Cw6.					
^a Determined by Fisher's Exact Test					
^b $\alpha=0.05$ without correction; $\alpha=0.017$ with Bonferroni's correction					

TABLE 4 - HLA-Cw*0602 associated to predicted activity of NK cell.									
	patients with Cw0602 positive				patients with Cw0602 negative				
	EA	B	EI	U	EA	B	EI	U	
Controls	5.3%	15.8%	78.9%	0.0%	0.0%	38.5%	54.9%	6.6%	
Patients	3.4%	44.8%	41.4%	10.3%	2.0%	48.0%	44.0%	6.0%	
$P^{a,b}$	0.999	0.060	0.017	0.267	0.355	0.289	0.224	0.999	
^a Determined by Fisher's Exact Test									
^b $\alpha=0.05$ without correction; $\alpha=0.0125$ with Bonferroni's correction									
EA: Excess of activation; B: Balanced; EI: Excess of inhibition; U: undetermined									

TABLE 3 - Predicted NK/NKT cell action threshold in patients and controls						
	Controls		Patients			P ^{a,b}
Excess of activation	0.9%	(1/110)	2.5%	(2/79)		0.572
Balance	34.5%	(38/110)	46.8%	(37/79)		0.099
Excess of inhibition	59.1%	(65/110)	43.0%	(34/79)		0.039
Undeterminado	5.5%	(6/110)	7.6%	(6/79)		0.561
^a Determined by Fisher's Exact Test						
^b $\alpha=0.05$ without correction; $\alpha=0.0125$ with Bonferroni's correction						
EA: Excess of activation; B: Balanced; EI: Excess of inhibition; U: undetermined						

8. VERSÃO DO ARTIGO EM PORTUGUÊS

ASSOCIAÇÃO DO GENE KIR2DS1 NA PSORÍASE VULGAR EM POPULAÇÃO CAUCASÓIDE BRASILEIRA

Mariana Jobim¹, Luiz Fernando J. Jobim¹, Patrícia H. Salim¹, Tania F. Cestari², Realdete Toresan¹, Beatriz C. Gil¹, Jeanine Schlottfeldt¹ & Gilberto Schwartzmann³

¹Serviço de Imunologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil; ²Departamento de Dermatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil; ³Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Correspondência: Mariana Jobim, Serviço de Imunologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, Brasil. E-mail: mjobim@hcpa.ufrgs.br

PALAVRAS-CHAVE: HLA; receptores tipo imunoglobulina da célula “Natural Killer”; células “Natural Killer”; reação em cadeia da polimerase (PCR); psoríase vulgar

RESUMO

A psoríase vulgar é uma doença crônica e inflamatória da pele, cuja patogênese e influência genética permanecem pouco esclarecidas. Estudos anteriores sugerem uma associação entre essa patologia e os receptores do tipo imunoglobulina das células “natural killer” (KIR). Na pesquisa atual, analisamos 15 genes KIR e os alelos do sistema HLA-Cw06 em 79 pacientes caucasóides brasileiros com PV e em 110 controles saudáveis, usando a técnica de PCR com oligonucleotídeos de seqüência específica (PCR-SSO) e também pela técnica de PCR com *primers* específicos (PCR-SSP). Observamos um aumento significativo do gene ativador KIR2DS1 no grupo de pacientes com PV (KIR2DS1, 46 de 79 casos ou 58,2%; contra 40 dos 110 controles ou 36,4% - $p < 0,0062$). Além disso, uma associação entre o gene

KIR2DS1 e o alelo Cw0602 foi documentada em 26,5% dos pacientes com PV, enquanto somente 5,4% dos controles apresentaram essa combinação ($p < 0,001$). Esses resultados sugerem que o gene ativador KIR2DS1 pode conferir susceptibilidade para PV nessa população.

INTRODUÇÃO

O funcionamento das células NK é regulado por uma variedade de receptores ativadores e inibidores expressos na membrana celular. As moléculas HLA de classe I são reconhecidas pelas células NK por intermédio de receptores do tipo imunoglobulina (KIR) (1). Esses receptores são componentes fundamentais da imunidade inata e participam na resposta imunológica precoce em resposta aos agentes infecciosos e células modificadas, atuando por intermédio da produção de citocinas e de efeitos tóxicos diretos (2, 3).

Dimorfismos no domínio $\alpha 1$ da molécula de HLA-Cw e caracterizados pelas posições de aminoácidos Ser77/Asn80 e Asn77/Lys80 definem alótipos sorologicamente distintos do HLA-Cw (Cw grupo 1 e grupo 2, respectivamente). O Grupo 1 ou C1 é formado pelos antígenos HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8; o Grupo 2 ou C2, pelos antígenos HLA-Cw2, -Cw4, -Cw6. O receptor KIR2DS2, -2DL2 e -2DL3 reconhecem C1, enquanto o KIR2DS1 e o -2DL1 reconhecem C2 (4).

Até o momento, foram identificados 17 genes e pseudogenes KIR. A maioria dos estudos publicados sobre estes genes analisou populações da Europa, da Ásia e da América do Norte, enquanto os povos da América Central e do Sul, assim como os da Oceania e da África, permanecem pouco estudados (5, 6).

Em um estudo recente, duas populações ameríndias e uma caucasóide da Argentina foram avaliadas. Se, por um lado, os ameríndios apresentaram similaridades com asiáticos, por outro lado, a população caucasóide mostrou-se distinta. Em contraste, a distribuição de frequências similares dos genes KIR acontece em populações de mexicanos mestiços, caucasóides e indivíduos mediterrâneos (5, 6).

Devido à especificidade KIR para alótipos do HLA de classe I, assim como pelo seu extenso polimorfismo, é razoável imaginar que a variação dos genes KIR afeta a resistência e a susceptibilidade a diversas doenças com fundamentos auto-imunes como a psoríase, a artrite psoriática, a artrite reumatóide, a diabetes, entre outras (3,7).

A psoríase vulgar (PV) é, pois, uma doença dermatológica multifatorial de patogênese ainda obscura (8, 9). A pesquisa da predisposição genética para essa doença tem sido intensa, especialmente na região do cromossomo 6p21.3 que faz parte do CPH (complexo principal de histocompatibilidade). Nesse local reside o loco PSORS1 — é ele que confere susceptibilidade à doença. A associação entre essa enfermidade e o antígeno HLA-Cw06 também tem sido relatada (10, 11, 12).

O gene ativador KIR2DS1 foi independentemente associado com a PV e a artrite psoriática (AP) em japoneses, americanos e poloneses (13, 14, 15). Entretanto, a mesma associação não foi observada em chineses (16).

No presente estudo, examinamos a relação entre 15 genes KIR em pacientes com PV e controles normais. Até esse momento de nosso conhecimento, trata-se do primeiro estudo da associação dos genes KIR, especialmente do KIR2DS1 na população caucasóide brasileira com a PV e controles normais.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo Populacional

Amostras de sangue de 79 brasileiros caucasóides hígidos com PV foram coletadas após a obtenção do consentimento informado e autorização do Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil, estando de acordo com a Declaração de Helsinki. Os pacientes com artrite inflamatória associada com PV foram excluídos do estudo. Amostras controles foram provenientes de 110 doadores hígidos de medula óssea.

Extração do DNA & PCR

Amostras de sangue foram colhidas em tubos contendo EDTA. O DNA foi extraído usando o procedimento de “salting-out” (17). As amostras de DNA foram genotipadas, empregando-se o método de PCR-SSP para 15 genes KIR (2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 3DS1, 2DS4, 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1, 3DL2 e 3DL3, 2DP1).

A seqüência dos *primers* para a reação de PCR foi baseada em publicações anteriores (18). Um controle interno foi incluído em cada reação de PCR. A combinação de reagentes para uma reação de 10 µl de volume final foi a seguinte: 10 ng de DNA genômico; 500 nM de *primers* específicos; 2,5 U de Taq polimerase; 0,08 µl de tampão PCR; 0,3 µl de MgCl e 10 µl de água destilada. A amplificação do DNA foi realizada no instrumento Gene Amp PCR 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA).

As condições de temperatura para a reação de PCR foram as seguintes: 3 min. de desnaturação à 94°C, seguidos de 4 ciclos de 15 s. à 94°C, 15 s. à 65°C e 15 s. à 72°C; 21 ciclos de 15 s. à 94°C, 15 s. à 60°C e 30 s. à 72°C; 5 ciclos de 15 s. à 94°C, 1 min à 55°C e 2 min à 72°C. Finalmente, um estágio de alongamento à 72°C por 7 min.

Os produtos de amplificação foram visualizados por intermédio de um transiluminador com luz ultravioleta, após eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio. A análise de ambigüidades foi revisada por reação com oligonucleotídeos de seqüência-específica (PCR-SSO), usando kits da empresa norte americana Lifecodes (LABtypeSSO®). A genotipagem dos alelos do sistema HLA-Cw foi também realizada, empregando-se a técnica de PCR-SSP com *primers* específicos (19).

Análise Estatística

A comparação entre a frequência dos genes KIR com o grupo controle foi realizada pelo teste exato de Fisher. A razão de chances, o intervalo de confiança e os valores de significância foram calculados, usando-se o SPSS 12.0. Ainda, a correção de Bonferroni foi empregada para ajustar os resultados ao número de genes avaliados.

RESULTADOS

Setenta e nove pacientes caucasóides brasileiros diagnosticados como portadores de PV e 110 controles normais foram tipados e comparados nos 15 genes KIR.

A frequência do gene ativador KIR2DS1 estava aumentada no grupo de PV comparado ao grupo controle (58,2% contra 36,4%, $p: 0,003$; quando corrigido, $p: 0,0062$; tabela 1). O HLA-Cw*0602 também apresentou associação significativa nos pacientes com PV em relação aos controles (36,7% contra 17,3%, OR: 2,77, $p: 0,004$).

Devido à interação do KIR2DS1 com C2, os resultados foram posteriormente analisados pela comparação da ausência ou da presença de ambos receptores; o mesmo foi feito com Cw*0602. Encontramos, de acordo com a expectativa, um aumento no KIR2DS1+/C2+ e KIR2DS1+/Cw*0602 + ($p: 0,009$ e $p: 0,001$) (tabela 2).

Considerando o modelo testado acima, a ativação da célula NK/NK-T pode ser previsível pela possível combinação da ativação ou da inibição de receptores com a molécula HLA-C. Essa previsão indica que, dependendo do genótipo, um indivíduo pode ter mais células NK que apresentam excesso de ativação (EA), balanço (B), excesso de inibição (EI) ou ação indeterminada (I) (8, 20). Ambos os grupos KIR2DS1+/C2 e KIR2DS1+/Cw*0602 + tiveram similares proporções de B e EA ($p: 0,099$; $p: 0,572$). A proporção de indivíduos classificados, que apresentavam mais células com EI, estava aumentada nos controles (59,1% vs 43,0%, $p: 0,039$; tabela 3).

Por outro lado, pacientes portadores de moléculas Cw*0602 obtiveram um aumento nos grupos EI (78,9% contra 41,4%; p: 0,017), quando comparados aos controles. Contudo, quando comparados com os Cw*0602 negativos, não foram observadas diferenças entre os dois grupos (tabela 4).

DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi comparar 15 genes KIR entre pacientes com PV e controles normais. Nossos resultados demonstraram que, nessa população específica, o gene ativador KIR2DS1 estava aumentado no grupo de pacientes com a referida doença (58,2% vs 36,4%; OR: 2,43; p: 0,003; corrigido p: 0,045; tabela 1).

Autores poloneses também estudaram esse gene em 116 pacientes com PV e 123 controles e acharam uma associação com o KIR2DS1 ($p < 0,0009$; Luczcek et al) (15). A mesma associação também se deu em japoneses para os genes KIR2DL5 e KIR2DS1 ($p < 0,05$; Suzuki et al) (13). Notavelmente, não encontramos variação no KIR2DL5 em nosso estudo. Em contraste, um grupo chinês recentemente estudou os genes KIR com PV em 178 pacientes e 203 controles, não confirmando os resultados anteriores (16).

O gene KIR2DS1 também se apresentou mais freqüente em pacientes com AP. No entanto, a associação com AP foi para ambos os genes KIR2DS1 e KIR2DS2, mas somente quando os seus inibidores homólogos KIR2DL1 e KIR2DL2/3 fossem ausentes (21).

As observações mencionadas acima sugerem que a susceptibilidade à PV, AP e a outras doenças auto-imunes relacionadas poderiam ser determinadas, no mínimo em parte, por uma disparidade entre a sinalização de ativação e de inibição dos receptores KIR na presença ou na ausência de determinados ligantes HLA de classe I (8, 20, 22). Uma teoria similar poderia ser proposta para pacientes com diabetes tipo I e artrite reumatóide (23, 24).

Considerando a interação dos ligantes HLA-C e os genes KIR, nosso estudo demonstrou uma associação entre a presença do KIR2DS1 e C2, assim como com o HLA*0602 em pacientes com PV (p: 0,009; p: 0,001; tabela 2). Um estudo similar em AP foi realizado em indivíduos caucasóides norte-americanos (14). A respeito disso, foi observado um aumento significativo no KIR2DS1 nos pacientes em relação aos controles. Esse estudo sugeriu que o KIR2DS1 determina susceptibilidade à AP e não à condição de psoríase propriamente dita. Particularmente, não concordamos com essa suposição, pois, em nosso estudo, excluímos os pacientes com artrite inflamatória.

É necessário ressaltar também que diversas doenças auto-imunes têm sido associadas com os genes KIR, especialmente na presença de certos genes KIR ativadores, na falta de inibidores e na interação de KIR/HLA. Em nosso estudo, uma associação do KIR2DS1 com o HLA-Cw 0602+ foi observada. Isso sugere que o gene KIR2DS1 contribui positivamente para a vulnerabilidade às doenças relacionadas ao HLA-Cw*0602.

Entretanto, o risco não é o mesmo em todas as populações; pacientes com psoriasis gutata apresentam associação com um distinto perfil de genótipo HLA-C/KIR (20).

Recentemente, um estudo canadense analisou 304 pacientes caucasóides com lúpus eritematoso sistêmico e 90 com esclerodermia, comparando os genes KIR e HLA-Cw com 416 controles normais. Em ambas as doenças, o KIR2DS1 na ausência do KIR2DS2 estava com a frequência aumentada. Além disso, o gene KIR2DS1 e/ou 2DS2 foi mais prevalente em pacientes do que controles. Resultados similares também foram encontrados na esclerodermia (25, 26).

Em pacientes com artrite reumatóide, o gene KIR2DS2 foi associado com a ocorrência de vasculite na ausência de receptores inibitórios opositoristas (24). Neste sentido, o KIR2DS4 foi um fator de risco para a artrite reumatóide, mesmo na ausência do correspondente HLA-Cw4 (27). Ainda, os genes KIR2DL2 e KIR2DS2 foram mais frequentes em pacientes com artrite reumatóide com manifestações extra-articulares e vasculite (28).

A presença de ligante ativador KIR2DS2/HLA e a falta de resposta inibitória foi também um fator de risco para diabetes do tipo 1, sugerindo que a auto-imunidade nessa doença esteja associada com a diminuição de combinações de genótipos KIR-HLA inibitórios (29).

Existe a possibilidade de que os genes KIR e HLA de classe I participem na susceptibilidade a outras doenças, como a doença de Crohn, a colite ulcerativa, a imunodeficiência humana adquirida (AIDS), a hepatite C, a bronquiectasia idiopática, os abortos espontâneos de repetição, a endometriose e o câncer (30,31,32,33,34,35,36,37,38).

Recentemente, foi desenvolvido um modelo de susceptibilidade e de proteção para a AP, podendo também ser aplicado para outras doenças imunológicas. Este novo modelo significa que várias combinações HLA/KIR poderiam produzir diferenças na ativação de células NK/NK-T. Dependendo do genótipo e da presença ou da ausência do ligante HLA-C, indivíduos poderiam ter níveis diversos de resposta celular, conforme mencionamos anteriormente: (EA) excesso de ativação, (B) balanço, (EI) excesso de inibição ou (I) indeterminado (8-20).

Em resumo, os genótipos KIR podem diferir no seu conteúdo e no balanço entre os receptores ativadores e inibidores, assim como pelo polimorfismo individual de seus genes (39). Diversas publicações reconheceram uma associação entre doenças auto-imunes e a atividade do HLA/KIR. O nosso estudo, ao sugerir que o gene ativador KIR2DS1 confere susceptibilidade à PV e que pode haver associação do KIR2DS1 com o HLA-Cw-0602+, acrescenta esse achado à lista de contribuições originais a esse tema.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores afirmam não existir esse tipo de conflito.

AGRADECIMENTOS

Esse estudo foi possível de acontecer com o auxílio do Serviço de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

REFERÊNCIAS

1. Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2005; 17: 29-35.
2. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11: 237-44.
3. Williams AP, Bateman AR, Khakoo SI. Hanging in balance. KIR and their role in disease. *Mol Interv* 2005; 5: 226-46.
4. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotype and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002; 190: 40-52.
5. Flores AC, Marcos CY, Paladino N et al. KIR genes polymorphism in Argentinean Caucoid and Amerindian population. *Tissue Antigen* 2007; 69: 568-76.
6. Contreras G, Aláez C, Murguía A, Garcia D, Flores H, Gorodezky C. Distribution of killer cell-immunoglobulin-like receptors in Mexican Mestizos. *Tissue Antigens* 2007; 69: 125-9.
7. 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.
8. Cameron AL, Kirby B, Frei W, Griffiths CE. Natural killer and natural killer-T cells in psoriasis. *Arch of Dermatol Res* 2002; 294: 363-69.
9. Gilhar A, Ullmann Y, Kerner H et al. Psoriasis is mediated by a cutaneous defect triggered by activated immunocytes: Induction of Psoriasis by cells with natural killer receptors. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 384-91.

10. Capon F, Munro M, Baker J, Trembath R. Searching for the Major Histocompatibility Complex Psoriasis Susceptibility Gene. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 745-51.
11. Gudjonsson JE, Karason A, Antonsdottir AA et al. HLA-Cw6-Positive and HLA-Cw6-Negative Patients with Psoriasis Vulgaris have Distinct Clinical Features. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 362-65.
12. Gudjonsson JE, Karason A, Antonsdottir AA et al. Psoriasis patients who are homozygous for the HLA-Cw*0602 allele have a 2.5-fold increased risk of developing psoriasis compared with Cw6 heterozygotes. *Br J Dermatol* 2003; 148: 233-35.
13. Suzuki Y, Hamamoto Y, Ogasawara Y et al. Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1133-6.
14. Williams F, Meenagh A, Sleator C et al. Activation killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 is associated to psoriatic arthritis. *Hum Immunol* 2005; 66: 836-41
15. Luszczyk W, Manczak M, Cisto M et al. Gene for the Activating Natural Killer Cell Receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to Psoriasis Vulgaris. *Hum Immunol* 2004; 65: 758-66.
16. Chang YT, Chou CT, Shiao YM et al. The killer cell immunoglobulin-like receptor genes do not confer susceptibility to psoriasis vulgaris independently in Chinese. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2335-8.
17. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 1215.
18. Gomez-Lozano N, Vilches C. Genotyping of human killer-immunoglobulin-like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence-specific primers an update. *Tissue Antigens* 2002; 59: 84-93.
19. Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primers mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995; 46: 355-67.
20. Holm SJ, Sakuraba K, Mallbris L, Wolk K, Stahle M, Sanches FO. Distinct HLA-C/KIR genotype profile associated with Guttate Psoriasis. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 721-30.

21. Martin MP, Nelson G, Lee JH et al. Cutting edge: susceptibility to Psoriatic Arthritis: influence of activating killer Ig like receptor gene in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol* 2002; 169: 2818-22
22. Ploski R, Luszczek W, Kusnierczyk P, Nockowski P, Cisto M, Krajewski P et al. A role for KIR gene variants other than KIR2DS1 in conferring susceptibility to psoriasis. *Hum Immunol* 2006; 67: 521-26
23. Van der Slik AR, Koeleman BP, Verduijn W et al. KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. *Diabetes* 2003; 52: 2639-42.
24. Yen JH, Moore BE, Nakajima T et al. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 2001; 193: 1159-67.
25. Pellett F, Siannis F, Vukin I et al. KIRs and autoimmune disease: studies in systemic lupus erythematosus and scleroderma *Tissue Antigens* 2007; 69:106-8.
26. Momot T, Koch S, Hunzelmann N et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1561-5.
27. Yen JH, Lin CH, Tsai WC et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene's repertoire in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2006; 35: 124-7.
28. Majorczyk E, Pawlik A, Luszczek W et al. Associations of *killer cell immunoglobulin-like receptor* genes with complications of rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2007 (unpublished data).
29. Van der Slik AR, Alizadeh BZ, Koeleman BP, Roep BO, Giphart MJ. Modelling KIR-HLA genotype disparities in type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 2007; 69: 101-5.
30. Boyton RJ, Altmann DM. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptor and human antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 149: 1-8.
31. Hollenbach J, Saeteurn K, Bose N. KIR gene in Crohn's disease. 2007; 68: 87.
32. Jones DC, Edgar RS, Ahmad T et al. Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combination in ulcerative colitis susceptibility. *Genes Immun* 2006; 7: 576-82.
33. Qi Y, Martin MP, Gao X et al. KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. *PLoS Pathog* 2006; 2: 79.

34. Rauch A, Laird R, McKinnon E et al. Influence of inhibitory killer immunoglobulin-like receptors and their HLA-C ligands on resolving hepatitis C virus infection. *Tissue Antigens* 2007; 69: 237-40.
35. Boyton RJ, Smith J, Ward R et al. HLA-C and killer cell immunoglobulin-like receptor genes in idiopathic bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 327-33.
36. Wang S, Zhao YR, Jiao YL et al. Increased activating killer immunoglobulin-like receptor genes and decreased specific HLA-C alleles in couples with recurrent spontaneous abortion. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 360: 696-701.
37. Kitawaki J, Xu B, Ishihara H et al. Association of Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor Genotypes with Susceptibility to Endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58: 481-6.
38. Passweg JR, Huard B, Tiercy JM, Roosnek E. HLA and KIR polymorphisms affect NK-cell anti-tumor activity. *Trends Immunol* 2007; 28: 437-41.
39. Parham P. Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. *Immunology Letters* 2004; 92: 11-13.

TABELAS

TABELA 1 – Frequência dos genes KIR e HLA-Cw*0602 em 79 casos de PV e 110 controles.						
Genes/Alelos	Pacientes		Controles		OR (CI)	P ^{a, b}
2DL1	97.5%	(77/79)	97.3%	(107/110)	1.0(-5.5- 5.9)	0.99
2DL2	65.8%	(52/79)	66.4%	(73/110)	0.97(-14.2-15.4)	0.99
2DL3	86.1%	(68/79)	85.5%	(94/110)	1.05(-10.6 - 11.8)	0.99
2DL4	100.0%	(79/79)	100.0%	(110/110)	0(-1.1 - 1.1)	0.99
2DS2	57.0%	(45/79)	60.0%	(66/110)	0.88(-12.3 - 18.3)	0.76
2DS3	32.9%	(26/79)	33.6%	(37/110)	0.99(14.0 - 15.4)	0.99
2DS5	32.9%	(26/79)	29.1%	(32/110)	1.2(-10.7 - 18.3)	0.63
2DS1	58.2%	(46/79)	36.4%	(40/110)	2.43(6.6 - 37.0)	0.003
3DL1	100.0%	(79/79)	96.4%	(106/110)	0(-1.0 - 8.2)	0.14
3DL2	100.0%	(79/79)	98.2%	(108/110)	0(-1,8 - 5.6)	0.51
3DS1	44.3%	(35/79)	41.8%	(46/110)	0(-12.9 - 17.9)	0.76
3DL3	100.0%	(79/79)	97.3%	(107/110)	0(-1.4 - 6.8)	0.26
2DL5	57.0%	(45/79)	52.7%	(58/110)	1.18(-11.2 - 19.8)	0.65
2DP1	97.5%	(77/79)	96.4%	(106/110)	1.45(-5.9 - 7.7)	0.99
2DS4	98.7%	(78/79)	96.4%	(106/110)	2.94(-3.1 - 7.7)	0.40
HLA-Cw*0602	36.7%(29/79)	17.3%	(19/110)	2.77(5.6 A 33.3)	0.004*
^a Determinado pelo teste exato de Fisher						
^b $\alpha=0.05$ sem correção; $\alpha=0.0033$ com correção de Bonferroni						
* $\alpha=0.05$ sem correção; $\alpha=0.00625$ com correção de Bonferroni						

TABELA 2 – Gene KIR2DS1 positivo associado à presença e à ausência do ligante C2 e Cw0602					
	Controles		Pacientes		P ^{a, b}
KIR2DS1+/ C2 +	21.81%	(24/110)	39.24%	(31/79)	0.009
KIR2DS1+/ C2 -	15.45%	(17/110)	20.25%	(16/79)	0.44
KIR2DS1+/Cw0602+	5.4%	(6/110)	26.5%	(21/79)	0.001
Ligante C2: HLA-Cw 2, -Cw4, -Cw6.					
^a Determinado pelo teste exato de Fisher					
^b $\alpha=0.05$ sem correção; $\alpha=0.017$ com correção de Bonferroni					

TABELA 3 – Suposto funcionamento das células NK/NKT em pacientes e controles					
	Controles		Pacientes		P ^{a,b}
Excesso de ativação	0.9%	(1/110)	2.5%	(2/79)	0.572
Balanço	34.5%	(38/110)	46.8%	(37/79)	0.099
Excesso de inibição	59.1%	(65/110)	43.0%	(34/79)	0.039
Indeterminado	5.5%	(6/110)	7.6%	(6/79)	0.561
^a Determinado pelo teste exato de Fisher					
^b $\alpha=0.05$ sem correção; $\alpha=0.0125$ com a correção de Bonferroni					
EA: Excesso de ativação; B: Balanço; EI: Excesso de inibição; I: Indeterminado					

TABELA 4 – Associação do HLA-Cw*0602 com suposta atividade da célula NK									
	Pacientes com Cw0602 positivo				Pacientes com Cw0602 negativo				
	EA	B	EI	I	EA	B	EI	I	
Controles	5.3%	15.8%	78.9%	0.0%	0.0%	38.5%	54.9%	6.6%	
Pacientes	3.4%	44.8%	41.4%	10.3%	2.0%	48.0%	44.0%	6.0%	
P ^{a,b}	0.999	0.060	0.017	0.267	0.355	0.289	0.224	0.999	
^a Determinado pelo teste exato de Fisher									
^b $\alpha=0.05$ sem correção; $\alpha=0.0125$ com correção de Bonferroni									
EA: Excesso de ativação; B: Balanço; EI: Excesso de inibição; I: Indeterminado									

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A psoríase é uma doença de extrema complexidade quanto à sua fisiopatologia. Diversas teorias foram sugeridas, envolvendo uma disfunção do queratinócitos, advinda de um ciclo vicioso de ativação das células Th1, com a apresentação de antígenos pelas CD, e produção de quantidades elevadas de citocinas. Estas últimas poderiam ser as responsáveis pela migração celular para a placa psoriática. O mais provável é que a psoríase seja uma doença de tipo auto-imune. Entretanto, o auto-antígeno responsável não foi ainda descoberto, podendo ser a própria queratina (20,35,39,63).

A atividade da célula NK na doença, além de fazer parte da regulação da imunidade inata, tem papel de importância pela interação com as CD, cuja ativação entre elas é mútua. O resultado final desta interação é a ativação da citotoxicidade com liberação de perforinas, produção de INF γ e proliferação das células NK. Quanto às CDs, o principal efeito é a ativação da célula T através das citocinas, peça chave da fisiopatogenia da doença. É bom ressaltar que a própria CD pode interagir com o linfócito e ativá-lo; contudo, vale citar que a célula NK é mais um fator a ser somado à trama da doença (42,43,64).

Quanto à existência de diferentes genótipos KIR/HLA, pode-se dizer que resultaria em mais um argumento que contribuiria para a auto-imunidade. Diversos modelos foram propostos: um deles seria que receptores ativadores eram vantajosos para algumas doenças infecciosas e isso poderia levar à auto-imunidade (13,14).

Outra teoria seria a de uma inapropriada ativação da célula NK, resultando na desregulação da atividade das células T, e, por outro lado, em uma perda de inibição, acarretando menos ataque às células CD ou às células T ativadas. Muitas doenças auto-imunes já evidenciaram receptores KIR ativadores em excesso ou genótipos KIR/HLA com falta de inibidores, entre elas a esclerodermia, a diabetes tipo 1, a artrite psoriática e a própria PV (3). Além deste modelo, alguns autores sugerem que a tendência à auto-imunidade ocorra devido à pobre sinalização dos receptores ativadores (7,8,9,10,51).

É importante frisar que células NK deixaram de ser conceituadas como meras células de defesa, tornando-se um elemento-chave para a regulação da imunidade inata e, portanto, podendo agir como ativadoras da resposta adaptativa. Com efeito, na presença de aberrações na atividade de células NK, podem ocorrer condições favoráveis ao surgimento de desordens de tipo auto-imune.

ANEXO

Anexo I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO: Análise da frequência dos genes KIR e HLA classe I e II em pacientes com psoríase e grupo controle.

Nome:

Número do prontuário:

Fone:

Data:

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA E OBJETIVO:

A Psoríase Vulgar é uma doença inflamatória da pele, benigna, não contagiosa e crônica. A doença apresenta remissões e recidivas, relacionadas a diversos fatores, entre eles, traumas (físico, químico, queimadura solar), infecções bacterianas e virais, estresse emocional.

A Psoríase Vulgar está relacionada à transmissão genética em cerca de 30% dos casos. Afeta 1 a 2% da população mundial.

Devido a forte transmissão genética, o objetivo deste estudo será fazer uma análise da frequência dos genes KIR e HLA em pacientes brancos com Psoríase Vulgar e indivíduos sadios, ou seja, o que difere geneticamente uma pessoa com ou sem a doença.

O estudo pretende, com esta comparação, saber mais sobre o funcionamento genético da doença, sendo de grande validade, pois ainda não existem pesquisas claras sobre o assunto.

Tanto pacientes com Psoríase Vulgar, em acompanhamento no Serviço de Dermatologia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, assim como indivíduos saudáveis, serão convidados a participar do estudo.

Método:

A coleta do exame é realizada por punção venosa, como num simples exame de sangue realizado de rotina. Após a coleta, a amostra de sangue é levada para o Laboratório de Imunologia no próprio hospital, onde por técnicas laboratoriais, se chega ao resultado desejado (a tipagem dos genes de cada indivíduo).

Tempo de permanência:

Este estudo não necessita de tempo de permanência. Basta coletar o sangue. Todas as informações sobre a pesquisa estão disponíveis.

Os participantes podem aceitar, assim como se recusar a participar do estudo. Também podem descontinuar a pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo ou penalidade do seu atendimento na instituição.

Os participantes não recebem qualquer valor em dinheiro, mas terão a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade.

Confidencialidade:

O nome do participante não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois será identificado com um número.

RISCOS E DESCONFORTOS:

O estudo não apresenta riscos. O único desconforto é a punção venosa, como num exame de rotina.

BENEFÍCIOS:

O benefício do estudo seria ter mais conhecimento genético sobre a Psoríase Vulgar e as diferenças que existem entre o paciente e pessoas sem a doença.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ pelo presente termo de compromisso compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. O termo que li, esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu atendimento e tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo.

Eu CONCORDO em fazer parte do estudo voluntariamente. Data:

Nome Legível

Assinatura

Em caso de dúvida, for favor ligar para Dra Mariana Jobim, pesquisadora responsável.

Fones: 33889147 e 91222613

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Rua Ramiro Barcelos 2350- Serviço de Imunologia

Anexo II – Protocolo de coletas de dados**ASSOCIAÇÃO DO GENE KIR2DS1 NA PSORÍASE VULGAR EM POPULAÇÃO
CAUCASÓIDE BRASILEIRA**

() Psoríase Vulgar ou () Grupo Controle

Nome do
paciente: _____

Número do paciente: _____

Número do prontuário: _____

Raça: _____

Data de nascimento: ____ / ____ / ____

Tipagem KIR: _____

Tipagem HLA-Cw: _____

Anexo III – Termo de consentimento – REDOMEREGISTRO BRASILEIRO DE DOADORES VOLUNTARIOS
DE MEDULA OSSEA – REDOME*TERMO DE CONSENTIMENTO*

Eu, _____,
abaixo assinado(a) e acima qualificado(a), pelo presente instrumento CONSINTO que os meus dados cadastrais, o resultado de minha tipificação HLA e os outros resultados dos exames de histocompatibilidade / Imunogenética sejam incluídos no REGISTRO BRASILEIRO DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA OSSEA - REDOME, coordenado pelo Laboratório de Imunogenética do Instituto Nacional de Câncer — INCA, do Ministério da Saúde. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis testes genéticos futuros, desde que de maneira sigilosa.

Nesta data recebi as orientações sobre o que é o transplante de medula óssea e o transplante de células precursoras e estou ciente de que:

O candidato a doador de medula óssea e/ou tecidos hematopoéticos deve encontrar-se em bom estado de saúde.

Na oportunidade de ser selecionado, o doador deverá passar por exames clínicos e laboratoriais que atestem a inexistência de doença, especialmente as infectocontagiosas.

Na oportunidade de ser selecionado para doação de medula óssea, o doador passará por internação hospitalar (hospital/dia) sendo necessário submeter-se a procedimento sob anestesia geral para retirada de não mais que 10% de sua medula óssea. O procedimento consiste em punção glútea (4 a 8 punções). A medula óssea do doador é espontaneamente restaurada em poucas semanas.

Na oportunidade de ser selecionado para doação de precursores hematopoéticos, após utilizar por via subcutânea uma medicação estimulante de células hematopoiéticas, o doador será submetido a procedimento semelhante a doação de sangue sendo este realizado em caráter ambulatorial, não sendo para isso necessários os procedimentos mencionados no segundo item deste termo.

Os riscos para doadores de medula óssea e/ou tecidos hematopoéticos é praticamente inexistente. Nos casos de doação de medula óssea, devido ao procedimento de punção, é comum haver queixa de discreta dor no local da punção.

Tenho, também ciência do propósito a que se destina o referido Registro e meu cadastramento nele.

Proponho-me, assim, a ser um eventual doador de medula óssea ou de células precursoras, sabendo que me é reservado o direito de decisão final para doação, mantendo-se a condição de sigilo acima especificada.

Porto Alegre, ____ / ____ / ____

Nome Legível

Assinatura

Testemunhas:

Nome legível: _____ Assinatura: _____

Nome legível: _____ Assinatura: _____