

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

**ASSOCIAÇÃO DOS GENES KIR E HLA CLASSE I NA DOENÇA DE CROHN, RETOCOLITE
ULCERATIVA E GRUPO CONTROLE EM POPULAÇÃO CAUCASÓIDE BRASILEIRA**

Timothy John Wilson

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Dissertação de Mestrado

2010

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

A minha esposa, Mariana, meus filhos, Gabriel e Thomas pelo incentivo e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Rafael Roesler, pela acolhida como orientador e estímulo na realização desta pesquisa.

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

Ao Professor Mario A. Rosito e Dr Cristina Flores, pela oportunidade de trabalhar com seus pacientes.

Aos colegas de laboratório, Pamela Portela e Patrícia Salim, por todo auxílio teórico e prático.

Aos pacientes que participaram deste estudo, minha sincera gratidão.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS E SIGLAS.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUÇÃO.....	9
JUSTIFICATIVA.....	11
REVISÃO DA LITERATURA.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
ARTIGO ORIGINAL.....	30
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
APÊNDICE	
I - Termo de consentimento.....	43
II - Protocolo de dados.....	46
III - Termo de consentimento REDOME.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DC - Doença de Crohn

DII – Doença Inflamatória Intestinal

RCUI – Retocolite Ulcerativa

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid - Etileno diamino tetra-acético

HIV – Human Immunodeficiency Virus - Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA – Human Leukocyte Antigen - Antígenos de Histocompatibilidade Humana

IL – Interleukin - Interleucina

INF α – Interferon alfa

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

MgCl - Cloreto de Magnésio

MICA- Major-histocompatibility-complex class I chain-related gene A – Gene A relacionado à cadeia do complexo principal de histocompatibilidade classe I

NK - Natural Killer Cells - Células Matadoras Naturais

PCR – Polimerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase

PCR-SSP - PCR baseado em seqüência de primers específicos

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

RESUMO

A doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCUI) são enfermidades inflamatórias crônicas do intestino e têm origem desconhecida. Exposição a fatores ambientais específicos em indivíduos geneticamente suscetíveis, levando a uma resposta inadequada do sistema imunitário, é uma das possíveis explicações para a ocorrência dessas doenças. As células natural killer fazem parte do sistema imune inato e reconhecem as moléculas HLA (antígeno leucocitário humano) de classe I em células-alvo através de seus receptores de membrana. Os receptores principais das células natural killer são conhecidos como receptores “killer” do tipo imunoglobulina (KIR). Nosso estudo teve como objetivo avaliar a associação entre os genes KIR em pacientes com doença inflamatória intestinal e controles saudáveis. Na pesquisa atual, analisamos 15 genes KIR e os alelos do sistema HLA classe I em 248 pacientes caucasóides brasileiros, nos quais 111 tinham RCUI e 137 tinham DC e em 250 controles saudáveis, usando a técnica de PCR com *primers* específicos (PCR-SSP). Observamos um aumento significativo do gene inibidor KIR2DL2 no grupo controle (doença inflamatória intestinal [DII]: $p < 0.001$; RCUI: $p = 0.01$; DC: $p =$ não significativo [NS]). O genótipo 2DL2+/HLA-C lys(80)+ também foi mais freqüente nos controles (DII: $p = 0.005$; UC: $p = 0.01$; CD: $p =$ NS); além do 2DL1+/HLA-C Asn(80)+ (DII: $p = 0.026$; UC: $p =$ NS; CD: $p =$ NS). A disparidade entre os KIR ativadores e inibidores pode explicar, ao menos em parte, a patogênese destas doenças inflamatórias intestinais.

ABSTRACT

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are chronic inflammatory diseases of the bowel, of unknown origin. Exposure to specific environmental factors by genetically susceptible individuals, leading to an inadequate response of the immune system, is one of the potential explanations for the occurrence of these diseases. Natural killer cells are part of the innate immune system recognizing class I HLA (human leukocyte antigen) molecules on target cells through their membrane receptors. The main receptors of the natural killer cells are the killer immunoglobulin like receptors (KIRs). We typed 15 KIR genes and HLA class I ligands in 248 unrelated Brazilian Caucasians, of which 111 had UC and 137 had CD, and 250 healthy controls by polymerase chain reaction using sequence-specific oligonucleotides and sequence specific primers. We found an increase in KIR2DL2 in controls (inflammatory bowel disease [IBD]: $p < 0.001$; UC: $p = 0.01$; CD: $p =$ not significant [NS]). The genotype 2DL2+/HLA-C lys(80)+ was also more common in controls (IBD: $p = 0.005$; UC: $p = 0.01$; CD: $p =$ NS); as well as 2DL1+/HLA-C Asn(80)+ (IBD: $p = 0.026$; UC: $p =$ NS; CD: $p =$ NS). The imbalance between activating and inhibitory KIR and HLA ligands may explain, at least in part, the pathogenesis of these inflammatory bowel diseases.

INTRODUÇÃO

A doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RU) são enfermidades inflamatórias intestinais crônicas de causa ainda desconhecida. Dados epidemiológicos e evidência genética recente apontam para o conceito de que se trata de doenças causadas pela exposição de indivíduos geneticamente suscetíveis a fatores ambientais específicos (1).

A compreensão da fisiopatologia da DC e RCUI está passando por processo de revisão. O conceito de que sejam alterações primárias da célula T está em discussão, havendo um interesse renovado no papel da imunidade inata em dar início às primeiras alterações e em perpetuar o processo inflamatório [1]. Avanços recentes em genética, estudos funcionais em imunidade inata e ensaios terapêuticos em pacientes com doença de Crohn têm apoiado esta nova hipótese [2].

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 habilidade de destruir células alogênicas, células modificadas por vírus e células tumorais [3], podendo também, secretar citocinas, as quais modulam o sistema imune adaptativo [4]. Através dos seus receptores de superfície, as células NK podem ser ativadas ou não a destruir as suas células-alvo [5].

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”) [4,5].

A atividade citolítica da célula NK depende da presença e 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 ataque à célula alvo. Caso contrário, a mesma é destruída [4,6].

Os genes KIR, que codificam estes receptores, estão localizados no cromossomo 19q13.4, junto com todos os outros genes do complexo de receptores leucocitários [7]. A família KIR é altamente polimórfica e o seu funcionamento regula a função da célula NK e interfere na fisiopatologia de várias doenças, entre elas: a psoríase vulgar, a esclerose sistêmica, o lúpus, a artrite reumatóide, o diabetes tipo 1, a imunodeficiência humana adquirida (AIDS), a hepatite C, a bronquiectasia idiopática, os abortos espontâneos de repetição, a endometriose, algumas neoplasias, a DC e a RCUI [8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23].

O presente estudo tem como objetivo estudar a associação dos genes KIR com a DC e RCUI. Este estudo contou com apoio do FIPE (Fundo de Investimentos a Pesquisa e Eventos do HCPA). O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sob número de 08-219.

JUSTIFICATIVA

Desvendar os mecanismos imunogenéticos que regulam a imunidade inata e adaptativa da parede intestinal nos parece crucial em esclarecer a fisiopatologia da DII. A identificação de associação entre os polimorfismos dos genes KIR e a DC e RCUI, poderia auxiliar na melhor compreensão da fisiopatogênese e também identificar grupos de risco para estas doenças.

Embora existam algumas poucas referências na literatura a polimorfismos nos genes KIR em DC e RCUI em outras etnias, as informações ainda são limitadas e não encontramos nenhuma publicação sobre estudos com estes genes na população caucasóide brasileira.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Doença Inflamatória Intestinal

Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa (RCUI) são as duas formas principais de doença inflamatória intestinal (DII), que têm na cronicidade e atividade inflamatória progressiva suas características principais [2].

A RCUI afeta apenas o intestino grosso e é caracterizada por ocorrência de processo inflamatório da mucosa, com intensidade variável, que inicia no reto e progride de forma contínua no sentido proximal. Podem ocorrer ulcerações da mucosa causadas pela reação inflamatória intensa e mediadas por uma combinação complexa de agentes inflamatórios. Os achados histopatológicos incluem a presença de uma grande quantidade de neutrófilos na lâmina própria e nas criptas intestinais, onde formam micro-abscessos, podendo haver também depleção das células caliciformes [24].

A DC pode afetar qualquer porção do trato gastrointestinal, sendo mais comum o envolvimento do íleo terminal e cólon. De forma diversa da RCUI, quando o cólon é acometido, a colite pode ter padrão irregular e segmentar e o processo inflamatório pode envolver todas as camadas do intestino. A análise histopatológica da DC pode documentar o processo inflamatório transmural que é caracterizada por agregados de macrófagos que, com frequência, formam granulomas não-caseosos [24].

Pacientes com DII também podem ter manifestações extra-intestinais, tais como colangite esclerosante, espondilite anquilosante, uveíte, dentre outras [25].

O diagnóstico é feito baseado em dados clínicos, patológicos, endoscópicos e radiológicos [2]. O quadro inicial de DII ocorre principalmente na segunda ou terceira década de vida e, na maioria dos indivíduos, evolui para se tornar uma enfermidade crônica e recorrente [2].

Observa-se a ocorrência de DII em grupos familiares, sugerindo haver suscetibilidade genética [26]. A ausência de concordância integral entre gêmeos homozigóticos e o desenvolvimento de DII em imigrantes para países com alta prevalência, e em países que adotam hábitos ocidentais, apontam para a importância de fatores ambientais na patogênese destas doenças [27].

Estudos epidemiológicos têm identificado alguns fatores ambientais que aumentariam o de risco de DII. Estes incluem tabagismo, apendicectomia prévia, uso de antibióticos, contraceptivos orais e agentes antiinflamatórios não-esteróides. Estes fatores seriam importantes no desenvolvimento de DII através de sua habilidade de interferir na resposta imune do paciente, nas funções fisiológicas da barreira epitelial intestinal e, provavelmente, na composição e função da flora bacteriana comensal [28].

Deste modo, a DII seria o resultado de uma resposta imune irregular a antígenos derivados de microbiota comensal em indivíduos geneticamente suscetíveis. Por este motivo o papel da flora intestinal tem sido objeto de vários estudos nos últimos anos. Agentes microbianos que normalmente habitam o lúmen intestinal parecem ser os responsáveis por comandar o processo inflamatório intestinal. Quando comparados com controles, pacientes

com DC e RCUI têm redução da diversidade do grupo de bactérias associadas à mucosa da família *Firmicutes* and *Bacteroidetes*. Não se sabe se estas alterações contribuem para causar a doença ou se são apenas um reflexo secundário das alterações causadas por inflamação [29,30].

A barreira epitelial intestinal também tem sido objeto de atenção especial, pois se acredita que esta também tenha sua função alterada, permitindo acesso inapropriado de antígenos ao sistema imunológico. Na DII o espaço intercelular tem sua permeabilidade aumentada. Não se sabe se esta alteração é um defeito primário da barreira ou se possa ser uma consequência da inflamação [31].

As células caliciformes, presentes no epitélio intestinal, produzem muco contendo substâncias chamadas defensinas, que auxiliam no combate a microorganismos. Na DII os efeitos da resposta inflamatória podem causar dano à mucosa diminuindo a produção das defensinas, resultando numa maior exposição à microbiota intestinal e à resposta inflamatória [24].

A parede intestinal apresenta vários receptores de imunidade inata que permitem uma resposta inicial e rápida a microorganismos. Acredita-se que também tenham papel importante em condicionar células epiteliais e células apresentadoras de antígenos à tolerância a flora bacteriana comensal, o que mantém uma convivência harmônica no lúmen [32].

A exposição contínua à bactérias intestinais é importante para regular a resposta imune intestinal. Este efeito ocorre através da translocação bacteriana de micróbios através das células epiteliais, por imunoglobulinas e pelas células dendríticas [33]. Células

apresentadoras de antígenos então apresentam peptídeos antigênicos às células T em organelas linfáticas secundárias do intestino, tais como as placas de Peyer, linfonodos mesentéricos folículos linfáticos isolados [34]. Esta interação inicia a resposta imune adaptativa, após os quais os linfócitos desenvolvem memória. Uma característica da imunidade adaptativa é poder proporcionar uma resposta rápida e robusta a exposições futuras aos antígenos [35].

Acredita-se que os portadores de DII possam ter uma resposta irregular de sua imunidade inata, levando a liberação de citocinas pró-inflamatórias derivadas de linfócitos T CD4, muito maior que a habitual [32].

A identificação de genes que aumentam a suscetibilidade a DII tem sido objeto de pesquisas em vários países nos últimos anos. O primeiro loco analisado no cromossomo 6, levou à identificação do NOD2 (nucleotide oligomerization domain 2) (também chamado CARD 15 e IBD 1) como gene de risco aumentado para DC [36, 37]. O NOD 2 é um sensor bacteriano intracelular, que quando alterado aumenta o risco para DC em 27 vezes nos portadores homozigóticos e 2,4 vezes em heterozigóticos [38]. Logo se verificou que os genótipos NOD2 têm especificidade para DC e não para RCUI [39].

A descoberta do NOD2 aumentou a expectativa de que a genética identificasse os mecanismos fisiopatológicos da DII, impulsionando a pesquisa do papel da imunidade inata como fator principal na fisiopatologia da DC. Desde então vários locos de suscetibilidade têm sido envolvidos com DII, tanto em DC quanto em RCUI [24].

O gene da autofagia, ATG16L1 atua permitindo que a célula regule e degrade vários componentes intracelulares, inclusive patógenos. Este também tem sido associado a DC, mas não com RCUI [40].

A rota da interleucina-23-Th17 media a defesa antimicrobiana e o processo inflamatório intestinal. Múltiplos genes que regulam este caminho têm sido associados, tanto a DC como a RCUI [41,42].

Nos estudos iniciais, no entanto, as mutações observadas no NOD2, ocorriam em apenas 25% da população caucasóide com DC e estava ausente em asiáticos. Felizmente, o advento do mapeamento dos estudos associados do genoma (GWAS) rendeu um número inimaginável de genes de suscetibilidade para DC. Nesta abordagem, investigadores mapearam centenas de milhares de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) ao longo do genoma. O primeiro sucesso da GWA para DC, fazendo uso de apenas 90.000 SNPs, foi a descoberta em 2005, de variações da superfamília do gene do fator de necrose tumoral 15 (TNFSF15), como o primeiro gene comprovado para DC em asiáticos, tendo um risco um pouco menor para DC em europeus [43].

As variações genéticas encontradas, e que expõe ao risco de DC, apontam para a importância da imunidade inata, da autofagia e da fagocitose na patogênese da DC. Um número de genes associados a DC (IL23R, PTPN2) também estão associados a outras doenças auto-imunes, sugerindo haver desencadeantes em comum com estas outras patologias. Além disto, múltiplos segmentos intergênicos associados a doenças têm sido identificados em associações de estudos genômicos [44].

1.2 CÉLULAS NATURAL KILLER

As células NK são importantes na vigilância imunológica, fazendo parte da imunidade inata e correspondendo a cerca de 10 a 20% dos linfócitos circulantes. As células NK são linfócitos que diferem das células T e B, por serem morfologicamente maiores e apresentarem citoplasma granular [3]. Sua distribuição é sangüínea, mas também está presente, em menor freqüência, no pulmão, trato gastrointestinal, útero [45]. As células NK são raras nos linfonodos e medula óssea e não circulam pela linfa [46]. As células NK são precursoras da medula óssea, e não dependem do timo para maturação [47].

Distinguimos as células NK pela falta do receptor de célula T (TCR) e de imunoglobulina na membrana, assim como pela presença antígenos de superfície CD56 e/ou CD16. Fenotipicamente, as células NK são CD3-CD2+CD16+CD56+CD14-CD19- e ao contrário das células T e B, não expressam um antígeno bem definido [45].

A produção de citocinas por estas células é bastante variada, entre elas encontramos IL3, IL5, IL10, IL13, TNF- α , TGF- β 1, GM-CSF, INF- γ . A liberação das citocinas regula a atividade do sistema imune, principalmente a função de macrófagos, linfócitos, hemácias e células dendríticas [48,49].

A ativação das células NK por citocinas, principalmente IL-2, através das cadeias β e γ das células e do receptor (IL-2R) aumentam a atividade citotóxica e a proliferação celular [50]. A IL-15, que é produzida principalmente por macrófagos, também tem um papel importante na ativação celular, aumentando a resposta contra vírus [3].

Das funções conhecidas das células NK, podemos destacar: a defesa contra células tumorais, a defesa contra infecções, a regulação do hematopoiese, a regulação da imunidade e autoimunidade [3].

Durante a resposta imune, as células NK podem provocar um ataque direto às células alvo e interagir com células dendríticas. O resultado final desta interação é a ativação da citotoxicidade com liberação de perforinas e granzimas, produção de INF γ e proliferação das células NK. Outro mecanismo citolítico é por apoptose induzida pela superfamília dos receptores de necrose tumoral (TNRF) [48,50].

As células NK apresentam diversos receptores de superfície, também presentes em alguns linfócitos T e responsáveis pela identificação de agentes infecciosos e de células transformadas [45]. A atividade citolítica e a produção de citocinas pelas células NK estão reguladas pela ativação e inibição de receptores na superfície da célula. Os receptores compreendem famílias da lectina (CD94/NKG2A, ligante do HLA-E com função inibidora; ligante do MICA com função ativadora) e também os receptores KIR [4,5,51].

1.3 RECEPTORES KIR

Os receptores KIR são representantes da família das imunoglobulinas presentes na superfície celular, sendo expressos principalmente em células NK e em alguns linfócitos T [5].

Os genes KIR, que codificam estes receptores, estão localizados no cromossomo 19q13.4, sendo extremamente polimórficos. Até o momento, foram descobertos 17 genes [7].

As células NK reconhecem as moléculas de HLA de classe I clássicas (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e as não clássicas (HLA-E e HLA-G), presentes na membrana celular. Esse reconhecimento é feito, por intermédio desta família de receptores KIR envolvidos na atividade citolítica. Os receptores KIR são resultado da expressão deste sistema genético e estão divididos em grupos funcionais inibidores e ativadores [52].

A família de genes KIR consiste de quinze genes (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3 e KIR3DS1), assim como dois pseudogenes (KIR2DP1 e KIR3DP1) [52].

Os ligantes para os receptores KIR são as moléculas HLA de classe I. Os receptores KIR2DL2, KIR2DL3 e KIR2DS3 reconhecem algumas das moléculas HLA-C, identificadas como pertencentes ao grupo 1 (HLA-C1). Em contrapartida, os receptores KIR2DL1 e KIR2DS1 reconhecem o grupo 2 (HLA-C2). Os grupos 1 e 2 são distinguidos por um dimorfismo na posição 80 na hélice $\alpha 1$ da molécula HLA-C. As duas formas são caracterizadas pela presença de Ser77/Asn80 e Asn77/Lys80 [53].

O loco HLA-B pode ser dividido em dois grupos: Bw4 e Bw6. O KIR3DL1 interage com moléculas HLA-B quando sorologicamente forem Bw4 [54]. Molécula KIR2DL4 liga-se com HLA-G, tipo não clássico de HLA [53].

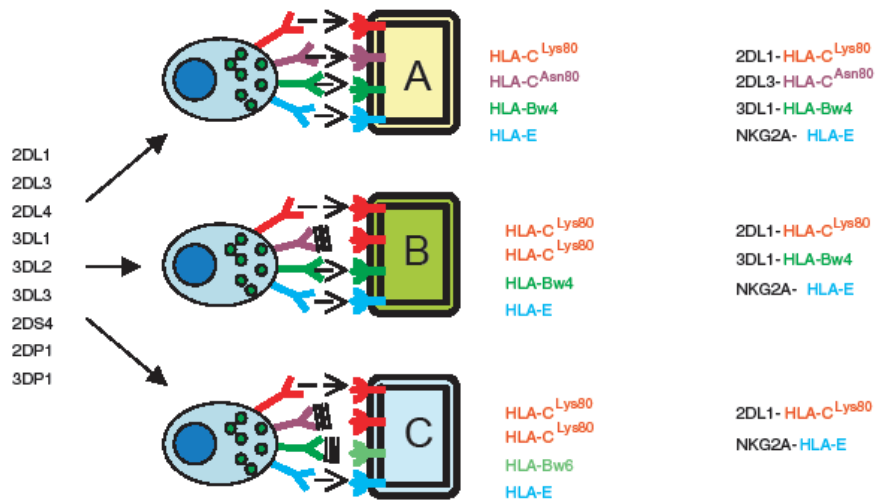


Figura 1 : Interação dos receptores KIR com as moléculas de HLA

Portanto, a atividade da célula NK depende de um determinado antígeno HLA de classe I expresso na superfície das células e de um KIR específico, ativador ou inibidor, expresso na célula NK (quadro 1). A interação de um KIR inibidor, com determinado HLA de classe I, é um evento protetor, já que evita a auto-agressão mediada pela mesma [4,52].

Recentemente há uma tendência de avaliar as várias combinações HLA/KIR e reproduzir modelos de ativação e inibição das células NK/NK-T. Dependendo do genótipo e da presença ou ausência do ligante HLA-C, indivíduos poderiam ter quatro níveis de resposta celular: excesso de ativação, balanço, excesso de inibição ou indeterminado [6,8,55].

Quadro 1 - Correspondência entre KIR e HLA

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

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

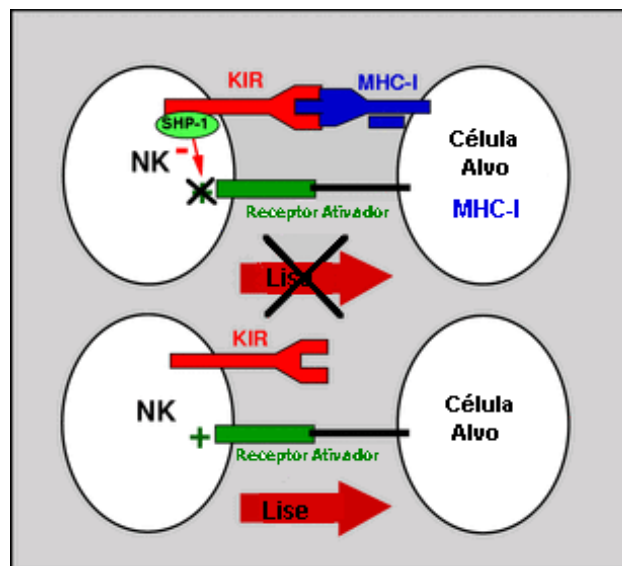


Figura 2 : Interação da célula NK com a célula alvo

1.3.1 NOMENCLATURA DOS GENES KIR

A nomenclatura mais usada é a baseada na estrutura da cauda 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 domínios extracelulares são responsáveis pelo reconhecimento da célula alvo. Os genes KIR com cauda longa são inibidores e os de cauda curta são ativadores. Dois pseudogenes (*2DP* ou *3DP*) foram identificados até então [52,53].

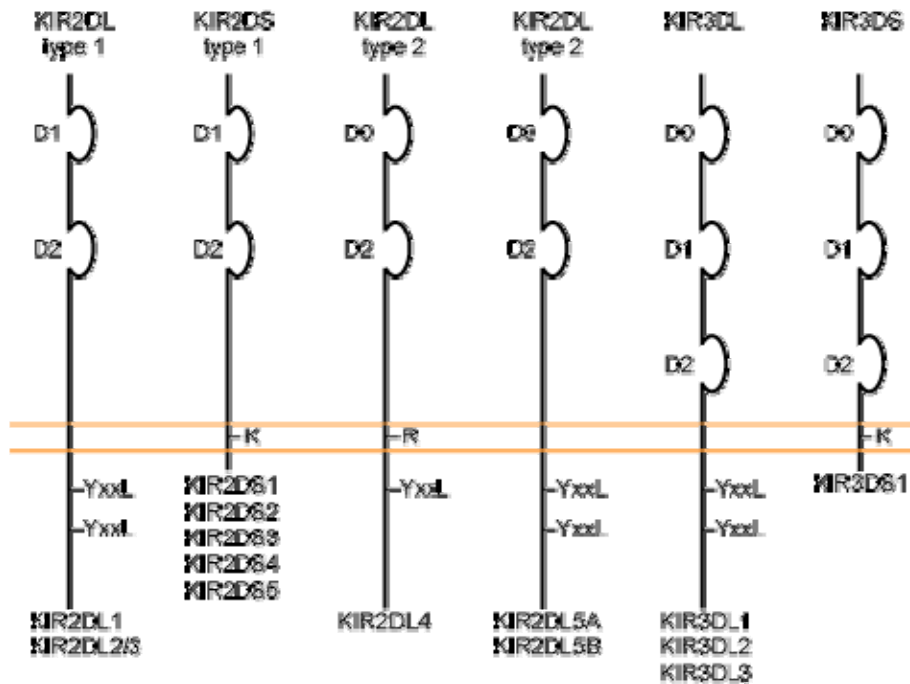


Figura 3: Diferenças na estrutura dos genes KIR, baseado na cauda citoplasmática e no número de domínios

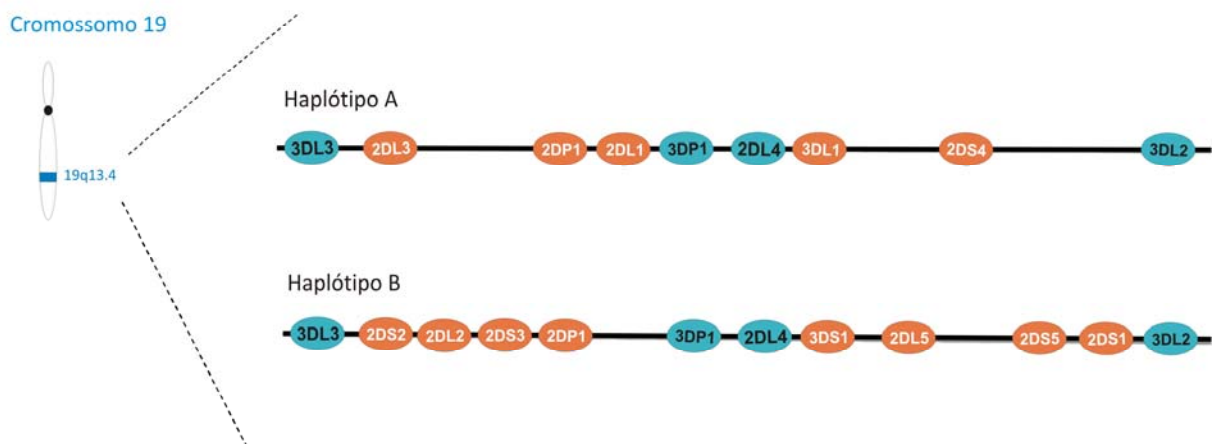
Os genes KIR formam haplótipos. Esses são genes identificados no mesmo cromossomo e que são herdados em bloco. Existem dois haplótipos importantes no sistema KIR, os haplótipos “A” e “B”. Embora se saiba que exista uma série de outros haplótipos, a literatura fala basicamente dos mais prevalentes, o “A” e o “B” [53].

O haplótipo A apresenta sete locos e tem como característica um maior número de receptores inibitórios. Ele se define 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. Haplótipo B se define pela presença do *KIR2DL2* e ausência do *KIR2DL1* e *KIR2DL3* [53].

Os genes *2DL4*, *3DP1*, *3DL2* e *3DL3* estão presentes em ambos os haplótipos e por isso são chamados de “framework” (estruturais) [52,53].

A diversidade de haplótipos dos genes KIR sugere que possa haver efeito variável dos receptores em diferentes doenças, oferecendo proteção contra determinada doença ou predisposição a outra [6,8].

Figura 4: Haplótipos dos genes KIR



REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

1. Yamamoto-Furusho JK, Podolsky DK. Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13:5577-80.
2. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347:417–29.
3. Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 29-35.
4. 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.
5. Vilches C, Parham P. KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 217-51.
6. Parham P. Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. *Immunology Letters* 2004; 92: 11-13.
7. Suto Y, Maenaka K, Yabe T, Hirai M, Tokunaga K, Tadok K, et al. Chromosomal localization of the human natural killer cell class I receptor family genes to 19q13.4 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1996; 35: 270.
8. Williams AP, Bateman AR, Khakoo SI. Hanging in the balance. KIR and their role in disease. *Mol Interv* 2005; 5: 226-46.
9. Jobim M, Jobim L F, Salim PH, Cestari TF, Toresan R, Gil BC et al. A study of the killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 in a Caucasoid Brazilian population with psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* 2008; 72: 392-6.
10. Momot T, Koch S, Hunzelmann N et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1561-5.
11. Pellett F, Siannis F, Vukin I, Lee P, Urowitz MB, Gladman DD. KIRs and autoimmune disease: studies in systemic lupus erythematosus and scleroderma *Tissue Antigens* 2007; 69:106-8.
12. 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.
13. van der Slik AR, Koeleman BP, Verduijn W, Bruining GJ, Roep BO, Giphart MJ. 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.
14. Jobim M, Chagastelles P, Salim PH, Portela P, Wilson TJ, Curti AG et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigen–C genotypes in South Brazilian with type 1 diabetes. *Human Immunology* 2010; 71: 799–803.
 15. Qi Y, Martin MP, Gao X et al. KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. *PLoS Pathog* 2006; 2: 79.
 16. Rauch A, Laird R, McKinnon E, Telenti A, Furrer H, Weber R 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.
 17. Boyton RJ, Smith J, Ward R, Jones M, Ozerovitch L, Wilson 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.
 18. Wang S, Zhao YR, Jiao YL, Wang LC, Li JF, Cui B 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.
 19. Kitawaki J, Xu B, Ishihara H, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N et al. Association of Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor Genotypes with Susceptibility to Endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58: 481-6.
 20. Passweg JR, Huard B, Tiercy JM, Roosnek E. HLA and KIR polymorphisms affect NK-cell anti-tumor activity. *Trends Immunol* 2007; 28: 437-41.
 21. Hollenbach J, Ladner MB, Saeteurn K, Taylor KD, Mei L, Haritunians T. Susceptibility to Crohn’s disease is mediated by KIR2DL2/KIR2DL3 heterozygosity and the HLA-C ligand. *Immunogenetics* 2009; 61: 663-71.
 22. Jones DC, Edgar RS, Ahmad T, Cummings JR, Jewell DP, Trowsdale J, et al. Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combination in ulcerative colitis susceptibility. *Genes Immun* 2006; 7: 576-82.
 23. Wilson TJ, Jobim M, Jobim LF, Portela P, Salim PH, Rosito MA, et al. Study of killer immunoglobulin-like receptor genes and human leukocyte antigens class I ligands in a Caucasian Brazilian population with Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Hum Immunol* 2010; 71: 293–7.

24. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427–34.
25. Bernstein CN, Wajda A, Blanchard JF. The clustering of other chronic inflammatory diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* 2005; 129: 827-36.
26. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sørensen TI, Binder V et al. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 84–8.
27. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol* 2006; 12: 3668–72.
28. Blumberg RS. Inflammation in the intestinal tract: pathogenesis and treatment. *Dig Dis.* 2009; 27: 455-64.
29. Eckburg PB, Relman DA. The role of microbes in Crohn's disease. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 256-62.
30. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 13780-5.
31. Abraham C, Cho JH . Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009; 361: 2066-78.
32. Brown SJ, Mayer L. The Immune Response in Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2058–69.
33. Ng SC, Kamm MA, Stagg AJ and Knight SC. Intestinal Dendritic Cells: Their Role in Bacterial Recognition, Lymphocyte Homing, and Intestinal Inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2010; in print.
34. Johansson C, Kelsall BL. Phenotype and function of intestinal dendritic cells. *Semin Immunol* 2005; 17: 284-94.
35. Niess JH, Brand S, Gu X. CX3CR-1mediated dendritic cells access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005; 307: 254-8.
36. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603.

37. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R et al. A frameshift mutation in NOD 2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-6.
38. Cho JH, Weaver CT. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007; 133: 1327-39.
39. Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 767-77.
40. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn's disease in ATG16L1. *Nat. Genet* 2007; 39: 207-11.
41. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; 441: 231-4.
42. McGeachy MJ, Cua DJ. The link between IL-23 and Th17 cell-mediated immune pathologies. *Semin Immunol* 2007; 19: 372-6.
43. Yamazaki K, McGovern D, Ragoussis J, Paolucci M, Butler H, Jewell D et al. Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 3499-506.
44. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory Bowel Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2010; 28: 573-621.
45. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989; 47: 187-376.
46. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev* 2006; 214: 56.
47. Santo JP and Vosshenrich CA. Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development. *Immunol Rev* 2006; 214: 35.
48. Handa K, Suzuki R, Matsui H, Shimizu Y and Kumagai K. Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL 2). II. IL 2-induced interferon gamma production. *J Immunol* 1983; 130: 988-92.
49. Ugolini S and Vivier E. Immunology: Natural killer cells remember. *Nature* 2009; 457: 544-5.

50. Degliantoni G, Murphy M, Kobayashi M, Francis MK, Perussia B, Trinchieri G. Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony-inhibiting activity and NK cytotoxic factor. Relationship with tumor necrosis factor and synergism with immune interferon. *J Exp Med* 1985; 162: 1512-30.
51. Lanier LL, Corliss B, Wu J and Phillips JH. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* 1998; 8: 693-701.
52. 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.
53. 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.
54. O'Connor GM, Guinan KJ, Cunningham RT, Middleton D, Parham P, Gardiner CM. Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. *J Immunol* 2007; 178: 235-41.
55. 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.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Investigar a associação do polimorfismo dos genes KIR em um grupo de pacientes com DC e RCUI e comparar com um grupo-controle sadio.

2.1 Objetivos secundários

Avaliar a frequência dos genes HLA de classe I (locos C) e genes KIR em pacientes com DC e RCUI e em grupo-controle caucasóide, através do método de PCR-SSP.

ORIGINAL ARTICLE**A study of the KIR genes and HLA class I ligands in a Caucasian Brazilian Population with Crohn's disease and Ulcerative Colitis.**

Timothy J Wilson¹, Mariana Jobim^{1,2}, Luiz Fernando Jobim^{2,8}, Pamela Portela¹, Patrícia H Salim¹, Mário A. Rosito³, Daniel de Carvalho Damin³, Cristina Flores⁴, Alessandra Peres⁵, Marta Brenner Machado⁶, José Artur Bogo Chies⁷, Gilberto Schwartzmann^{8,9,10} & Rafael Roesler^{9,10,11}

¹Postgraduate Course in Medical Sciences, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ²Department of Immunology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil; ³Department of Coloproctology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil; ⁴Department of Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil; ⁵Centro Universitário Metodista IPA, Porto Alegre, Brazil; ⁶Department of Gastroenterology, Hospital São Lucas da PUCRS, Brazil; ⁷Department of Genetics, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ⁸Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ⁹Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CP-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ¹⁰National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Porto Alegre, RS, Brazil; ¹¹Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Correspondence: Mariana Jobim¹ MD, Department of Immunology, Hospital de Clínicas, Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, Brazil. tel:+55 51 3359 8020

Fax: +55 51 3359 8308. e-mail: mjobim@hcpa.ufrgs.br

KEY WORDS: HLA; KIR genes; NK cell; Crohn's disease; ulcerative colitis

ABSTRACT:

Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC) are chronic inflammatory diseases of the bowel, of unknown origin. Exposure to specific environmental factors by genetically susceptible individuals, leading to an inadequate response of the immune system, is one of the potential explanations for the occurrence of these diseases. Natural Killer cells (NK) are part of the innate immune system recognizing class I HLA molecules (Human leukocyte antigen) on target cells through their membrane receptors. The main receptors of the NK cells are the Killer Immunoglobulin like Receptors (KIR). The aim of our study was to evaluate the association between the KIR genes in patients with inflammatory bowel diseases and healthy controls. We typed 15 KIR genes and HLA class I ligands in 248 unrelated Brazilian Caucasians of which 111 had UC and 137 CD, and 250 healthy controls by

polymerase chain reaction (PCR) using sequence-specific oligonucleotides and sequence-specific primers. We found an increase of KIR2DL2 in controls (IBD: $P < 0.001$; UC: $P = 0.01$; CD: $P = \text{NS}$). The genotype 2DL2+/HLA-C lys(80)+ was also more common in controls (IBD: $P = 0.005$; UC: $P = 0.01$; CD: $P = \text{NS}$); as well as 2DL1+/HLA-C Asn(80)+ (IBD: $P = 0.026$; UC: $P = \text{NS}$; CD: $P = \text{NS}$). The imbalance between activating and inhibitory KIR and HLA ligands may explain, at least in part, the pathogenesis of these inflammatory bowel diseases.

INTRODUCTION

Ulcerative Colitis (UC) and Crohn's Disease (CD) are the two main forms of chronic inflammatory bowel diseases (IBD), and although having an unknown etiology, are believed to result from a complex interaction of several genes conferring risk of disease and environmental factors, leading to an inadequate inflammation response (1).

Recent evidence suggests that innate immune response plays an important role in initiating the inflammatory cascade and subsequent characteristic pathological adaptive immune responses in IBD. The normal mucosal barrier on the bowel wall separates the host from immunological challenges represented by bacteria, viruses, fungi and food antigens within the lumen. Innate immune mechanisms are involved in this relationship, allowing a co-existence with commensal agents while contributing to protect the host from invasion by a rapid response to pathogens. In IBD patients there is a break in this tolerance and inflammation supervenes driven by the intestinal microbial flora (2,3).

Activation of innate immunological response relies on the recognition by the host of a series of microbial compounds through a variety of receptors called pattern recognition receptors (PRR), which include the toll-like receptor (TLR) and the NOD receptor families (a family of intracellular bacterial sensors) (4-7). Mutations in these receptors have been associated with the development of IBD (8-16).

Implication of Human leukocyte antigens (HLA) in determining susceptibility to inflammatory bowel disease has been made by several studies. A meta-analysis of all genetic linkage studies was published in 2004 confirming the relationship between IBD and HLA molecules (17). Previous studies have shown a link of HLA class II to UC and CD, revealing a possible connection between DR13 with UC and DR3 with CD (18). A recent publication further suggests a possible increased risk of developing colorectal cancer in those who have UC and carry DR17 (19).

The Natural Killer (NK) cells are also key components of the innate immune system and participate in the early response against infected or transformed cells, through the production of cytokines and by direct toxic effect (20,21). Their function is regulated by a variety of activating and inhibitory receptors, which are expressed on the cell surface. HLA class I molecules are located on the surface of target cells and are recognized by natural killer (NK) cell immunoglobulin-like receptors (KIR) (20).

The KIR receptor gene family is located on a region called IBD6, on chromosome 19q13.4, and contains 15 genes and two pseudogenes. KIR molecules interact with the HLA-C and -B alleles, providing information on the HLA class I surface expression of target cells. Engagement of KIR with the appropriate HLA ligand induces either inhibitory or activating signaling depending on the presence of intracellular immunoregulatory tyrosine-based inhibitory or activating motifs. Both KIR and their ligands display considerable genetic diversity. There is a growing interest about the possible role of KIR genes in several diseases, particularly those with alteration of the inflammatory response. A hypothesis is that various KIR/HLA combinations could produce differences in NK/NK T-cell activation (22,23).

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, -Cw13, -Cw14; and Group 2, or C2, consists of HLA-Cw2, -Cw4, - Cw5, -Cw6, -Cw17, -Cw 18. KIR2DS2, -2DL2 e -2DL3 recognize C1, while KIR2DS1 and -2DL1 recognize C2. KIR3DL1 is identified by HLA-Bw4. While there is still some controversy on the recognition of KIR3DS1, the current consensus is that -3DS1 is not recognized by Bw4 or Bw4I80 alleles. There is some indication of joint activity between -3DS1 with select Bw4s, such as B*57 and B*58, leading to enhanced NK cell activity, but it remains unknown if B*57 or B*58 can directly recognize KIR3DS1 (24).

Up to now, 15 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 (25,26). 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 among others (21,22). Genetic studies of the association of KIR with disease have been concerned with viral infections, solid tumors, hematological disease, inflammatory diseases such as IBD (21). The modulation of NK activity may establish a possible regulatory mechanism in gut inflammation. In a recent publication, Jones *et al.* found an increase of 2DL2 and 2DS2 in patients with UC suggesting that KIR genotype and HLA ligand interaction may contribute to the genetic susceptibility to this disease (27).

In the present study, we examined 15 KIR genes and HLA ligands in a group of IBD patients and compared to healthy controls, aiming at the identification of patterns of KIR genotypes and HLA ligands that could be more associated with susceptibility to these diseases. To the best of our knowledge, this is the first study of KIR genes in a Brazilian Caucasian population with CD and UC.

MATERIALS AND METHODS

Patient and control samples

Two hundred forty eight patients from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (110 men and 138 women) with IBD and 250 ethnically matched healthy controls (125 men and 125 women) from the Brazilian bone marrow center were studied for KIR polymorphism. The age was 40.19 ± 12.01 (mean \pm SD) years for the patients and 38.58 ± 10.49 years for the controls.

Blood samples were collected after obtaining an informed consent and authorization of the ethical committee in accordance with the Declaration of Helsinki (28). The diagnosis of IBD was based on standard clinical, radiological and histological criteria (29), and in accordance with the recent consensus on IBD published by the European Crohn's and Colitis Organization (ECCO) (30,31). Patients with other types of colitis were excluded from the study. Both groups were tested for KIR and ligand gene frequencies.

DNA Extraction & PCR

Blood samples were collected into tubes containing EDTA. DNA was extracted using salting-out procedure (32). 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 (33). Internal control was included in each PCR reaction. The combination employed to achieve a 10 μ l volume reaction was 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, which 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. HLA typing A, B and Cw alleles was also done using PCR with specific primers, described before (34).

Statistical analysis

Comparison of the KIR gene frequency with the control group was executed by Pearson Chi-Square with continuity correction and in a few, where the expected difference between the two groups was small, Fisher's exact test was employed. Odds ratio, confidence interval and significance values were calculated using SPSS 16.0. Bonferroni correction was used to adjust for the number of genes used.

RESULTS

From the IBD clinic 248 patients were recruited, had 137 CD and 111 had UC. The frequency of the inhibitory gene KIR2DL2 was increased in controls when compared to IBD patients and UC group (IBD: $P < 0.001$; UC: $P = 0.01$; CD: $P = \text{NS}$). No difference was seen between the controls and the cases with regard to HLA ligand A3, A11, Bw4, C1 and C2 (table1).

We further analyzed the combination of inhibitory and activating KIR genes with or without their corresponding HLA-C ligands. The reason for making this association was to evaluate the effect of genetic variation at the KIR locus in combination with genes encoding their HLA-C ligands on disease susceptibility or protection. The combination of KIR2DL2+/C1+ was found increased in controls when compared to IBD and CD, although not for UC (IBD: $P = 0.005$; UC: $P = \text{NS}$; CD: $P = 0.01$). The combination of KIR2DL1+/C2+ was just increased in IBD when compared to control (IBD: $P = 0.026$; UC: $P = \text{NS}$; CD: $P = \text{NS}$) (table 2).

In table 3, we demonstrate different correlations between KIR genes and their respective HLA-C ligand. Increased association of 2DS2-/2DL2+/C1+ was seen in the three groups (IBD: $P = 0.004$; UC: $P = 0.02$; CD: $P = 0.05$) (table 3). The combination of 2DL3+/C1+ with 2DS2-/ 2DL2- was increased in patients (IBD: $P = 0.01$; UC: $P = \text{NS}$; CD: $P = 0.004$). The least frequent association was 2DS1+/2DL1-/C2+ and 3DS1+ / 3DL1- /Bw4+ (table4).

DISCUSSION

IBD results from a complex interaction of environmental factors and diverse genes that confer risk for the disease, which leads to inadequate inflammatory response. Recent studies have described the importance of the innate immune system on first line of defense for microbial infections by initiating the inflammatory cascade in bowel (35).

Gene mutations of TLRs and NOD2, receptor families of PRRs, trigger a defect in sensing pathogens and predispose the host to recurrent infections, which may lead to perpetuation of intestinal inflammation. In a murine model, Watanabe *et al.* described a mutation of NOD2 together with TLRs, which lead to the loss of signaling of bacterial products, resulting in increased cytokine responses to commensal bacteria by macrophages (36).

The role of immune response in IBD has been the theme of a series of authors during the past few years (37,38,39). Johansson *et al.* discussed the increasing interest on the effect of NK cells in promoting or protecting against diseases, and consider the need for future studies on the location of these cells as well as the cytokine surroundings in which they act (40).

Giacomelli *et al.* demonstrated a decrease of NK activity in blood samples taken from controls when the serum from IBD patients was added. Their hypothesis is that soluble circulating factors, probably derived from lymphocytes, had inhibitory properties on NK cells, which would modulate cell activity

(41). Another study has reported reduced cytotoxicity of peripheral blood NK cells from UC patients (42).

It has been accepted that alterations in the expression of KIR repertoire on NK cells in addition to their corresponding ligands are associated with infectious and autoimmune disorders (21). Scleroderma is one of these rheumatic diseases in which the presence of 2DS2 and absence of 2DL2 in combination with their HLA-C ligand, have shown a positive association with KIR (43). In rheumatoid arthritis the occurrence of 2DS4 and HLA-Cw4 was positively associated with disease (44). Behçet's disease is an autoimmune chronic inflammatory disorder characterized by recurrent ulcers and involvement of gastrointestinal tract. Recent data demonstrated no association between presence or absence for the KIR genes in patients (45).

Polymorphism with in KIR2DL2 was the subject of a recent study in association with type 1 Diabetes, in which preliminary results suggest an increased risk for individuals carrying the rs2756923 G allele (46). No report was been made about single nucleotide polymorphism linked to IBD.

In a recent study of 194 UC patients and 216 controls, Jones *et al.* found an increase of the frequency of KIR2DL2 and -2DS2 in the UC cohort ($P=0.030$ and 0.038 , respectively). They also observed an increase of KIR2DL3 in combination with its ligand C1 in controls ($P=0.019$), conferring a protective effect by that association (27).

In our study, the genetic variability of KIRs or ligands HLA-A, Bw4 and Cw was evaluated in a Brazilian Caucasian population with CD and UC. However, we were not able to confirm the results reported by Jones *et al.* (27). In our series, KIR2DL2 frequency (table 1) and KIR2DL2+/C1+ and KIR2DL1+/C2+ association (table 2) was increased in controls. Therefore, we can only expeculate on the existence of a potential relationship between KIR gene content in the genome and the development UC and DC. Distinct KIR/HLA-ligand combinations, KIR2DL2/C1 and KIR2DL1/C2 in controls, may be relevant to prevent the development of the disease.

A recent report in patients with chronic myeloid leukemia described also a protective effect of KIR2DL2 and/or KIR2DS2 with the presence of the ligand HLA-C1 and proposes a model of protection (47).

A publication from Zeying *et al.* suggested that a single inhibitory KIR can constitute the minimal KIR repertoire for human NK cells (48). The HLA ligand has been demonstrated to have affinity to KIR's activators, but it still remains lower than the inhibitory homologue. Perhaps the explanation for having a large amount of inhibitory KIR on cell surface and the greater affinity of these receptors is the need of protection, to promote an adequate response against infected or transformed cells (21).

Since activator and inhibitor genes have different affinities, a model of cell response could be considered, in which depending on the genotype and the presence or the lack of HLA-C ligands,

individuals could have different levels of cell response, with excess of activation, balance, excess of inhibition, or undetermined behavior. This concept has been applied to the study of susceptibility or protection to the development of inflammatory illnesses by several groups (21,22,44,49,50). As KIR2DL2, KIR2DL2/C1 and KIR2DL1/C2 are both increased in controls, a protective effect could be anticipated in these individuals. Studies involving larger samples of Caucasian populations are needed to help us understanding the immunological basis of these fascinating diseases.

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. R.R. and G.S. are supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); the South American Office for Anticancer Drug Development (SOAD; Porto Alegre, Brazil); and the National Institute for Translational Medicine (INCT program).

REFERENCES

- [1] Brown SJ, Mayer L. The Immune Response in Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol* 2007; **102**: 2058-69.
- [2] Yamamoto-Furusho JK, Podolsky DK. Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007; **13**: 5577-80.
- [3] Korzenik JR. Is Crohn's disease due to defective immunity? *Gut* 2007; **56**: 2-5.
- [4] Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003; **278**: 8869-72.
- [5] van Heel DA, Ghosh S, Butler M, et al. Myramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet* 2005; **365**: 1794-96.
- [6] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; **124**: 783-801.
- [7] Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med* 2006; **84**: 712-25.
- [8] Xavier RJ & Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; **448**: 427-34.
- [9] Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infec Immun* 2000; **68**: 7010-17.
- [10] Ogura Y, Bonen DK, Inohara N et al. A frameshift mutation in NOD 2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; **411**: 603-606.
- [11] Arnott ID, Ho GT, Nimmo ER et al. Toll-like receptor 4 gene in IBD: further evidence for genetic heterogeneity in Europe. *Gut* 2005; **54**: 308.

- [12] Lakatos PL, Lakatos K, Szalay F et al. Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J Gastroenterol* 2005; **11**: 1489-95.
- [13] Pierik M, Jooseens S, Van Steen K et al. Toll-like receptors-1, -2 and-6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2006; **12**: 1-8.
- [14] McGovern DP, Hysi P, Ahmad Tet al. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD 1(CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet* 2005; **14**: 1245-50.
- [15] Marks DJ, Harbord MW, MacAllister R, et al. Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation. *Lancet* 2006; **367**: 668-78.
- [16] von Stein P, Lofberg R, Kuznetsov NV, et al. Multigene analysis can discriminate between ulcerative colitis, Crohn's disease, and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2008; **134**: 1869-81.
- [17] van Heel DA, Fisher SA, Kirby A et al. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Human Molecular Genetics* 2004; **13**: 763-70.
- [18] Annese V, Piepoli A, Latiano A, Lombardi G, Napolitano G. HLA-DRB1 Alleles May Influence Disease Phenotype in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Critical Reappraisal With Review of the Literature. *Dis Colon Rectum* 2005; **48**: 57-65.
- [19] Garrity-Park MM, Loftus EV Jr, Sandborn WJ, Bryant SC, Smyrk TC. MHC Class II alleles in ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *Gut* 2009; **58**: 1226-33.
- [20] Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2005; **17**: 29-35.
- [21] Williams AP, Bateman AR, Khakoo SI. Hanging in balance. *KIR* and their role in disease. *Mol Interv* 2005; **5**: 226-46.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Long BR, Ndhlovu LC, Oksenberg JR, et al. Conferral of Enhanced Natural Killer Cell Function by *KIR3DS1* in Early Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol* 2008; **82**: 4785-92.
- [25] Flores AC, Marcos CY, Paladino N, et al. *KIR* genes polymorphism in Argentinean Caucasoid and Amerindian population. *Tissue Antigen* 2007; **69**: 568-76.
- [26] Contreras G, Aláez C, Murguá A, et al. Distribution of killer cell-immunoglobulin-like receptors in Mexican Mestizos. *Tissue Antigens* 2007; **69**: 125-9.
- [27] Jones DC, Edgar RS, Ahmad T, et al. Killer Ig-like receptor (*KIR*) genotype and HLA ligant combination in ulcerative colitis susceptibility. *Genes Immun* 2006; **7**: 576-82.

- [28] Rickham PP Human experimentation. Code of ethics of the world medical association. Declaration of Helsinki. *Br Med J* 1964; **2**: 177.
- [29] Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1989; **170**: 2-6.
- [30] Stange EF, Travis SPL, Geboes K et al. For the European Crohn's and Colitis Organization (ECCO). European consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: definitions and diagnosis. *J Crohn's and Colitis* 2008; **2**:1-23.
- [31] Stange EF, Travis SPL, Vermeire S et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 2006; **55**: 1-15.
- [32] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 1215.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; **347**: 417-29.
- [36] Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, et al. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* 2004; **5**: 800-08.
- [37] Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 521-33.
- [38] Danese S, Gasbarrini A. Chemokines in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol.* 2005; **58**:1025-27.
- [39] Tsianos EV, Katsanos K. Do we really understand what the immunological disturbances in inflammatory bowel disease mean? *World J Gastroenterol* 2009; **15**: 521-5.
- [40] Johansson S, Berg L, Hall H, et al. NK cells: elusive players in autoimmunity. *Trends Immunol* 2005; **26**: 613-18.
- [41] Giacomelli R, Passacantando A, Frieri G, et al. Circulating soluble factor-inhibiting natural killer (NK) activity of fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from inflammatory bowel disease (IBD) patients. *Clin Exp Immunol* 1999 ; **115**: 72-77.
- [42] Auer IO, Ziemer E, Sommer H. Immune status in Crohn's disease. V. Decreased in vitro natural killer cell activity in peripheral blood. *Clin Exp Immunol* 1980; **42**: 41-49.
- [43] Momot T, Koch S, Hunzelmann N, Krieg T, Ulbricht K, Schmidt RE & Witte T Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. *Arthritis and Rheumatism* 2004; **50**: 1561-5.
- [44] 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.
- [45] Middleton D, Meenagh A, Sleator C, Gourraud PA, Ayna T et al. No association of KIR genes with Behcet's disease. *Tissue Antigens* 2007; **70**: 435-8.

- [46] Ramos-Lopez E, Scholten F, Aminkeng F, Wild C, Kalhes H. Association of KIR2DL2 polymorphism rs2756923 with type 1 diabetes and preliminary evidence for lack of inhibition through HLA-C1 ligand binding. *Tissue Antigens* 2009; **73**: 599-603.
- [47] Middleton D, Diler AS, Meenagh A, Sleator C, Gourraud PA. Killer immunoglobulin-like receptors (KIR2DL2 and/or KIR2DS2) in presence of their ligand (HLA-C1 group) protect against chronic myeloid leukaemia. *Tissue Antigens* 2009; **73**: 553-60.
- [48] Du Z, Gjertson DW, Reed EF, Rajalingam R. Receptor-ligand analyses define minimal killer cell Ig-like receptor (KIR) in humans. *Immunogenetics* 2007; **59**:1-15.
- [49] Shastry A, Sedimbi SK, Rajalingam R et al. Combination of KIR 2DL2 and HLA-C1 (Asn 80) confers susceptibility to type 1 diabetes in Latvians. *Int J Immunogenet* 2008; **35**: 439-46.
- [50] Carrington M, Wang S, Martin MP, Gao X, Schiffman M et al. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *Journal of Experimental Medicine* 2005; **201**: 1069-75.

Tables

Table 1. KIR gene frequencies (%) in healthy unrelated individuals (n=250), chronic inflammatory bowel diseases (n=248) and their two forms: Crohn's Disease (137) and Ulcerative colitis (111).

KIR gene	Controls		IBD		P-value*	UC		P-value*	CD		P-value*
	N	%	N	%		N	%		N	%	
2DL1	244	97.6	240	97.2	NS	108	97.3	NS	133	97.1	NS
2DL2	164	65.6	121	48.7	0.001	50	45.0	0.01	72	52.4	NS
2DL3	216	86.4	222	89.9	NS	100	90.1	NS	123	89.8	NS
2DL4	250	100.0	248	100.0	NS	111	100.0	NS	137	100.0	NS
2DL5	124	49.6	140	56.7	NS	65	58.6	NS	76	55.5	NS
3DL1	244	97.6	233	94.6	NS	108	97.3	NS	126	92.0	NS
3DL2	250	100.0	248	100.0	NS	111	100.0	NS	137	100.0	NS
3DL3	250	100.0	248	100.0	NS	111	100.0	NS	137	100.0	NS
2DS1	91	36.4	103	41.7	NS	50	45.0	NS	54	39.4	NS
2DS2	134	53.6	125	50.6	NS	54	48.6	NS	72	52.6	NS
2DS3	83	33.2	77	31.2	NS	32	28.8	NS	45	32.0	NS
2DS4	238	95.2	226	91.5	NS	102	91.9	NS	125	91.2	NS
3DS1	106	42.4	116	47.0	NS	52	46.8	NS	65	47.4	NS
2DP1	250	100.0	248	100.0	NS	111	100.0	NS	137	100.0	NS
A*03	55	22.0	27	20.3	NS	11	17.5	NS	16	22.5	NS
A*11	32	12.8	18	13.5	NS	12	19.0	NS	6	8.5	NS
Bw4	171	68.4	77	57.5	NS	39	61.9	NS	38	53.5	NS
C1	180	72.0	193	78.1	NS	88	79.3	NS	106	77.4	NS
C2	179	71.6	154	62.3	NS	68	61.3	NS	86	62.8	NS

Chronic Inflammatory Bowel Disease (IBD); Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC)

*Chi-Square Test or Fischer's Exact Test with Bonferroni correction

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

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

Bw 4: HLA-B 08, 13, 27, 44, 51, 52, 53, 57, 58

Table 2 . KIR combinations and HLA ligands frequencies in healthy controls (250), chronic inflammatory bowel diseases (n=248) and their two forms: Crohn's Disease (137) and Ulcerative colitis (111).

	Controls		P-value*	UC		P-value*	CD		P-value*
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)				
2DL2/ C1	122 (48.8)	90 (37.0)	0.005	37 (34.2)	0.01	53 (38.6)	NS		
2DS2/ C1	100 (40.0)	97 (38.7)	NS	42 (37.8)	NS	55 (40.1)	NS		
2DL3/ C1	153 (61.2)	172 (69.3)	NS	78 (70.2)	NS	95 (69.3)	NS		
2DL1/ C2	176 (70.4)	150 (60.4)	0.026	82 (73.8)	NS	83 (60.5)	NS		
2DS1/ C2	63 (25.2)	60 (24.1)	NS	26 (23.4)	NS	34 (25.3)	NS		

*Chi-Square Test, NS = Not Significant

IBD: chronic inflammatory bowel diseases; UC: Ulcerative colitis; CD: Crohn's Disease.

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

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

Table 3 . Correlation between KIR and HLA ligand in unrelated healthy individuals (n=250), chronic inflammatory bowel diseases (n=248) and their two forms: Crohn's Disease (137) and Ulcerative colitis (111).

	Controls		P-value*	UC		P-value*	CD		P-value*
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)				
2DS2+/2DL2-/C1+	9 (3.6)	9 (3.6)	NS	5 (4.5)	NS	4 (2.9)	NS		
2DS2-/2DL2+/C1+	16 (6.4)	3 (1.2)	0.004	1 (0.9)	0.02	2 (1.4)	0.05		
2DS1+/2DL1-/C2+	3 (1.2)	1 (0.4)	NS	0 0.0	NS	1 (0.7)	NS		
2DS1-/2DL1+/C2+	116 (40.3)	91 (32.8)	NS	41 (36.5)	NS	50 (29.6)	NS		

*Chi-Square Test or Fisher's exact Test; NS=Not Significant

Chronic Inflammatory Bow el Disease (IBD); Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC)

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

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

Table 4 . KIR and HLA ligands in controls (n=250), chronic inflammatory bowel diseases (n=248) and their two forms: Crohn's Disease (137) and Ulcerative colitis (111)

	Controls		IBD		UC		CD	
	N	(%)	N	(%)	(N)	(%)	(N)	(%)
KIR / C1 group								
2DS2+ / 2DL2- / 2DL3- / C1+	1	(0.7)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
2DS2- / 2DL2- / 2DL3+ / C1+	25	(19.0)	44	(32.8) ^a	17	(27.0)	27	(38.0) ^b
2DS2+ / 2DL2- / 2DL3+ / C1+	8	(6.0)	5	(3.7)	2	(3.2)	3	(4.2)
2DS2- / 2DL2+ / 2DL3+ / C1+	4	(3.0)	4	(3.0)	2	(3.2)	2	(2.8)
2DS2+ / 2DL2+ / 2DL3- / C1+	19	(14.2)	8	(6.0)	5	(7.9)	3	(4.2)
2DS2+ / 2DL2+ / 2DL3+ / C1+	50	(27.8)	33	(24.6)	17	27.0	16	(22.5)
KIR / C2 group								
2DS1+ / 2DL1- / C2+	2	(1.5)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
2DS1- / 2DL1+ / C2+	50	(37.3)	44	(32.8)	23	(36.5)	21	(29.6)
2DS1+ / 2DL1+ / C2+	35	(26.1)	36	(26.9)	17	(27.0)	19	(26.8)
KIR / Bw4 group								
3DS1+ / 3DL1+ / Bw4+	44	(32.8)	39	(29.1)	20	(31.7)	19	(26.8)
3DS1+ / 3DL1- / Bw4+	1	(0.7)	1	(0.7)	0	(0.0)	1	(1.4)
3DS1- / 3DL1+ / Bw4+	45	(33.6)	37	(27.6)	19	(30.2)	18	(25.4)
KIR / HLA-A group								
3DL1+ / A3+ / A11+	2	(1.5)	2	(1.5)	1	1.6	1	(1.4)
3DL1+ / A3- / A11+	16	(11.9)	16	(11.9)	11	17.5	5	(7.0)
3DL1+ / A3+ / A11-	29	(21.6)	25	(18.7)	10	15.9	15	(21.1)
3DL1+ / A3- / A11-	87	(64.9)	90	(67.2)	40	63.5	50	(70.4)

Chronic Inflammatory Bowel Disease (IBD); Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC)

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

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

Bw 4: HLA-B 08, 13, 27, 44, 51, 52, 53, 57, 58

^aP=0.01; ^bP=0.004;

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

As doenças inflamatórias intestinais são enfermidades de fisiopatologia complexa. Acredita-se que a exposição a determinados fatores ambientais, em indivíduos geneticamente suscetíveis, gere uma resposta imune irregular a microbiota comensal, acabando com a harmonia no lúmen intestinal.

A imunidade inata gera uma resposta rápida aos agentes antigênicos. A parede intestinal apresenta células que preparam a defesa contra potenciais agressores. Elas, também condicionam células epiteliais e as apresentadoras de antígenos à tolerância, possibilitando a convivência com a flora intestinal.

A célula NK atua na regulação da imunidade inata, tendo também papel de importância na interação com as células dendríticas. O resultado final desta interação pode ser a sua ativação e a respectiva citotoxicidade contra células alvo com liberação de perforinas, produção de INF γ e proliferação das células NK. As CDs têm como finalidade principal a ativação da célula T através das citocinas, peça chave da fisiopatogenia da DII, podendo também, interagir com o linfócito e ativá-lo.

É provável que o elevado polimorfismo observado nos genes KIR, contribuiria para a regulação da imunidade inata. Nosso trabalho mostrou aumento do KIR inibidor KIR2DL2 nos controles quando comparados com pacientes. Entre os controles também se observou aumento da combinação dos genes inibidores KIR2DL1 e KIR2DL2 com os seus respectivos ligantes HLA-C lys (80) e Asn (80). Diversos modelos foram propostos para explicar este fato, um dos quais seria de que receptores inibidores seriam mais importantes do que os ativadores, protegendo de doenças.

As 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. Na presença de anomalias na atividade das células NK, podem ocorrer condições favoráveis ao surgimento de desordens inflamatórias e auto-imunes

ANEXO

Anexo I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO: Análise da frequência dos genes KIR e HLA classe I em pacientes com doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa e grupo controle.

Nome:

Número do prontuário:

Fone:

Data:

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA E OBJETIVO:

A doença de Crohn e a retocolite ulcerativa são doenças inflamatórias intestinais crônicas de causa ainda desconhecida.

Devido ao forte componente imunológico das doenças citadas, o objetivo deste estudo será fazer uma análise da frequência dos genes KIR e HLA em pacientes com Doença de Crohn e retocolite ulcerativa e comparar os resultados com indivíduos saudáveis.

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

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 da

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 coleta de sangue, como num exame de rotina.

BENEFÍCIOS:

O benefício do estudo seria ter mais conhecimento genético sobre a doença de Crohn e retocolite ulcerativa.

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 Dr Gilberto Schwartzmann, pesquisador responsável.

Fones: 21018020

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

Anexo II – Protocolo de coletas de dados

Análise da frequência dos genes KIR e HLA classe I em pacientes com doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa e grupo controle.

() Retocolite Ulcerativa ou () Doença de Crohn 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: _____