

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES KIR NA ESCLEROSE SISTÊMICA

Patricia Hartstein Salim

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Tavares Brenol

Dissertação de Mestrado

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES KIR NA ESCLEROSE SISTÊMICA

Patricia Hartstein Salim

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Tavares Brenol

Dissertação de Mestrado

2009

Agradecimentos

Ao Professor Ricardo Machado Xavier pela sua orientação e dedicação. Por confiar e acreditar no meu trabalho.

Ao Professor João Carlos Tavares Brenol pela orientação.

Ao Professor Luiz Fernando Jobim, que acreditou em mim e possibilitou a concretização deste trabalho.

Ao colega Markus Bredemeier, por todo o auxílio com as análises estatísticas deste trabalho.

A todos os colegas do Serviço de Imunologia, pela compreensão e auxílio.

Ao grupo dos cientistas orientados do Prof. Ricardo M. Xavier pela amizade.

Aos meus amigos, pela amizade e companheirismo.

Aos meus pais, à minha avó e aos meus irmãos pelo amor, carinho e paciência em todos os momentos difíceis.

Ao FIPE-HCPA e CAPES, pelo auxílio financeiro.

Meta, a gente busca

Caminho, a gente encontra

Desafio, a gente enfrenta

Vida, a gente inventa

Saudade, a gente mata

Sonho, a gente realiza

(autor desconhecido)

Sumário

ABREVIATURAS E SIGLAS.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUÇÃO.....	9
JUSTIFICATIVA.....	11
1 REVISÃO DA LITERATURA.....	12
1.1 ESCLEROSE SISTÊMICA.....	12
1.1.1 <i>Patogênese da ES</i>	13
1.2 CÉLULAS NATURAL KILLER.....	14
1.3 RECEPTOR KIR.....	17
1.3.1 <i>Diversidade haplotípica</i>	18
1.3.2 <i>Ligantes dos receptores KIR</i>	20
1.3.3 <i>Mecanismo de ação</i>	22
1.4 ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS NK NAS DOENÇAS AUTO-IMUNES.....	23
1.5 O PAPEL DAS CÉLULAS NK NA ESCLEROSE SISTÊMICA.....	26
2 OBJETIVOS.....	41
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	41
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3 ARTIGO ORIGINAL.....	42
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
APÊNDICE.....	66
A – PROTOCOLO DE PESQUISA DE DADOS CLÍNICOS.....	66
B – PROTOCOLO DE PESQUISA.....	73
C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PACIENTES.....	74
D – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLES	77
ANEXOS.....	79
ANEXO I – INSTRUÇÕES AO AUTOR (ARTHRITIS & RHEUMATISM).....	79
ANEXO II – CRITÉRIOS ESTABELECIDOS PELO ACR PARA ESCLEROSE SISTÊMICA.....	82
ANEXO III – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HCPA.....	84

ABREVIATURAS E SIGLAS

AR: Artrite reumatóide

ES: Esclerose sistêmica

HLA: *Human Leukocyte Antigen* - Antígenos Leucocitários Humanos

IL: *Interleukin* - Interleucina

INF: Interferon

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

NK: *Natural Killer Cells* - Células Matadora Naturais

NKT: *Natural Killer T Cells* - Células Matadoras Naturais tipo célula T

PCR: *Polimerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase

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

SSP: *Sequence Specific Primers* - Seqüência de Primers Específicos

RESUMO

As células *Natural Killer* (NK) fazem parte da resposta imune inata, sendo a primeira linha de defesa do organismo contra vírus, bactérias, tumores e microorganismos. Estas células induzem a morte da célula-alvo quando não há o reconhecimento das moléculas de antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe I, através de seus receptores, chamados *Killer cell Immunoglobulin-like Receptor* (KIR). Vários estudos demonstram o envolvimento dos genes KIR na patogênese das doenças auto-imunes. Acredita-se que combinações desses genes possam ser favoráveis para o desenvolvimento da esclerose sistêmica (ES). Portanto, o conhecimento destes genes relacionados às células NK poderiam ser úteis para o entendimento da patogênese da ES. O objetivo deste estudo é investigar o polimorfismo dos genes *KIR* em um grupo de pacientes com ES, incluindo a forma difusa e limitada da doença. A frequência do receptor inibidor *KIR2DL2* foi significativamente menor nos pacientes comparada com a do grupo controle (28,7% versus 65,2%; $P < 0,001$; OR=0,21; IC95% 0,11–0,38). Quando analisamos a combinação do receptor inibidor *2DL2*, com a presença do ativador *2DS2* (*KI2DS2+ / KIR2DL2-*), encontramos uma maior frequência nos pacientes (26,1% versus 1,7%; $P < 0,001$; OR=19,94; IC95% 4,7–175,1). Por outro lado, a presença de ambos *KIR2DL2* e *KIR2DS2* foi mais freqüente no grupo controle (26,9% versus 57,3%; $P < 0,001$; OR=0,27; 95%CI 0,1–0,4). Nenhuma diferença estatística no polimorfismo dos genes *KIR* foi encontrada entre a forma difusa e a forma limitada. A combinação *KIR2DS2+ / KIR2DL2-* parece ser um fator de risco para o desenvolvimento da ES enquanto a alta frequência do gene inibidor *KIR2DL2* no grupo controle parece ter uma função protetora. Estes resultados indicam um potencial papel dos genes *KIR* na patogênese da ES.

PALAVRAS-CHAVE: Células Natural Killer, Genes KIR, Esclerose Sistêmica, Auto-imunidade

ABSTRACT

Natural killer (NK) cells have an important role in the early responses to viral infections. They kill diverse target cells with decreased or absent expression of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules through the Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors (*KIR*). Many studies have reported association of *KIR* genes with autoimmune diseases. The objective of this study is to investigate possible associations of *KIR* polymorphisms with systemic sclerosis (SSc), including the limited (lSSc) and diffuse (dSSc) forms of the disease. The frequency of inhibitory *KIR2DL2* was significantly decreased among patients with SSc compared with healthy controls (28.7% versus 65.2; $P < 0.001$, odds ratio [OR] 0.21, 95% confidence interval [95% CI] 0.11–0.38). When activatory and inhibitory *KIR* genes were analyzed in combination, the concomitant presence of *KIR2DS2* and absence of *KIR2DL2* (*KIR2DS2*⁺/*KIR2DL2*⁻) phenotype was more frequent in SSc patients than in the control group (26.08% versus 1.75%; $P < 0.001$, OR=19.94, 95%CI [4.78–175.10]). On the other hand, the presence of both *KIR2DS2* and *KIR2DL2* was more frequent in the control group (26.96% versus 57.39%; $P = 0.000005$, OR=0.27, 95%CI [0.15–0.49]). No significant difference in *KIR* genes polymorphisms was found between lSSc and dSSc disease subsets. The combination of *KIR2DS2*⁺/*KIR2DL2*⁻ may be a risk factor for development of SSc while the higher frequency of the inhibitory *KIR2DL2* gene in the control group suggest to a protective effect. These results indicate a potential role of *KIR* genes in the SSc pathogenesis.

KEYWORDS: Natural Killer Cell, Killer cell Immunoglobulin-like Receptor genes, Systemic Sclerosis, Autoimmunity

INTRODUÇÃO

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença rara, caracterizada por inflamação, dano vascular, fibrose, produção de auto-anticorpos e produção excessiva de colágeno. A patogênese da doença ainda não está totalmente elucidada, mas sabe-se que está relacionada com a auto-imunidade. Muitos estudos estão sendo realizados para encontrar um tratamento eficaz, o que não existe atualmente. Sabe-se que fatores genéticos relacionados aos seus receptores podem estar associados a determinadas doenças.

As células *Natural Killer* (NK) e algumas células T (NKT) são importante reguladoras da resposta imune, incluindo a auto-imunidade. Elas são uma subpopulação de linfócitos que destroem as células infectadas e células que perderam a expressão de moléculas HLA classe I. A ativação da célula NK é regulada por um balanço entre os sinais que são gerados a partir de receptores de ativação e de receptores de inibição.

Estes receptores são chamados de *Killer cell Immunoglobulin-Like Receptors* (KIR) e estão localizados no braço longo do cromossomo 19. Na superfície das células NK/NKT estão presente receptores ativadores e inibidores, que, conforme a interação com seus respectivos ligantes, podem gerar um “balanço”, evitando a lise da célula alvo.

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo estudar a associação dos genes *KIR* com a esclerose sistêmica. Este projeto contou com o apoio financeiro do FIPE (Fundo de Investimento a Pesquisa e Eventos do HCPA) e do CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA, sob o número 05-549.

JUSTIFICATIVA

Em função do desconhecimento da imunopatogenia da esclerose sistêmica, o que se reflete na inexistência de terapias eficazes, faz-se necessário estudar a participação das células Natural Killer e a influência do extenso polimorfismo dos genes KIR nessa patologia.

A identificação de associações entre esses polimorfismos e a esclerose sistêmica poderia impactar não somente na melhor compreensão da fisiopatogênese, mas também na identificação de grupos de risco para o desenvolvimento da doença e de subgrupos de pacientes com melhor ou pior prognósticos.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 ESCLEROSE SISTÊMICA

A Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença auto-imune¹ e rara², caracterizada pela disfunção endotelial³ e fibrose⁴. É uma doença difusa do tecido conjuntivo, podendo afetar os órgãos e os sistemas internos do organismo. Existem duas formas de apresentação da ES, a limitada e a difusa, sendo estas diferenciadas pela extensão do envolvimento cutâneo⁵. As suas características principais são a deposição de colágeno excessiva⁶, lesões vasculares⁷ e alterações da imunidade celular e humoral⁸.

Existem evidências de que certos quadros genéticos favorecem a progressão da inflamação crônica para o processo fibrótico⁹. A participação do sistema imune é sugerida pela presença de células mononucleares infiltradas em lesões¹⁰, anormalidades nas células T auxiliares e na função dos monócitos¹¹, redução da atividade das células NK¹² e liberação de várias citocinas¹³.

O sistema imunológico estimula algumas células na produção de colágeno com o objetivo de formar uma cicatriz após dano tecidual¹⁴. Esta produção de colágeno é excessiva na ES e ocorre sem estímulo aparente na pele e nos órgãos internos¹⁵.

1.1.1 PATOGÊNESE DA ES

A etiopatogênese da ES permanece desconhecida. Sabe-se que a ativação do sistema imunológico é um fenômeno inicial na doença. Na fase inicial das lesões encontramos linfócitos T, plasmócitos, macrófagos, eosinófilos e basófilos¹⁶. Estas células ativam fibroblastos e células endoteliais através de mediadores solúveis ou pelo fenômeno de toxicidade direta. Assim, através da sua ativação por citocinas (TGF β ¹⁷, CTGF¹⁸ e IL-4¹⁹), os fibroblastos produzem grandes quantidades de colágeno tipo I e III. Dentro das lesões cutâneas encontram-se grandes quantidades de linfócitos T CD4+ e CD8+, com uma alta prevalência de CD4+. Estas células são encontradas em abundância na pele na presença de células endoteliais anormais²⁰. As células do sistema imune podem causar dano vascular através da proliferação ou estimulação de fibroblastos, para produzir colágeno²¹.

A ES é uma doença multifatorial complexa. Uma das hipóteses da patogênese é que a ativação do sistema imune é estimulada por predisposição genética e fatores ambientais²². Entre estes, os fatores mais conhecidos por aumentar o risco de ES incluem: a sílica cristalina²³, os solventes, as resinas e os solventes aromáticos²⁴. Alguns fatores genéticos podem influenciar a susceptibilidade para desenvolver ES²⁵. Há casos de história familiar, no entanto, o risco absoluto para cada membro da família é baixo (<1%). O risco relativo em parentes de primeiro grau é de 10 a 16, e entre gêmeos 10 a 27²⁶. Muitos estudos sugerem que a susceptibilidade genética sozinha não é suficiente para induzir a doença, necessitando de outros fatores envolvidos.

Vários genes foram estudados com a finalidade de encontrar um marcador polimórfico associado com a doença²⁷. Um deles foi o sistema HLA. O gene DQA1*0501 parece estar significativamente aumentado em homens²⁸, enquanto outros genes do sistema HLA classe II estão associados com a presença de auto-anticorpos^{29,30}.²⁹ Associações com os genes da IL-10³¹, IL-13³², TNF³³, TGFβ³⁴ e IL-1α³⁵ também parecem ser fatores relacionados à uma susceptibilidade genética.

O TGFβ estimula a deposição da matriz extracelular pela indução de células mesenquimais para reduzir os componentes da matriz³⁶. A matriz extracelular é regulada pela IL-10 através da inibição da proliferação dos fibroblastos, causando diminuição da produção de fibronectina e colágeno.

1.2 CÉLULAS NATURAL KILLER

As células NK fazem parte da resposta imune inata, sendo a primeira linha de defesa do organismo contra vírus, bactérias, tumores e microorganismos³⁷. Elas representam uma linhagem de células distintas dos monócitos, granulócitos, e de células B, dividindo o progenitor hematopoético com as células T. No entanto, elas são menos especializadas do que as células T e retêm algumas características ancestrais de plasticidade e versatilidade³⁸. Fenotipicamente, as células NK são CD3⁻CD2⁺CD16⁺CD56⁺CD14⁻CD19⁻. Ao contrário das células T e B, elas não expressam um antígeno único bem definido.

São células de baixa densidade, linfócitos granulares grandes que se desenvolvem e diferenciam principalmente na medula óssea, e depois entram na circulação³⁹. O desenvolvimento e a diferenciação também podem ocorrer no timo, baço, amígdalas e linfonodos⁴⁰.

Como resultado de seus diferentes sítios e vias de desenvolvimento, as células NK são heterogêneas no que diz respeito às suas características fenotípicas e capacidades funcionais⁴¹. Eles fazem parte de 10-15% das células mononucleares circulantes no sangue. Em resposta a estímulos pró-inflamatórios, que podem ser induzidos por uma infecção viral, as células NK migram para vários tecidos e órgãos do corpo³⁸.

A maturação das células NK ocorre na medula óssea, a partir das células progenitoras CD34⁺, na presença de citocinas, como a IL-15. No estágio inicial da maturação, estas células (ainda imaturas) não expressam receptores inibidores, embora expressem receptores ativadores e uma eficiente atividade citolítica⁴².

As células NK podem ser divididas em dois grandes subconjuntos em função do nível de expressão do CD56⁴³, bem como a presença ou ausência de CD16⁴⁴. Os dois marcadores são geralmente expressos reciprocamente nestas células. Os dois subconjuntos, CD56^{high}CD16^{low} e CD56^{low}CD16^{high}, representam 10% e 90% das células NK presentes no sangue periférico, respectivamente. As células nos dois subconjuntos diferem no seu potencial proliferativo, capacidades funcionais, e de resposta às diferentes citocinas⁴⁵.

As células do primeiro subconjunto expressam receptores de alta afinidade para a IL-2 (IL-2R), proliferam em resposta a concentrações picomolares de citocinas, produzem principalmente citocinas após a ativação e têm baixo potencial citotóxico. Eles expressam poucos genes KIR e preferencialmente migram para órgãos linfóides secundários (gânglios linfáticos e amígdalas). Nos gânglios linfáticos, a maior parte das células NK são CD56^{high} ⁴⁶. As células CD56^{low}CD16 expressam baixa afinidade para IL-2R, proliferam na resposta às concentrações nanomolares de IL-2, expressam KIR, e são altamente citotóxicos⁴⁷. Estas células NK migram para tecidos inflamados em resposta a estímulos quimiotáticos. Por força de expressão do CD16, eles também são eficientes mediadores de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC). O subconjunto CD56^{high} é menos citotóxico quando comparado com o subconjunto CD56^{low}, provavelmente como resultado da sua menor expressão de perforina⁴⁸.

Durante a resposta imune, as células NK podem provocar um ataque direto às células-alvo e interagir com as células dendríticas em tecidos periféricos inflamados⁴⁹. Para isso, elas usam dois diferentes mecanismos citolíticos. O primeiro é apoptose ativado por grânulos, no qual dependem de ação sinérgica de proteínas perforinas e granzimas⁵⁰. O segundo é apoptose induzida pela interação Fas/FasL⁵¹. Também pode ocorrer o ataque indireto às células-alvo, através de características da resposta imune adaptativa⁵².

A atividade citolítica e a produção de citocinas pelas células NK estão reguladas pela ativação ou inibição de receptores na superfície da célula. Os receptores compreendem famílias distintas: com domínios tipo lectina (CD94/NKG2A, ligante do HLA-E com função inibidora; e

NKG2D, ligante do MICA com função ativadora)⁵³ e com domínios do tipo imunoglobulina (“Killer Immunoglobulin-like Receptor” – KIR)⁵⁴. Os receptores de leucócitos com domínio tipo imunoglobulina (“leukocyte Ig-like receptors” – LILR) são também expressos em células B e T, não sendo específico das células NK.

As células NK expressam pelo menos um receptor inibidor. Em ambiente próprio, a interação da expressão das moléculas de HLA classe I com receptores inibidores da célula NK representam um importante e bem conhecido “checkpoint” no qual controla a ativação destas células⁵⁵ e evita a auto-agressão mediada pela mesma⁵⁶.

1.3 RECEPTOR KIR

Localizados no cromossomo 19q13.4⁵⁷, os receptores KIR são representantes da família das imunoglobulinas presentes na superfície celular, sendo expressos em células NK⁵⁸ e em alguns linfócitos T (NKT)⁵⁹. Até o momento foram descobertos 17 genes.

Um típico gene KIR contém nove exons⁶⁰. Os exons codificam sequências líder (exons 1 e 2), domínios extracelular (D0, D1 e D2; que correspondem aos exons 3, 4 e 5, respectivamente), cauda (exon 6, entre o domínio extracelular e a membrana), transmembrana (exon 7) e cauda intra-citoplasmática (exon 8 e 9)⁶¹.

Os receptores KIR são resultado da expressão deste sistema genético polimórfico e estão divididos em grupos funcionais inibidores e ativadores⁶². Os receptores com sinal intracelular

inibitório possuem uma cauda citoplasmática longa, por isso receberam em sua denominação a letra “L” (do inglês “long”). Estes evitam a lise da célula alvo⁶³. A denominação da letra “S” (do inglês “short”) foi descrita para os receptores com cauda curta, possuindo um sinal intracelular ativador (causam a lise da célula alvo)⁶⁴.

Os domínios extracelulares são responsáveis pelo reconhecimento da célula alvo. Alguns possuem dois domínios de imunoglobulina (denominados 2D) e outros possuem três domínios de imunoglobulina (denominados 3D)⁶⁵. Os três domínios existentes são conhecidos como D0, D1 e D2. Os receptores com dois domínios podem ser de tipos diferentes: o tipo 1 possui os domínios D1 e D2 (KIR2DS1/2/3/4/5 e KIR2DL1/2/3), devido à remoção do exon 3, e o tipo 2 possui os domínios D0 e D2 (KIR2DL4/5), por causa da deleção do exon 4⁶⁶.

1.3.1 DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA

Todos os genes KIR estão agrupados na região do complexo de receptores leucocitários (LRC)⁶⁷. Cada gene KIR tem aproximadamente 2kb de intervalo. Eles formam haplótipos que são um conjunto de genes no mesmo cromossomo e que são passados em bloco de geração a geração. A ordem dos genes nesta região tem sido deduzida a partir do seqüenciamento dos haplótipos KIR, bem como de análises de segregação⁶⁸. Os haplótipos KIR variam em seres humanos no que diz respeito ao número de genes ativadores e inibidores e às suas formas alélicas⁶⁹. Por causa destas variações, um grande número de haplótipos KIR foi identificado⁷⁰, tendo sido classificados em haplotipos A e B⁷¹.

O haplótipo A possui nove genes KIR⁷², e somente um é ativador (2DS4). Esse gene, que freqüentemente não é expresso, apresenta uma deleção de 22 pares de bases no exon 5. Cerca de 80% dos caucasianos têm essa supressão⁷³. Geralmente este haplótipo contém cinco genes inibitórios. Em contraste, os haplótipos B⁷⁴ possuem uma alta diversidade de genes, tanto ativadores como inibidores (Figura 1). A freqüência destes dois haplótipos varia significativamente em diferentes populações⁷⁵.

Quatro genes KIR estão presentes em todos (ou quase todos) os haplótipos: 3DL3, 3DP1, 2DL4 e 3DL2⁷⁶. Eles são chamados de genes estruturais ou de “moldura”, pois sugerem certa estabilidade em relação à recombinação genética⁷⁷.

Na região do centrômero encontram-se os genes KIR 2DL3, 2DP1, 2DL1, 2DS2, 2DL2, e 2DS3. Já os genes KIR 3DL1, 2DS4, 2DL5, 2DS5, 3DS1 e 2DS1 localizam-se na região do telômero. Os genes 3DP1 e 2DL4 encontram-se entre as duas regiões, o KIR3DL3 encontra-se ao lado do centrômero e o KIR 3DL2 localiza-se ao lado do telômero⁷⁸.

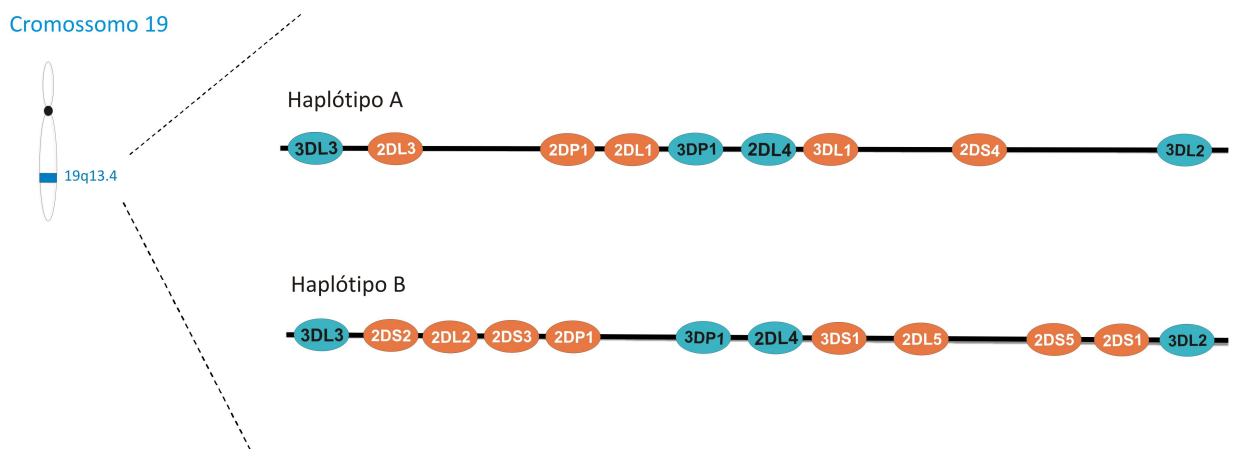


Figura 1: Haplótipos dos genes KIR.

1.3.2 LIGANTES DOS RECEPTORES KIR

As células NK reconhecem uma célula estranha através da ligação dos receptores KIR com o antígeno leucocitário humano (Human Leukocyte Antigen - HLA) de classe I⁷⁹. O receptor KIR liga-se no topo da α -hélice e nas regiões expostas do peptídeo no HLA⁸⁰. A especificidade desta interação é definida por um dimorfismo do HLA-Cw na posição 80⁸¹ e um dimorfismo correspondente na posição 44 do receptor KIR⁸².

O dimorfismo nas posições 77 e 80 da seqüência do aminoácido define 2 alotipos do HLA-Cw distintos serologicamente⁸¹: O grupo 1 (C1) tem um resíduo de serina na posição 77 (Ser77) e aspargina na posição 80 (Asn80), e o grupo 2 (C2) tem a presença de um resíduo de aspargina na posição 77 (Asn77) e lisina na posição 80 (Lys80)⁸³. Estes dois grupos diferenciaram-se durante a evolução⁸⁴. Na primeira fase da evolução humana formaram-se ligantes do grupo C1⁸⁵. Na segunda fase (depois da separação de seus ancestrais, orangotango e chimpanzé) ocorreu uma mutação do Asn80 para Lys80 na molécula de HLA do grupo C1, produzindo o primeiro ligante do grupo C2⁸⁴. Desta maneira, Lys80 é uma característica específica do HLA-C, enquanto Asn80 está também presente no HLA-B e outras moléculas do HLA classe I.

Os receptores KIR também podem ser diferenciados em dois grupos de ligantes. O primeiro grupo possui um resíduo de lisina na posição 44 do domínio D1, e corresponde aos receptores KIR2DS2, KIR2DL2 e KIR2DL3⁸⁶. Estes reconhecem o C1 do HLA-Cw. O segundo grupo

(KIR2DS1 e KIR2DL1) possui uma metionina nesta posição, reconhecendo o C2 (Figura 2). KIR3DL1/KIR3DS1 interagem com o HLA-Bw4 (que difere do Bw6 devido a um polimorfismo na posição 77 e 80)^{87,88}.⁸⁸O Bw4 com o aminoácido isoleucina (Ile) na posição 80 gera uma forte inibição através do KIR3DL1⁸⁹.

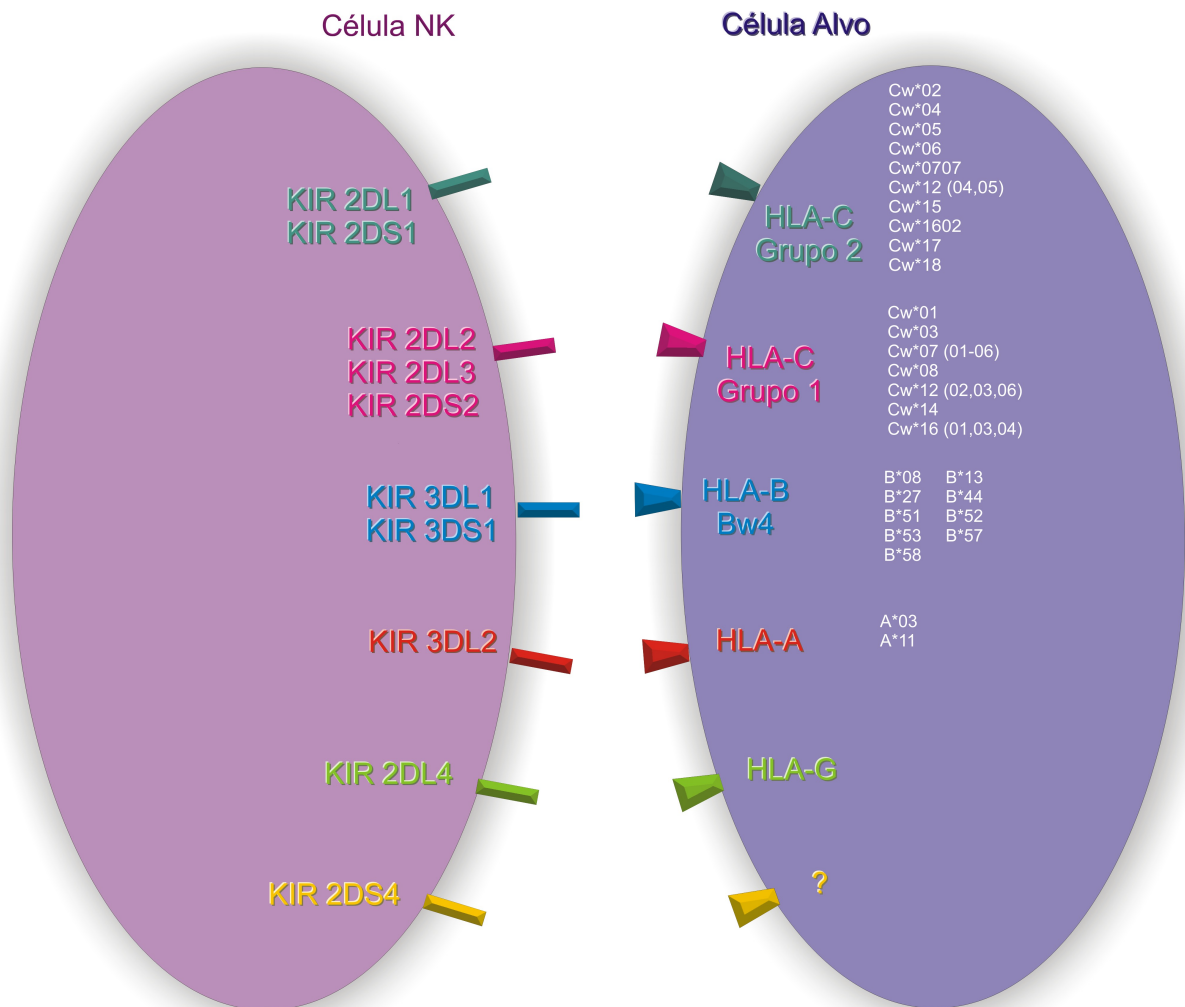


Figura 2: Receptores KIR e seus respectivos ligantes.

A interação KIR-HLA é diferenciada pela intensidade da ligação e afinidade entre os receptores e seus respectivos ligantes. Os receptores se ligam fracamente aos antígenos do grupo C1 e fortemente aos do grupo C2 (que é mais recente)⁹⁰. O receptor inibidor possui mais afinidade do que o receptor ativador. A relevância biológica da baixa afinidade não está totalmente elucidada, talvez exista para atenuar os receptores inibitórios em situações que a inibição pode não ser vantajosa ou evitar a agressão das células NK contra as outras células do organismo⁹¹.

1.3.3 MECANISMO DE AÇÃO

Os receptores das células NK com cadeias citoplasmáticas longas transmitem sinais inibidores⁶³. Geralmente estes receptores possuem 2 motivos inibidores do imunoreceptor tirosina (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif – ITIM), com exceção do KIR2DL4, que apresenta somente 1 ITIM na sua cauda citoplasmática e um aminoácido (arginina) na região da transmembrana (que facilita a interação com a DAP-12), motivo pelo qual ele pode transmitir sinais inibitórios, estimulatórios ou os dois tipos⁹².

Quando há o reconhecimento dos seus ligantes, os resíduos de tirosina nos ITIMs tornam-se fosforilados e associam-se as moléculas SHP-1 e 2 (Src-homology domain-bearing tyrosine phosphatase)⁹³. Estas fosfatases desfosforilam muitos substratos envolvidos na cascata de ativação das células NK⁹⁴, inibindo a célula da atividade citolítica⁹⁵ e ativando a secreção de citocinas⁹⁶.

Os receptores com a cadeia citoplasmática curta são estimulatórios. Para estes receptores faltam ITIMs, entretanto eles possuem um aminoácido modificado positivamente (lisina) na região da transmembrana. Através desse aminoácido eles associam-se não-covalentemente com um dímero de uma proteína adaptadora, a DAP-12⁹⁷. Cada DAP-12 possui motivos ativadores do imunoreceptor tirosina (Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif – ITAM) na sua cadeia citoplasmática⁹⁸. Os resíduos de tirosina nos ITAMs são fosforilados e recrutam várias tirosina quinases (ZAP-70/Syk), transmitindo o sinal ativador para a célula NK matar a célula alvo e secretar citocinas⁹⁹.

1.4 ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS *NK* NAS DOENÇAS AUTO-IMUNES

As células NK podem expressar o receptor KIR para qual não está presente o ligante específico. Isso ocorre porque o loco KIR localiza-se no cromossomo 19⁵⁷, enquanto os genes do HLA encontram-se no cromossomo 6¹⁰⁰, portanto os dois locos segregam independentemente.

Quando a expressão dos antígenos HLA de classe I está diminuída ou deficiente, como por exemplo, durante uma infecção viral ou transformação tumoral, o sinal inibitório é enfraquecido e a célula NK é ativada, subseqüentemente induzindo à morte da célula alvo¹⁰¹.

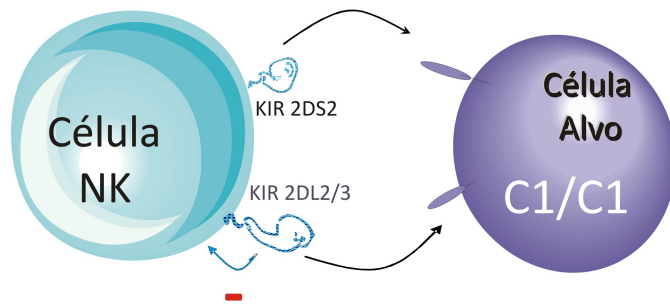
As células NK estão sempre prontas para matar. Elas fazem um processo contínuo de vigilância imunológica, averiguando se todas as células estão expressando corretamente o HLA de classe I³⁷. Caso positivo, os receptores inibidores farão o seu papel e as células alvo serão preservadas (o receptor inibidor suprime os sinais de ativação intracelular)¹⁰². Porém, na

superfície da célula NK existem mais de quatro receptores KIR, sendo eles ativadores e inibidores⁶².

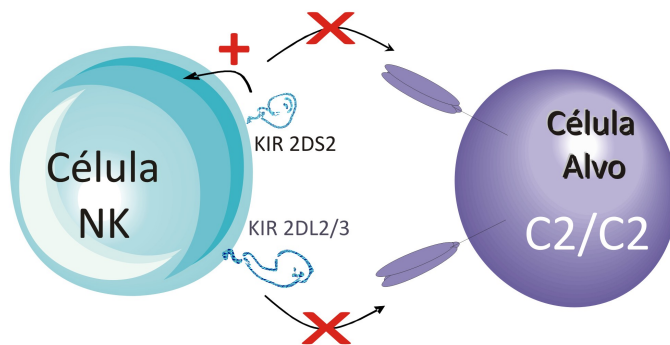
Quando um organismo expressa os receptores 2DS2 e 2DL2/3 (que reconhecem ligantes C1) nas células NK, e ao mesmo tempo expressa antígenos homocigotos do grupo C2, ocorre ativação da célula, causando a auto-agressão (Figura 3). O receptor ativador, ao não reconhecer nenhum dos seus ligantes, gera sinal para a célula matar. O receptor inibidor não ativa sinal, pois também não reconhece os ligantes. O mesmo ocorre em um organismo com presença dos receptores 2DS1 e 2DL2 e homocigoto para o grupo C1⁵⁶.

Em contrapartida, quando há presença de heterocigose para os grupos C1 e C2, a célula reconhece a outra como própria. Há dois casos que podem acontecer. No primeiro, o receptor ativador reconhece o seu ligante (não gerando sinal) e o receptor inibidor não reconhece o ligante (não gera sinal). Neste caso, não houve sinal algum de ativação, pois o receptor responsável reconheceu a célula como própria (mesmo o receptor inibidor não reconhecendo). No segundo caso, o receptor ativador não reconhece o ligante (gerando sinal para a célula matar) e o receptor inibidor reconhece o ligante (gerando sinal para a célula NÃO matar). Neste caso, o que acontece é que o sinal inibitório predomina sobre o sinal ativador, anulando o seu efeito¹⁰³.

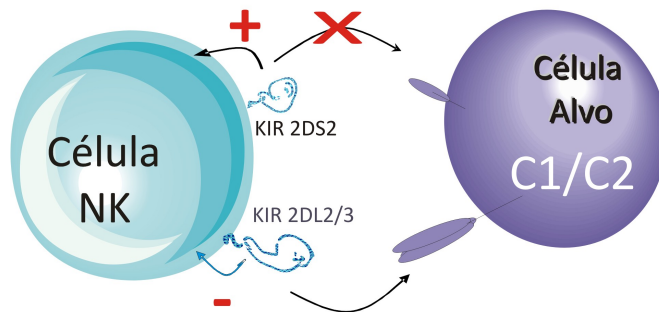
Figura 3: Ativação e inibição das células NK através do reconhecimento dos seus receptores com os respectivos ligantes (abaixo).



INIBIÇÃO



ATIVAÇÃO




INIBIÇÃO

Legenda:



+ Sinal ATIVADOR. Ativa produção de perforinas

- Sinal INIBIDOR. Inibe produção de perforinas

 Ligante HLA-C do grupo 1 (C1)

 Ligante HLA-C do grupo 2 (C2)

1.5 O PAPEL DAS CÉLULAS NK NA ESCLEROSE SISTÊMICA

Agentes infecciosos podem ser agentes responsáveis por doenças auto-imunes¹⁰⁴, incluindo a ES¹⁰⁵. O retrovírus¹⁰⁶ e o citomegalovírus^{107,108, 107} têm sido considerados como agentes etiológicos causadores de algumas doenças.

A proteína viral é processada pela via de processamento de antígeno e peptídeos virais são apresentados na superfície da célula infectada pelo HLA classe I. Este peptídeo alterado apresentado pode resultar na ativação das células NK¹⁰⁹. Os receptores KIR também são sensíveis à baixa expressão de HLA classe I da superfície celular¹¹⁰, um mecanismo usado por alguns vírus para escapar do reconhecimento das células T citotóxicas. As células infectadas virais produzem IFN, uma citocina potente em termos de ativação da função efetora das células NK, bem como da citotoxicidade¹¹¹.

A estimulação das células NK com IFN α e IFN β favorece o desenvolvimento da função efetora citotóxica¹¹², enquanto a estimulação com IL-12 favorece a produção de citocinas. A principal citocina produzida pela NK é a IFN γ , a qual ativa os macrófagos. A secreção de IL-12 pelos macrófagos e a secreção de IFN γ pelas células NK criam um sistema de retroalimentação positiva, no qual aumenta a ativação dos dois tipos de células no tecido infectado. Os macrófagos produzem IL-15, que aumenta a atividade citolítica da célula NK, conseqüentemente, a célula NK ativa a produção de IFN gama. Os macrófagos também produzem IL-12, que estimulam IFN- α , - β e - γ , ativando o potencial citotóxico da célula NK¹¹³.

Nos estágios iniciais da infecção, as células NK são as principais produtoras de IFN γ , ativando os macrófagos a secretarem citocinas e iniciando a resposta das células T¹⁶. Quando as células T entram no sítio de infecção, elas se tornam as principais fontes de IFN γ e de citotoxicidade¹¹⁴. Com a chegada das células T, a função das células NK é desativada através pela ação da IL-10, uma citocina inibidora produzida pela célula T citotxica¹¹⁵.

Os Linfócitos ativados secretam TGF β , que causa dano das células de vasos endoteliais¹¹⁶. O TGF β causa um aumento do CTGF, que induz o aumento da produção de matriz extracelular¹¹⁷.

A disfunção dos fibroblastos é manifestada como fibrose da pele e nos órgãos internos, como resultado do aumento da síntese e deposição de proteínas da matriz extracelular^{118, 119}.

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

- ¹ F. C. Arnett, *HLA and autoimmunity in scleroderma (systemic sclerosis)*. **Int Rev Immunol** 12 (2-4), 107 (1995).
- ² H. Chiffot, B. Fautrel, C. Sordet, E. Chatelus, and J. Sibilia, *Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review*. **Semin Arthritis Rheum** 37 (4), 223 (2008).
- ³ R. Sgonc, M. S. Gruschwitz, G. Boeck, N. Sepp, J. Gruber, and G. Wick, *Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95*. **Arthritis Rheum** 43 (11), 2550 (2000).
- ⁴ J. A. Varga and M. Trojanowska, *Fibrosis in systemic sclerosis*. **Rheum Dis Clin North Am** 34 (1), 115 (2008).
- ⁵ E. C. LeRoy, C. Black, R. Fleischmajer, S. Jablonska, T. Krieg, T. A. Medsger, Jr., N. Rowell, and F. Wollheim, *Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis*. **J Rheumatol** 15 (2), 202 (1988).
- ⁶ J. S. Perlish and R. Fleischmajer, *Collagen synthesis by scleroderma fibroblasts in culture: a reply*. **Arthritis Rheum** 20 (7), 1440 (1977).
- ⁷ E. C. LeRoy, *Systemic sclerosis. A vascular perspective*. **Rheum Dis Clin North Am** 22 (4), 675 (1996).
- ⁸ S. Sato, M. Fujimoto, M. Hasegawa, K. Takehara, and T. F. Tedder, *Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis*. **Mol Immunol** 41 (12), 1123 (2004).
- ⁹ S. A. Eming, T. Krieg, and J. M. Davidson, *Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms*. **J Invest Dermatol** 127 (3), 514 (2007).
- ¹⁰ R. Fleischmajer, J. S. Perlish, and J. R. Reeves, *Cellular infiltrates in scleroderma skin*. **Arthritis Rheum** 20 (4), 975 (1977).

- 11 O. Ishikawa and H. Ishikawa, *Macrophage infiltration in the skin of patients with systemic sclerosis*. **J Rheumatol** 19 (8), 1202 (1992).
- 12 R. F. Holcombe, B. A. Baethge, R. E. Wolf, K. W. Betzing, and R. M. Stewart, *Natural killer cells and gamma delta T cells in scleroderma: relationship to disease duration and anti-Scl-70 antibodies*. **Ann Rheum Dis** 54 (1), 69 (1995).
- 13 B. Eckes, N. Hunzelmann, P. Moinzadeh, and T. Krieg, *Scleroderma -- news to tell*. **Arch Dermatol Res** 299 (3), 139 (2007).
- 14 R. Hata, J. Akai, A. Kimura, O. Ishikawa, M. Kuwana, and H. Shinkai, *Association of functional microsatellites in the human type I collagen alpha2 chain (COL1A2) gene with systemic sclerosis*. **Biochem Biophys Res Commun** 272 (1), 36 (2000).
- 15 T. Krieg, D. Abraham, and R. Lafyatis, *Fibrosis in connective tissue disease: the role of the myofibroblast and fibroblast-epithelial cell interactions*. **Arthritis Res Ther** 9 Suppl 2, S4 (2007).
- 16 B. M. Kraling, G. G. Maul, and S. A. Jimenez, *Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages*. **Pathobiology** 63 (1), 48 (1995).
- 17 M. Hasegawa, S. Sato, and K. Takehara, *Augmented production of transforming growth factor-beta by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis*. **Arch Dermatol Res** 296 (2), 89 (2004).
- 18 G. R. Grotendorst, *Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts*. **Cytokine Growth Factor Rev** 8 (3), 171 (1997).
- 19 V. Salmon-Ehr, H. Serpier, B. Nawrocki, P. Gillery, C. Clavel, B. Kalis, P. Birembaut, and F. X. Maquart, *Expression of interleukin-4 in scleroderma skin specimens and scleroderma fibroblast cultures. Potential role in fibrosis*. **Arch Dermatol** 132 (7), 802 (1996).
- 20 L. Mouthon, P. Garcia De La Pena-Lefebvre, Y. Chanseaud, M. C. Tamby, M. C. Boissier, and L. Guillevin, *[Pathogenesis of systemic scleroderma: immunological aspects]*. **Ann Med Interne (Paris)** 153 (3), 167 (2002).

- 21 T. E. Quan, S. Cowper, S. P. Wu, L. K. Bockenstedt, and R. Bucala, *Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood*. **Int J Biochem Cell Biol** 36 (4), 598 (2004).
- 22 F. K. Tan, *Systemic sclerosis: the susceptible host (genetics and environment)*. **Rheum Dis Clin North Am** 29 (2), 211 (2003).
- 23 C. G. Parks, K. Conrad, and G. S. Cooper, *Occupational exposure to crystalline silica and autoimmune disease*. **Environ Health Perspect** 107 Suppl 5, 793 (1999).
- 24 U. F. Haustein and U. Andereg, *Silica induced scleroderma--clinical and experimental aspects*. **J Rheumatol** 25 (10), 1917 (1998).
- 25 F. K. Tan and F. C. Arnett, *Genetic factors in the etiology of systemic sclerosis and Raynaud phenomenon*. **Curr Opin Rheumatol** 12 (6), 511 (2000).
- 26 F. C. Arnett, M. Cho, S. Chatterjee, M. B. Aguilar, J. D. Reveille, and M. D. Mayes, *Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts*. **Arthritis Rheum** 44 (6), 1359 (2001).
- 27 X. Zhou, F. K. Tan, N. Wang, M. Xiong, S. Maghidman, J. D. Reveille, D. M. Milewicz, R. Chakraborty, and F. C. Arnett, *Genome-wide association study for regions of systemic sclerosis susceptibility in a Choctaw Indian population with high disease prevalence*. **Arthritis Rheum** 48 (9), 2585 (2003).
- 28 N. C. Lambert, O. Distler, U. Muller-Ladner, T. S. Tylee, D. E. Furst, and J. L. Nelson, *HLA-DQA1*0501 is associated with diffuse systemic sclerosis in Caucasian men*. **Arthritis Rheum** 43 (9), 2005 (2000).
- 29 J. D. Reveille, D. Owerbach, R. Goldstein, R. Moreda, R. A. Isern, and F. C. Arnett, *Association of polar amino acids at position 26 of the HLA-DQB1 first domain with the anticentromere autoantibody response in systemic sclerosis (scleroderma)*. **J Clin Invest** 89 (4), 1208 (1992).
- 30 J. D. Reveille, J. Brady, M. MacLeod-St Clair, and E. Durban, *HLA-DPB1 alleles and autoantibody subsets in systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome and progressive systemic sclerosis: a question of disease relevance*. **Tissue Antigens** 40 (1), 45 (1992).

- ³¹ L. L. Hudson, K. M. Rocca, M. Kuwana, and J. P. Pandey, *Interleukin-10 genotypes are associated with systemic sclerosis and influence disease-associated autoimmune responses*. **Genes Immun** 6 (3), 274 (2005).
- ³² B. Granel, C. Chevillard, Y. Allanore, V. Arnaud, S. Cabantous, S. Marquet, P. J. Weiller, J. M. Durand, J. R. Harle, C. Grange, Y. Frances, P. Berbis, J. Gaudart, P. de Micco, A. Kahan, and A. Dessein, *Evaluation of interleukin 13 polymorphisms in systemic sclerosis*. **Immunogenetics** 58 (8), 693 (2006).
- ³³ H. Sato, A. L. Lagan, C. Alexopoulou, D. A. Vassilakis, T. Ahmad, P. Pantelidis, S. Veeraraghavan, E. Renzoni, C. Denton, C. Black, A. U. Wells, R. M. du Bois, and K. I. Welsh, *The TNF-863A allele strongly associates with anticentromere antibody positivity in scleroderma*. **Arthritis Rheum** 50 (2), 558 (2004).
- ³⁴ A. Crilly, J. Hamilton, C. J. Clark, A. Jardine, and R. Madhok, *Analysis of transforming growth factor beta1 gene polymorphisms in patients with systemic sclerosis*. **Ann Rheum Dis** 61 (8), 678 (2002).
- ³⁵ B. Huttyrova, J. Lukac, V. Bosak, M. Buc, R. du Bois, and M. Petrek, *Interleukin 1alpha single-nucleotide polymorphism associated with systemic sclerosis*. **J Rheumatol** 31 (1), 81 (2004).
- ³⁶ X. Zhou, F. K. Tan, D. N. Stivers, and F. C. Arnett, *Microsatellites and intragenic polymorphisms of transforming growth factor beta and platelet-derived growth factor and their receptor genes in Native Americans with systemic sclerosis (scleroderma): a preliminary analysis showing no genetic association*. **Arthritis Rheum** 43 (5), 1068 (2000).
- ³⁷ M. Jobim and L. F. Jobim, *Natural killer cells and immune surveillance*. **J Pediatr (Rio J)** 84 (4 Suppl), S58 (2008).
- ³⁸ J. Yu, J. M. Venstrom, X. R. Liu, R. O'Reilly, J. Pring, R. S. Hasan, and K. C. Hsu, *Breaking tolerance to self, circulating natural killer cells expressing inhibitory KIR for non-self HLA exhibit effector function following T-cell depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation*. **Blood** (2009).

- 39 A. G. Freud and M. A. Caligiuri, *Human natural killer cell development*. **Immunol Rev** 214, 56 (2006).
- 40 J. P. Di Santo and C. A. Vosshenrich, *Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development*. **Immunol Rev** 214, 35 (2006).
- 41 M. A. Cooper, J. M. Elliott, P. A. Keyel, L. Yang, J. A. Carrero, and W. M. Yokoyama, *Cytokine-induced memory-like natural killer cells*. **Proc Natl Acad Sci U S A** (2009).
- 42 S. S. Farag, J. B. VanDeusen, T. A. Fehniger, and M. A. Caligiuri, *Biology and clinical impact of human natural killer cells*. **Int J Hematol** 78 (1), 7 (2003).
- 43 M. A. Cooper, T. A. Fehniger, S. C. Turner, K. S. Chen, B. A. Ghaheri, T. Ghayur, W. E. Carson, and M. A. Caligiuri, *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset*. **Blood** 97 (10), 3146 (2001).
- 44 D. B. Keskin, D. S. Allan, B. Rybalov, M. M. Andzelm, J. N. Stern, H. D. Kopcow, L. A. Koopman, and J. L. Strominger, *TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 104 (9), 3378 (2007).
- 45 R. Jacobs, G. Hintzen, A. Kemper, K. Beul, S. Kempf, G. Behrens, K. W. Sykora, and R. E. Schmidt, *CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells*. **Eur J Immunol** 31 (10), 3121 (2001).
- 46 D. Schepis, I. Gunnarsson, M. L. Eloranta, J. Lampa, S. H. Jacobson, K. Karre, and L. Berg, *Increased proportion of CD56bright natural killer cells in active and inactive systemic lupus erythematosus*. **Immunology** 126 (1), 140 (2009).
- 47 E. Takahashi, N. Kuranaga, K. Satoh, Y. Habu, N. Shinomiya, T. Asano, S. Seki, and M. Hayakawa, *Induction of CD16+ CD56bright NK cells with antitumour cytotoxicity not only from CD16- CD56bright NK Cells but also from CD16- CD56dim NK cells*. **Scand J Immunol** 65 (2), 126 (2007).

- 48 T. A. Fehniger, M. A. Cooper, G. J. Nuovo, M. Cella, F. Facchetti, M. Colonna, and M. A. Caligiuri, *CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity*. **Blood** 101 (8), 3052 (2003).
- 49 A. L. Zhang, P. Colmenero, U. Purath, C. Teixeira de Matos, W. Hueber, L. Klareskog, I. H. Tarner, E. G. Engleman, and K. Soderstrom, *Natural killer cells trigger differentiation of monocytes into dendritic cells*. **Blood** 110 (7), 2484 (2007).
- 50 J. A. Trapani and M. J. Smyth, *Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway*. **Nat Rev Immunol** 2 (10), 735 (2002).
- 51 H. Arase, N. Arase, and T. Saito, *Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells*. **J Exp Med** 181 (3), 1235 (1995).
- 52 J. C. Sun, J. N. Beilke, and L. L. Lanier, *Adaptive immune features of natural killer cells*. **Nature** 457 (7229), 557 (2009).
- 53 S. Bauer, V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and T. Spies, *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. **Science** 285 (5428), 727 (1999).
- 54 C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, R. Biassoni, and A. Moretta, *Receptors for HLA class I molecules in human NK cells*. **Semin Immunol** 7 (2), 67 (1995).
- 55 L. Moretta, C. Bottino, D. Pende, M. Vitale, M. C. Mingari, and A. Moretta, *Different checkpoints in human NK-cell activation*. **Trends Immunol** 25 (12), 670 (2004).
- 56 R. J. Boyton and D. M. Altmann, *Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease*. **Clin Exp Immunol** 149 (1), 1 (2007).
- 57 Y. Suto, K. Maenaka, T. Yabe, M. Hirai, K. Tokunaga, K. Tadok, and T. Juji, *Chromosomal localization of the human natural killer cell class I receptor family genes to 19q13.4 by fluorescence in situ hybridization*. **Genomics** 35 (1), 270 (1996).
- 58 A. Moretta, G. Tambussi, C. Bottino, G. Tripodi, A. Merli, E. Ciccone, G. Pantaleo, and L. Moretta, *A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3- CD16+ natural*

- killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. J Exp Med* 171 (3), 695 (1990).
- 59 L. Van Kaer, *NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. Curr Opin Immunol* 19 (3), 354 (2007).
- 60 A. M. Martin, E. M. Freitas, C. S. Witt, and F. T. Christiansen, *The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. Immunogenetics* 51 (4-5), 268 (2000).
- 61 M. J. Wilson, M. Torkar, A. Haude, S. Milne, T. Jones, D. Sheer, S. Beck, and J. Trowsdale, *Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (9), 4778 (2000).
- 62 A. Moretta, S. Sivori, M. Vitale, D. Pende, L. Morelli, R. Augugliaro, C. Bottino, and L. Moretta, *Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. J Exp Med* 182 (3), 875 (1995).
- 63 Q. R. Fan, L. Mosyak, C. C. Winter, N. Wagtmann, E. O. Long, and D. C. Wiley, *Structure of the inhibitory receptor for human natural killer cells resembles haematopoietic receptors. Nature* 389 (6646), 96 (1997).
- 64 R. Biassoni, C. Cantoni, M. Falco, S. Verdiani, C. Bottino, M. Vitale, R. Conte, A. Poggi, A. Moretta, and L. Moretta, *The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. J Exp Med* 183 (2), 645 (1996).
- 65 S. G. Marsh, P. Parham, B. Dupont, D. E. Geraghty, J. Trowsdale, D. Middleton, C. Vilches, M. Carrington, C. Witt, L. A. Guethlein, H. Shilling, C. A. Garcia, K. C. Hsu, and H. Wain, *Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. Eur J Immunogenet* 30 (3), 229 (2003).
- 66 N. Wagtmann, R. Biassoni, C. Cantoni, S. Verdiani, M. S. Malnati, M. Vitale, C. Bottino, L. Moretta, A. Moretta, and E. O. Long, *Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal*

- immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. **Immunity** 2 (5), 439 (1995).*
- 67 P. Parham, *Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. **Mol Immunol** 42 (4), 459 (2005).*
- 68 H. Wende, M. Colonna, A. Ziegler, and A. Volz, *Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4. **Mamm Genome** 10 (2), 154 (1999).*
- 69 D. Middleton, A. Meenagh, J. Moscoso, and A. Arnaiz-Villena, *Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents. **Tissue Antigens** 71 (2), 105 (2008); R. Rajalingam, Z. Du, A. Meenagh, L. Luo, V. J. Kavitha, R. Pavithra-Arulvani, A. Vidhyalakshmi, S. K. Sharma, I. Balazs, E. F. Reed, R. M. Pitchappan, and D. Middleton, *Distinct diversity of KIR genes in three southern Indian populations: comparison with world populations revealed a link between KIR gene content and pre-historic human migrations. **Immunogenetics** 60 (5), 207 (2008).**
- 70 M. P. Martin, R. M. Single, M. J. Wilson, J. Trowsdale, and M. Carrington, *KIR haplotypes defined by segregation analysis in 59 Centre d'Etude Polymorphisme Humain (CEPH) families. **Immunogenetics** 60 (12), 767 (2008).*
- 71 A. M. Martin, J. K. Kulski, S. Gaudieri, C. S. Witt, E. M. Freitas, J. Trowsdale, and F. T. Christiansen, *Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. **Gene** 335, 121 (2004).*
- 72 K. C. Hsu, X. R. Liu, A. Selvakumar, E. Mickelson, R. J. O'Reilly, and B. Dupont, *Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. **J Immunol** 169 (9), 5118 (2002).*
- 73 L. D. Maxwell, A. Wallace, D. Middleton, and M. D. Curran, *A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. **Tissue Antigens** 60 (3), 254 (2002).*

- 74 M. Uhrberg, P. Parham, and P. Wernet, *Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes*. **Immunogenetics** 54 (4), 221 (2002).
- 75 C. S. Witt, C. Dewing, D. C. Sayer, M. Uhrberg, P. Parham, and F. T. Christiansen, *Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination*. **Transplantation** 68 (11), 1784 (1999).
- 76 R. Rajalingam, M. Hong, E. J. Adams, B. P. Shum, L. A. Guethlein, and P. Parham, *Short KIR haplotypes in pygmy chimpanzee (Bonobo) resemble the conserved framework of diverse human KIR haplotypes*. **J Exp Med** 193 (1), 135 (2001).
- 77 M. P. Martin, A. Bashirova, J. Traherne, J. Trowsdale, and M. Carrington, *Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over*. **J Immunol** 171 (5), 2192 (2003).
- 78 M. J. Wilson, M. Torkar, and J. Trowsdale, *Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene*. **Tissue Antigens** 49 (6), 574 (1997).
- 79 Q. R. Fan, D. N. Garboczi, C. C. Winter, N. Wagtmann, E. O. Long, and D. C. Wiley, *Direct binding of a soluble natural killer cell inhibitory receptor to a soluble human leukocyte antigen-Cw4 class I major histocompatibility complex molecule*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 93 (14), 7178 (1996).
- 80 C. A. Stewart, F. Laugier-Anfossi, F. Vely, X. Saulquin, J. Riedmuller, A. Tisserant, L. Gauthier, F. Romagne, G. Ferracci, F. A. Arosa, A. Moretta, P. D. Sun, S. Ugolini, and E. Vivier, *Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102 (37), 13224 (2005).
- 81 C. C. Winter and E. O. Long, *A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes*. **J Immunol** 158 (9), 4026 (1997).
- 82 L. A. Guethlein, L. R. Flodin, E. J. Adams, and P. Parham, *NK cell receptors of the orangutan (Pongo pygmaeus): a pivotal species for tracking the coevolution of killer cell Ig-like receptors with MHC-C*. **J Immunol** 169 (1), 220 (2002).

- 83 R. Biassoni, M. Falco, A. Cambiaggi, P. Costa, S. Verdiani, D. Pende, R. Conte, C. Di Donato, P. Parham, and L. Moretta, *Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by "group 2" or "group 1" NK clones.* **J Exp Med** 182 (2), 605 (1995).
- 84 L. A. Guethlein, A. M. Older Aguilar, L. Abi-Rached, and P. Parham, *Evolution of killer cell Ig-like receptor (KIR) genes: definition of an orangutan KIR haplotype reveals expansion of lineage III KIR associated with the emergence of MHC-C.* **J Immunol** 179 (1), 491 (2007).
- 85 L. A. Guethlein, L. Abi-Rached, J. A. Hammond, and P. Parham, *The expanded cattle KIR genes are orthologous to the conserved single-copy KIR3DX1 gene of primates.* **Immunogenetics** 59 (6), 517 (2007).
- 86 J. Kim, Y. J. Chwae, M. Y. Kim, I. H. Choi, J. H. Park, and S. J. Kim, *Molecular basis of HLA-C recognition by p58 natural killer cell inhibitory receptors.* **J Immunol** 159 (8), 3875 (1997).
- 87 M. Peruzzi, N. Wagtmann, and E. O. Long, *A p70 killer cell inhibitory receptor specific for several HLA-B allotypes discriminates among peptides bound to HLA-B*2705.* **J Exp Med** 184 (4), 1585 (1996).
- 88 W. H. Carr, M. J. Pando, and P. Parham, *KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand.* **J Immunol** 175 (8), 5222 (2005).
- 89 L. D. Barber, L. Percival, N. M. Valiante, L. Chen, C. Lee, J. E. Gumperz, J. H. Phillips, L. L. Lanier, J. C. Bigge, R. B. Parekh, and P. Parham, *The inter-locus recombinant HLA-B*4601 has high selectivity in peptide binding and functions characteristic of HLA-C.* **J Exp Med** 184 (2), 735 (1996).
- 90 N. M. Valiante, M. Uhrberg, H. G. Shilling, K. Lienert-Weidenbach, K. L. Arnett, A. D'Andrea, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and P. Parham, *Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors.* **Immunity** 7 (6), 739 (1997).

- 91 J. P. Di Santo, *Natural killer cell developmental pathways: a question of balance*. **Annu Rev Immunol** 24, 257 (2006).
- 92 D. W. McVicar and D. N. Burshtyn, *Intracellular signaling by the killer immunoglobulin-like receptors and Ly49*. **Sci STKE** 2001 (75), RE1 (2001).
- 93 K. S. Campbell, M. Dessing, M. Lopez-Botet, M. Cella, and M. Colonna, *Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C*. **J Exp Med** 184 (1), 93 (1996).
- 94 C. C. Stebbins, C. Watzl, D. D. Billadeau, P. J. Leibson, D. N. Burshtyn, and E. O. Long, *Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity*. **Mol Cell Biol** 23 (17), 6291 (2003).
- 95 S. Yusa, T. L. Catina, and K. S. Campbell, *KIR2DL5 can inhibit human NK cell activation via recruitment of Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP-2)*. **J Immunol** 172 (12), 7385 (2004).
- 96 D. N. Burshtyn, A. M. Scharenberg, N. Wagtmann, S. Rajagopalan, K. Berrada, T. Yi, J. P. Kinet, and E. O. Long, *Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor*. **Immunity** 4 (1), 77 (1996).
- 97 L. L. Lanier, B. C. Corliss, J. Wu, C. Leong, and J. H. Phillips, *Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells*. **Nature** 391 (6668), 703 (1998).
- 98 L. L. Lanier, B. Corliss, J. Wu, and J. H. Phillips, *Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors*. **Immunity** 8 (6), 693 (1998).
- 99 L. L. Lanier, *DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity*. **Immunol Rev** 227 (1), 150 (2009).
- 100 B. H. Koller, D. E. Geraghty, R. DeMars, L. Duvick, S. S. Rich, and H. T. Orr, *Chromosomal organization of the human major histocompatibility complex class I gene family*. **J Exp Med** 169 (2), 469 (1989).

- 101 P. Arrenberg, R. Halder, and V. Kumar, *Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens*. **J Cell Physiol** 218 (2), 246 (2009).
- 102 M. Draghi, N. Yawata, M. Gleimer, M. Yawata, N. M. Valiante, and P. Parham, *Single-cell analysis of the human NK cell response to missing self and its inhibition by HLA class I*. **Blood** 105 (5), 2028 (2005).
- 103 P. Parham, *Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response*. **Immunol Lett** 92 (1-2), 11 (2004).
- 104 M. S. Malnati, P. Lusso, E. Ciccone, A. Moretta, L. Moretta, and E. O. Long, *Recognition of virus-infected cells by natural killer cell clones is controlled by polymorphic target cell elements*. **J Exp Med** 178 (3), 961 (1993).
- 105 T. Ohtsuka and S. Yamazaki, *Increased prevalence of human parvovirus B19 DNA in systemic sclerosis skin*. **Br J Dermatol** 150 (6), 1091 (2004).
- 106 S. A. Jimenez and O. Batuman, *Immunopathogenesis of systemic sclerosis: possible role of retroviruses*. **Autoimmunity** 16 (3), 225 (1993).
- 107 D. Cosman, J. Mullberg, C. L. Sutherland, W. Chin, R. Armitage, W. Fanslow, M. Kubin, and N. J. Chalupny, *ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor*. **Immunity** 14 (2), 123 (2001).
- 108 C. Lunardi, C. Bason, R. Navone, E. Millo, G. Damonte, R. Corrocher, and A. Puccetti, *Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells*. **Nat Med** 6 (10), 1183 (2000).
- 109 H. Arase, E. S. Mocarski, A. E. Campbell, A. B. Hill, and L. L. Lanier, *Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors*. **Science** 296 (5571), 1323 (2002).
- 110 C. A. Biron, *Activation and function of natural killer cell responses during viral infections*. **Curr Opin Immunol** 9 (1), 24 (1997).

- 111 A. Moretta, R. Biassoni, C. Bottino, M. C. Mingari, and L. Moretta, *Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity*. **Immunol Today** 21 (5), 228 (2000).
- 112 M. Provinciali, M. Muzzioli, and N. Fabris, *Thyroxine-dependent modulation of natural killer activity*. **J Exp Pathol** 3 (4), 617 (1987).
- 113 M. B. Kahaleh, P. S. Fan, and T. Otsuka, *Gammadelta receptor bearing T cells in scleroderma: enhanced interaction with vascular endothelial cells in vitro*. **Clin Immunol** 91 (2), 188 (1999).
- 114 M. C. Mingari, M. Ponte, C. Cantoni, C. Vitale, F. Schiavetti, S. Bertone, R. Bellomo, A. T. Cappai, and R. Biassoni, *HLA-class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: molecular characterization, distribution in lymphoid tissues and co-expression by individual T cells*. **Int Immunol** 9 (4), 485 (1997).
- 115 M. B. Kahaleh and E. C. LeRoy, *Autoimmunity and vascular involvement in systemic sclerosis (SSc)*. **Autoimmunity** 31 (3), 195 (1999).
- 116 J. Taipale, J. Saharinen, K. Hedman, and J. Keski-Oja, *Latent transforming growth factor-beta 1 and its binding protein are components of extracellular matrix microfibrils*. **J Histochem Cytochem** 44 (8), 875 (1996).
- 117 A. Igarashi, K. Nashiro, K. Kikuchi, S. Sato, H. Ihn, M. Fujimoto, G. R. Grotendorst, and K. Takehara, *Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders*. **J Invest Dermatol** 106 (4), 729 (1996).
- 118 S. A. Jimenez, E. Hitraya, and J. Varga, *Pathogenesis of scleroderma. Collagen*. **Rheum Dis Clin North Am** 22 (4), 647 (1996).
- 119 G. Notas, T. Kisseleva, and D. Brenner, *NK and NKT cells in liver injury and fibrosis*. **Clin Immunol** 130 (1), 16 (2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Investigar o polimorfismo dos genes KIR em um grupo de pacientes com esclerose sistêmica (ES) e comparar com um grupo controle de indivíduos saudáveis.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência dos diversos polimorfismos dos genes KIR através do método PCR-SSP, em pacientes com ES e grupo controle;
- Avaliar a frequência dos diversos polimorfismos dos genes KIR em pacientes com diferentes formas da ES, como a forma difusa e limitada;

3 ARTIGO ORIGINAL

Polymorphism of Killer cell Immunoglobulin-like Receptor: positive association of KIR2DS2+/KIR2DL2- phenotype with susceptibility to systemic sclerosis

[Polymorphism of KIR genes in systemic sclerosis]

Patricia Hartstein Salim¹MSc; Mariana Jobim²MD,MSc; Markus Bredemeier³MD,PhD; José Arthur Bogo Chies⁴PhD; Jeanine Schlottfeldt²Msc; João Carlos Tavares Brenol³MD,PhD; Luiz Fernando Jobim⁵MD,PhD; Ricardo Machado Xavier³MD,PhD.

¹Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. Brazil. ²Serviço de Imunologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, RS. Brazil. ³Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, RS. Brazil. ⁴Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. Brazil. ⁵Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. Brazil.

Supported by FIPE-HCPA, CAPES and CNPq.

Address correspondence and reprint requests to Ricardo M. Xavier, PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, 6º andar, sala 630, Rua Ramiro Barcelos 2350, Bairro Bom Fim, CEP 90035-903, Porto Alegre-RS, Brazil. Telephone/Fax: +55 51 2101 8340. E-mail: rmaxavier@hcpa.ufrgs.br and psalim@hcpa.ufrgs.br

Este artigo será submetido para a revista "Arthritis and Rheumatism"

Objective

To investigate possible associations of Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor (*KIR*) polymorphisms and *KIR* combinations with systemic sclerosis (SSc), including the limited (lSSc) and diffuse (dSSc) forms of the disease.

Methods

We analyzed 113 South Brazilian patients with SSc and 115 voluntary bone marrow donors. Typing of 15 *KIR* genes was performed by Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primers (PCR-SSP). PCR products were analyzed on agarose gel after electrophoresis.

Results

The frequency of inhibitory *KIR2DL2* was significantly decreased among patients with SSc compared with healthy controls (28.7% versus 65.2; $P < 0.001$, odds ratio [OR] 0.21, 95% confidence interval [95% CI] 0.11–0.38). When activatory and inhibitory *KIR* genes were analyzed in combination, the concomitant presence of *KIR2DS2* and absence of *KIR2DL2* (*KIR2DS2+ / KIR2DL2-*) phenotype was more frequent in SSc patients than in the control group (26.08% versus 1.75%; $P < 0.001$, OR=19.94, 95%CI [4.78–175.10]). On the other hand, the presence of both *KIR2DS2* and *KIR2DL2* was more frequent in the control group (26.96% versus 57.39%; $P = 0.000005$, OR=0.27, 95%CI [0.15–0.49]). No significant difference in *KIR* genes polymorphisms was found between lSSc and dSSc disease subsets.

Conclusions

The combination of *KIR2DS2+ / KIR2DL2-* may be a risk factor for development of SSc while the higher frequency of the inhibitory *KIR2DL2* gene in the control group points to a protective function. These results indicate a potential role of *KIR* genes in the SSc pathogenesis.

Systemic sclerosis (SSc) is a relatively rare disease, characterized by autoimmunity and variable degrees of fibrosis within the skin and internal organs. Its pathogenesis is not well known, but evidence suggests that there is inappropriate activation of the immune system by some environmental stimuli in individuals with a genetic background of susceptibility (1, 2). The activated immune cells may damage vascular endothelium, induce proliferation of fibroblasts and stimulate fibroblasts to produce collagen. Endothelial cell damage can also activate the immune system or induce fibroblast proliferation. Associated with fibroblast proliferation may be immune activation or collagen production. Finally, collagen production and organ damage can induce immune activation thus perpetuating the cycle (3). There are two major subsets of the disease, limited (lSSc) and diffuse (dSSc) systemic sclerosis, which are differentiated primarily by the extent of skin involvement, and are characterized by different disease evolution and prognosis (4).

Many genetic-association studies involved in autoimmunity and inflammation have been conducted in SSc. They also have been associated with MHC polymorphisms (5-7). There is mounting evidence suggesting that these genetic associations may in fact be associated with SSc as a single disease entity.

Natural Killer (NK) cells are lymphocytes that circulate in the blood and participate in the innate immune responses (8), producing interferon- γ (IFN γ) (9), tumor necrosis factor α (TNF α) (10), perforin and granzyme (11). NK cells also play a key role in regulating autoimmune responses (12). They kill diverse target cells with decreased or absent expression of major histo-

compatibility complex (MHC) class I molecules, including virus-infected cells (13) and normal hematopoietic cells (14). This observation led to the 'missing-self' hypothesis, in which NK cells recognize and, thereafter, eliminate cells that fail to express self-MHC molecules (15). The cytolytic activity of human NK cells is partially regulated by the interaction of membrane receptors expressed by these cells (16, 17) with MHC class I antigens expressed by host cells. (18).

The Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors (*KIR*) are a diverse family of receptors expressed on human NK cells (19, 20). They contain two or three extracellular immunoglobulin-like domains (3D) (21), and, depending on their structure, they can generate activating or inhibitory signals to the NK cell (22). The activating receptors carry a short (S) cytoplasmic tail and the inhibitory receptors carry a long (L) cytoplasmic tail (Biassoni, 1996). Long cytoplasmic tails have two immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIM). Upon binding to their ligands, the tyrosine residues in the ITIMs become phosphorylated and recruit SHP-1 and SHP-2 (23). These phosphatases dephosphorylate several substrates involved in the NK cell activation cascade, and inhibit triggering its cytolytic machinery and cytokine secretion. The activating receptors lack ITIMs, but possess a positively charged amino acid (lysine) in their transmembrane regions. Via this amino acid, they associate noncovalently with a dimer of an adaptor protein (DAP-12) (24). Each DAP-12 carries immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM) in its cytoplasmic tail (25). When an activating KIR binds to its ligand, the tyrosine residues in the ITAMs are phosphorylated and recruit various tyrosine kinases, and send activating signals to NK cells to kill target cells (26).

To date, 17 *KIR* genes and pseudogenes have been described on human chromosome 19q13.4 (~0.7Mb) (27). Eight *KIR* receptors are inhibitory (*2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DL5A*, *2DL5B*, *3DL1*, *3DL2* and *3DL3*), seven are activating (*2DL4*, *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4*, *2DS5*, *2DS5* and *3DS1*) and two are pseudogenes (*2DP1* and *3DP1*). Of these, four *KIR* genes are always present: *3DL3*, *3DP1*, *2DL4* and *3DL2*. They are considered framework genes (28, 29).

Currently, many studies have reported association of *KIR* genes with autoimmune diseases. *KIR2DL5* and *KIR3DS1* may contribute to the genetic susceptibility of ankylosing spondylitis (30) and the presence of *KIR2DS2* and *KIR2DL2*, in the absence of ligands for *KIR2DL2*, is associated with psoriatic arthritis (31). On the other hand, two studies have not found association of *KIR* genes with rheumatoid arthritis (RA) (32, 33), while a third study has found association of *KIR2DS4* with RA (34).

A study from Germany suggests that the presence of *KIR2DS2+*, in the absence of *KIR2DL2-*, is associated with SSc patients (35). In contrast, a study from Canada has found association of the disease with the presence of *KIR2DS1* and absence of *KIR2DS2* (36). Therefore, the present study was designed to further investigate the association of *KIR* genes in systemic sclerosis patients with a different ethnic background.

Patients and Methods

Patients

One hundred and thirteen consecutive patients with systemic sclerosis from Rheumatology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre were invited to participate (97 women and 18 men; 80.5% Euro-descendants and 19.5% African-descendants). All patients fulfilled the American College of Rheumatology criteria for the classification of SSc (37). As a control, DNA from 115 voluntary bone marrow donors were obtained (83 women and 32 men; 86.1% Euro-Brazilians and 13.9% African-Brazilians) with no history of SSc or any other related diseases. There were no significant differences in the proportions of the two main ethnic groups (Euro-descendants and African-descendants). Disease subtype was classified as follows: diffuse cutaneous SSc (truncal and acral skin tautness), limited cutaneous SSc (skin tautness restricted to extremities and/or face) and limited SSc (*sine scleroderma*) (4). This study was approved by the Research Ethics Board of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (IRB0000921) and all patients signed an informed consent for participating in this study.

***KIR* typing**

DNA was extracted from Buffy coat using a modified salting out technique, described by Miller SA *et al*, 1988 (38). Fifteen *KIR* genes (*2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4*, *2DS5*, *3DS1*, *2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DL4*, *2DL5*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3* and *2DP1*) were typed in patients and controls using a Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primers (PCR-SSP) method, as described by

Sun *et al*, 2004. For the PCR, 10ng DNA, 50mM MgCl₂, 1μl PCR buffer, 25mM dNTP's, 500nM primers, 100nm internal control and 2.5 units of Taq polymerase were mixed in a total volume of 10μl (internal control primers amplify a 796bp fragment of the third intron of HLA DRB1). PCR products were amplified by the Gene Amp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA), with denaturation for 3 minutes at 94°C, followed by 4 cycles of 15s at 94°C, 15s at 65°C, 15s at 72°C; 21 cycles of 15s at 94°C, 15s at 60°C, 30s at 72°C; 5 cycles of 15s at 94°C, 1 minute at 55°C, 2 minutes at 72°C and a final elongation step at 72°C for 7 minutes. The PCR products were analyzed on a 1% agarose gel after electrophoresis.

Statistical Analysis

Frequency of each *KIR* was calculated as the percentage of positive numbers among all specimens. Genotypic frequency (GF), derived from carrier frequencies (CF), was calculated with the formula $GF=1-\sqrt{1-CF}$. This transformation is based on the assumption of Hardy–Weinberg proportions (HWP) and is sometimes referred to as Bernstein's formula (39). *KIR* genotype profile was described by the presence or absence of each *KIR* locus in a given individual. Framework genes and pseudogenes are not included because they are present in all profiles.

KIR differences were tested for significance by the two-tailed Fisher's exact test (when the expected number of individuals in the group was less than 5) or the Pearson's chi-square test and corrected by the Bonferroni method. Statistical analysis was performed using SPSS version

14.0 software, and values of the odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (95%CI) are given. Values of p less than or equal to 0.05 were regarded as significant.

Results

Carrier frequency of each *KIR* locus

The frequencies of the *KIR* genes in our control group were similar to others studies reported for Brazilian populations (40, 41). In addition, there was no difference in the distribution of the frequencies between European- and African-descendants in both controls and SSc patients.

The proportion of controls with inhibitory *KIR2DL2* receptors was significantly higher than that of patients with SSc (OR=0.21, 95%CI [0.11-0.38], $P<0.001$) even after Bonferroni's correction ($P<0.001$) (table 1). Moreover, *KIR2DS5* was detected in 33 healthy controls and in 16 SSc patients ($P=0.01$), and *KIR2DS1* was found in 44 healthy control and in 23 SSc patients ($P=0.004$). However, when both were analyzed with Bonferroni's correction, there was no significant difference ($P=0.15$ and $P=0.06$, respectively). There was no difference in the frequencies of the other *KIR* genes.

KIR combinations

When we analyzed the combination of *KIR2DS2+/KIR2DL2-*, we found that 2 of 115 healthy controls and 30 of 115 SSc patients presented this combination (OR=19.94, 95%CI [4.78.-175.10], P<0.001). Then, we analyzed the combination of *KIR2DS2-/KIR2DL2+* (6.96 versus 0.87) and *KIR2DS2+/KIR2DS2+* (57.39 versus 26.96), with statistical significance (OR=0.28, 95%CI [0.15-0.50], P<0.001 and OR=0.27, 95%CI [0.15-0.49], P<0.001, respectively).

There was no association of SSc and other combinations of activating *KIRs* and corresponding antagonistic *KIRs* *2DS1+/2DL1-* (2 SSc patients versus 5 healthy controls), *2DS3+/2DL3-* (10 SSc patients versus 8 healthy controls), and *3DS1+/3DL1-* (5 SSc patients versus 5 healthy controls) (table 2).

KIR genotype profile

A total of 33 profiles were detected in patients and controls (table 3). Profiles observed in only 1 individual (among both patients and controls) were combined and listed as “others”. Profile 5, which have the combination *2DS2+/2DL2+*, was more frequent in control group than patients (OR=0.11, 95% CI [0.012-0.48], P=0.0008). Other profiles were not associated with SSc.

Clinical, laboratory and subtypes

When clinical, laboratory, and demographic data on the SSc patients were compared, no significant differences in the *KIR* gene frequencies were found with regard to the presence of esophageal, pulmonary and renal involvement, calcinosis, centromere and Scl70 autoantibodies.

No significant differences were found between ISSc and dSSc. However, both ISSc and dSSc were statistically different when compared separately with the control group (table 4). Limited SSc patients had 29.2% of *KIR2DL2* compared with 65.2% of healthy controls ($P=0.00094$, $OR=0.20$, $95\%CI [0.08-0.47]$). The same was in diffuse SSc (31.8% versus 65.2%; $P=0.00015$, $OR=0.23$, $95\%CI [0.11-0.46]$). When *KIR 2DS2+/2DL2-* were compared on the different forms of SSc patients with healthy controls, frequency of diffuse form was higher than limited form compared with controls (27.3 versus 1.7; $P<0.001$, $OR=21.19$, $95\%CI [4.7-192.14]$ and 19.5 versus 1.7; $P<0.001$, $OR=13.7$, $95\%CI [2.51-135.63]$, respectively).

Discussion

Genetic factors may play a role in autoimmunity by affecting host susceptibility to disease or modifying clinical presentation and organ damage. The recent paradigm for the pathogenesis of many autoimmune diseases is that an abnormal host response (which may be genetically determined) to certain infections triggers autoimmunity (42). However, direct evidence of this occurring in SSc is lacking. It is becoming evident that several genetic factors participate in modulating susceptibility to SSc and its clinical manifestations.

A number of autoimmune disorders have been associated with specific *KIR* genes (43-45) and a common theme of these studies is that specific activating *KIR* genes are implicated in

disease pathogenesis. The first of these was rheumatoid arthritis, in which *KIR2DS2* was found to be a risk factor for the development of rheumatoid vasculitis (46).

However, studies related to *KIR* have been reporting contradictory findings. Studies conducted in ankylosing spondylitis in different parts of the world showed different results. There was an association of the disease with the gene *KIR3DL1* (30) and the increased expression of *KIR3DL2* (47). In another study, neither the *KIR* gene content of particular *KIR* haplotypes nor *KIR3DL2* polymorphisms appeared to contribute to the disease (48). The same occurred with RA, when two studies, from Northern Irish (49) and Japanese population, did not find association with RA (33), in contrast to studies from Poland and Taiwanese Chinese populations, that found significant associations with *KIR2DS4* and *KIR2DL1* (32, 34). Therefore further studies, preferably involving different populations, are needed.

The main finding from our study was that the inhibitory *KIR2DL2* is a strongly protective factor for SSc (OR 0.21). Furthermore, we observed that the presence of the activating *KIR2DS2* is a significant risk for the disease in the absence of *KIR2DL2* (OR 19.94), but not in its presence, when protection from disease was observed (0.27). Therefore, *KIR2DL2* seems to have a dominant protective effect over *KIR2DS2*.

Two previous studies have investigated the frequencies of *KIR* genes in SSc patients, although analyzing a smaller set of these genes than our study, and have reported discrepant results. Momot *et al* (2004) found an association with the combination of the presence of *KIR2DS2* and absence of *KIR2DL2* as a risk factor in German SSc patients, confirming our findings. However, they have not found a significant independent protective role for the

KIR2DL2, as we did, although their patients had a slightly lower frequency of this gene. In contrast, Pellet *et al* (2007), studying Canadian patients, have found a risk factor for the presence of *KIR2DS1*. We did find an association with *KIR2DS1*, but it lost significance after Bonferroni's correction, procedure that was not done in their study. They also reported that the presence of at least one of the two activating KIR (*KIR2DS1* and/or *2DS2*) was significantly increased in patients (80%) when compared with controls (62%).

Considering the high complexity of this gene system, with a great variety of possible genotype profiles, we believe that these observations are physiologically relevant. Despite the differences observed in these studies from distinct ethnic groups, they all point to susceptibility and protective roles of certain activating and inhibitory *KIR* genes in SSc. It has become apparent that the effect or function of NK cells is regulated by a balance between opposing signals delivered by the MHC class I specific inhibitory receptors and by the activating receptors responsible for NK cell triggering.

Following the identification of possible individual genetic determinants of SSc susceptibility, it is necessary to increase the understanding of how these genetic polymorphisms relate to the development of SSc. Biologic confirmation of these genetic alterations into functional studies is essential to determine whether these associations are, in fact, causal. Functional studies on the activation of NK cells do support the notion of a predominance of inhibitory effects during simultaneous ligation of activating receptors and inhibitory receptors with target cell ligands, usually resulting in down regulation of the signals initiated via the

activating pathways. These observations further support the notion of a possible dominant protective role of some inhibitory *KIR* genes, as we observed in this study.

Genetic factors may have great importance in the diagnosis, prognosis, and in developing new treatment strategies of SSc patients. As with many polygenic diseases, the presence in a given individual of several polymorphisms probably contributes to the risk of developing the disease. Several molecules have been incriminated in systemic sclerosis, sometimes by independent groups and in different populations (50), strongly suggesting a role in the disease and an impact on its pathophysiology. Our data, combined with other publications, point to a significant association of the *KIR* gene system with SSc, suggesting the NK cells can have a pathogenic role in this disease and might be an interesting new therapeutic target.

References

1. Arnett, F.C., Cho, M., Chatterjee, S., Aguilar, M.B., Reveille, J.D. and Mayes, M.D. (2001) Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum*, **44**, 1359-62.
2. Reveille, J.D., Fischbach, M., McNearney, T., Friedman, A.W., Aguilar, M.B., Lisse, J., Fritzler, M.J., Ahn, C. and Arnett, F.C. (2001) Systemic sclerosis in 3 US ethnic groups: a comparison of clinical, sociodemographic, serologic, and immunogenetic determinants. *Semin Arthritis Rheum*, **30**, 332-46.

3. Chung, L., Lin, J., Furst, D.E. and Fiorentino, D. (2006) Systemic and localized scleroderma. *Clin Dermatol*, **24**, 374-92.
4. LeRoy, E.C., Black, C., Fleischmajer, R., Jablonska, S., Krieg, T., Medsger, T.A., Jr., Rowell, N. and Wollheim, F. (1988) Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*, **15**, 202-5.
5. Arnett, F.C., Howard, R.F., Tan, F., Moulds, J.M., Bias, W.B., Durban, E., Cameron, H.D., Paxton, G., Hodge, T.J., Weathers, P.E. *et al.* (1996) Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma. Association with an Amerindian HLA haplotype. *Arthritis Rheum*, **39**, 1362-70.
6. Lambert, N.C., Distler, O., Muller-Ladner, U., Tylee, T.S., Furst, D.E. and Nelson, J.L. (2000) HLA-DQA1*0501 is associated with diffuse systemic sclerosis in Caucasian men. *Arthritis Rheum*, **43**, 2005-10.
7. Brown, M.A., Kennedy, L.G., MacGregor, A.J., Darke, C., Duncan, E., Shatford, J.L., Taylor, A., Calin, A. and Wordsworth, P. (1997) Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum*, **40**, 1823-8.
8. Ugolini, S. and Vivier, E. (2009) Immunology: Natural killer cells remember. *Nature*, **457**, 544-5.
9. Handa, K., Suzuki, R., Matsui, H., Shimizu, Y. and Kumagai, K. (1983) Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL 2). II. IL 2-induced interferon gamma production. *J Immunol*, **130**, 988-92.
10. Degliantoni, G., Murphy, M., Kobayashi, M., Francis, M.K., Perussia, B. and Trinchieri, G. (1985) 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*, **162**, 1512-30.
11. Trinchieri, G. (1989) Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*, **47**, 187-376.
12. French, A.R. and Yokoyama, W.M. (2004) Natural killer cells and autoimmunity. *Arthritis Res Ther*, **6**, 8-14.

13. Malnati, M.S., Lusso, P., Ciccone, E., Moretta, A., Moretta, L. and Long, E.O. (1993) Recognition of virus-infected cells by natural killer cell clones is controlled by polymorphic target cell elements. *J Exp Med*, **178**, 961-9.
14. Karre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G. and Kiessling, R. (1986) Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, **319**, 675-8.
15. Ljunggren, H.G. and Karre, K. (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, **11**, 237-44.
16. Moretta, A., Bottino, C., Pende, D., Tripodi, G., Tambussi, G., Viale, O., Orengo, A., Barbaresi, M., Merli, A., Ciccone, E. *et al.* (1990) Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med*, **172**, 1589-98.
17. Moretta, A., Tambussi, G., Bottino, C., Tripodi, G., Merli, A., Ciccone, E., Pantaleo, G. and Moretta, L. (1990) A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3- CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. *J Exp Med*, **171**, 695-714.
18. Moretta, A., Vitale, M., Bottino, C., Orengo, A.M., Morelli, L., Augugliaro, R., Barbaresi, M., Ciccone, E. and Moretta, L. (1993) P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med*, **178**, 597-604.
19. Colonna, M. and Samaridis, J. (1995) Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science*, **268**, 405-8.
20. Vilches, C. and Parham, P. (2002) KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*, **20**, 217-51.

21. Marsh, S.G., Parham, P., Dupont, B., Geraghty, D.E., Trowsdale, J., Middleton, D., Vilches, C., Carrington, M., Witt, C., Guethlein, L.A. *et al.* (2003) Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Immunogenetics*, **55**, 220-6.
22. Moretta, A., Sivori, S., Vitale, M., Pende, D., Morelli, L., Augugliaro, R., Bottino, C. and Moretta, L. (1995) Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med*, **182**, 875-84.
23. Burshtyn, D.N., Scharenberg, A.M., Wagtmann, N., Rajagopalan, S., Berrada, K., Yi, T., Kinet, J.P. and Long, E.O. (1996) Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity*, **4**, 77-85.
24. Lanier, L.L., Corliss, B.C., Wu, J., Leong, C. and Phillips, J.H. (1998) Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature*, **391**, 703-7.
25. Lanier, L.L., Corliss, B., Wu, J. and Phillips, J.H. (1998) Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity*, **8**, 693-701.
26. Campbell, K.S., Dessing, M., Lopez-Botet, M., Cella, M. and Colonna, M. (1996) Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med*, **184**, 93-100.
27. Suto, Y., Maenaka, K., Yabe, T., Hirai, M., Tokunaga, K., Tadok, K. and Juji, T. (1996) Chromosomal localization of the human natural killer cell class I receptor family genes to 19q13.4 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, **35**, 270-2.
28. Wilson, M.J., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., Beck, S. and Trowsdale, J. (2000) Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4778-83.
29. Rajalingam, R., Hong, M., Adams, E.J., Shum, B.P., Guethlein, L.A. and Parham, P. (2001) Short KIR haplotypes in pygmy chimpanzee (Bonobo) resemble the conserved framework of diverse human KIR haplotypes. *J Exp Med*, **193**, 135-46.
30. Jiao, Y.L., Ma, C.Y., Wang, L.C., Cui, B., Zhang, J., You, L., Chen, Z.J., Li, J.F. and Zhao, Y.R. (2008) Polymorphisms of KIRs gene and HLA-C alleles in patients with ankylosing

- spondylitis: possible association with susceptibility to the disease. *J Clin Immunol*, **28**, 343-9.
31. Martin, M.P., Nelson, G., Lee, J.H., Pellett, F., Gao, X., Wade, J., Wilson, M.J., Trowsdale, J., Gladman, D. and Carrington, M. (2002) Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol*, **169**, 2818-22.
 32. Majorczyk, E., Pawlik, A., Luszczek, W., Nowak, I., Wisniewski, A., Jasek, M. and Kusnierczyk, P. (2007) Associations of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with complications of rheumatoid arthritis. *Genes Immun*, **8**, 678-83.
 33. Kogure, T., Tatsumi, T., Niizawa, A., Fujinaga, H., Ito, T., Shimada, Y. and Terasawa, K. (2007) No correlation exists between disease activity and the expression of killer-cell immunoglobulin-like receptors in patients with rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*, **2007**, 65179.
 34. Yen, J.H., Lin, C.H., Tsai, W.C., Wu, C.C., Ou, T.T., Hu, C.J. and Liu, H.W. (2006) Killer cell immunoglobulin-like receptor gene's repertoire in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, **35**, 124-7.
 35. Momot, T., Koch, S., Hunzelmann, N., Krieg, T., Ulbricht, K., Schmidt, R.E. and Witte, T. (2004) Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. *Arthritis Rheum*, **50**, 1561-5.
 36. Pellett, F., Siannis, F., Vukin, I., Lee, P., Urowitz, M.B. and Gladman, D.D. (2007) KIRs and autoimmune disease: studies in systemic lupus erythematosus and scleroderma. *Tissue Antigens*, **69 Suppl 1**, 106-8.
 37. (1980) Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum*, **23**, 581-90.
 38. Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, **16**, 1215.

39. Gourraud, P.A., Barnetche, T., Vidan-Jeras, B. and Cambon-Thomsen, A. (2005) Introduction to statistical analysis of population data in immunogenetics. *Transpl Immunol*, **14**, 245-53.
40. Middleton, D., Meenagh, A., Moscoso, J. and Arnaiz-Villena, A. (2008) Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents. *Tissue Antigens*, **71**, 105-13.
41. Rudnick, C.C., Franceschi, D.S., Marangon, A.V., Guelsin, G.A., Sell, A.M. and Visentainer, J.E. (2008) Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Southern Brazilian population from the state of Parana. *Hum Immunol*, **69**, 872-6.
42. Gross, D., Huber, B.T. and Steere, A.C. (2001) Molecular mimicry and Lyme arthritis. *Curr Dir Autoimmun*, **3**, 94-111.
43. Lowe, D.P., Cook, M.A., Bowman, S.J. and Briggs, D.C. (2009) Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*.
44. Toloza, S., Pellett, F., Chandran, V., Ibanez, D., Urowitz, M. and Gladman, D. (2008) Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genotypes with vascular arterial events and anticardiolipin antibodies in patients with lupus. *Lupus*, **17**, 793-8.
45. Velickovic, M., Velickovic, Z., Panigoro, R. and Dunckley, H. (2009) Diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Indonesian populations of Java, Kalimantan, Timor and Irian Jaya. *Tissue Antigens*, **73**, 9-16.
46. Yen, J.H., Moore, B.E., Nakajima, T., Scholl, D., Schaid, D.J., Weyand, C.M. and Goronzy, J.J. (2001) Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med*, **193**, 1159-67.
47. Chan, A.T., Kollnberger, S.D., Wedderburn, L.R. and Bowness, P. (2005) Expansion and enhanced survival of natural killer cells expressing the killer immunoglobulin-like receptor KIR3DL2 in spondylarthritis. *Arthritis Rheum*, **52**, 3586-95.

48. Harvey, D., Pointon, J.J., Sleator, C., Meenagh, A., Farrar, C., Sun, J.Y., Senitzer, D., Middleton, D., Brown, M.A. and Wordsworth, B.P. (2009) Analysis of killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genes in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*.
49. Middleton, D., Meenagh, A. and Wright, G.D. (2007) No association in frequency of KIR receptors in patients with rheumatoid arthritis from Northern Ireland. *Tissue Antigens*, **69**, 577-82.
50. Zhou, X., Tan, F.K., Wang, N., Xiong, M., Maghidman, S., Reveille, J.D., Milewicz, D.M., Chakraborty, R. and Arnett, F.C. (2003) Genome-wide association study for regions of systemic sclerosis susceptibility in a Choctaw Indian population with high disease prevalence. *Arthritis Rheum*, **48**, 2585-92.

Tables

Table 1. Frequencies of *KIR* gene in systemic sclerosis (113) and healthy controls (115).

<i>KIR</i> gene	Systemic Sclerosis	Healthy Control	<i>p</i> *
	% (GF)	% (GF)	
2DL1	97.4 (0.838)	97.4 (0.838)	NS
2DL2	28.7 (0.155)	65.2 (0.410)	9.1×10^{-7}
2DL3	82.6 (0.582)	85.2 (0.615)	NS
2DL4	98.3 (0.869)	100.0 (0.968)	NS
2DS2	53.9 (0.321)	59.1 (0.360)	NS
2DS3	30.4 (0.165)	33.9 (0.186)	NS
2DS5	13.9 (0.072)	28.7 (0.155)	NS
2DS1	20.0 (0.105)	38.3 (0.214)	NS
3DL1	95.7 (0.792)	95.7 (0.792)	NS
3DL2	98.3 (0.869)	98.3 (0.869)	NS
3DS1	40.0 (0.225)	41.7 (0.236)	NS
3DL3	97.4 (0.838)	98.3 (0.869)	NS
2DL5	53.9 (0.321)	52.2 (0.308)	NS
2DP1	99.1 (0.905)	97.4 (0.838)	NS
2DS4	95.7 (0.792)	95.7 (0.792)	NS

*Pearson Chi-Square with Bonferroni's correction

GF=1-√(1-CF). CF= %/100. GF= Genotypic Frequency. CF= Carrier Frequencies.

Table 2. Combinations of *KIR* genes in systemic sclerosis (113) and healthy controls (115).

<i>KIR</i> combinations	Systemic Sclerosis (n) %	Healthy Controls (n) %	<i>P</i> [‡]	OR (95%CI)
2DS1+/2DL1-	(2) 1.76	(5) 4.34	NS	-
2DS2+/2DL2-	(30) 26.54	(2) 1.73	3.6x10⁻⁸	19.94 (4.78-175.10)
2DS3+/2DL3-	(10) 8.84	(8) 6.95	NS	-
3DS1+/3DL1-	(5) 4.42	(5) 4.34	NS	-
2DS2+/2DL2+	(30) 26.96	(66) 57.39	5.6x10⁻⁶	0.27 (0.15-0.49)
2DS2-/2DL2+	(1) 0.87	(8) 6.96	0.035	-
2DS1+/2DS2+	(69) 61.06	(80) 69.56	NS	-
2DS2-/2DL2-	(52) 46.01	(37) 32.17	0.045	-
2DS1+/2DS2-	(7) 6.19	(12) 10.43	NS	-

[‡]Statistical Analysis was done by Fisher's exact test or Pearson's chi-square test.

OR=Odds Ratio. CI=Confidence Interval

Table 3. Killer cell immunoglobulin-like receptor (*KIR*) profile frequencies in patients (n=113) and controls (n=115)[‡].

<i>KIR</i> Profile	2DL1	2DL2	2DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	3DS1	3DL1	Systemic Sclerosis (%)	Healthy Controls (%)
#1	+	-	+	-	-	-	+	-	+	23.4	24.3
#2	+	-	+	+	-	-	+	+	+	4.34	7.0
#3	+	-	+	-	+	-	+	-	+	6.08	0.0
#4	+	-	+	+	+	-	+	+	+	1.77	0.0
#5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1.77^a	13.9^a
#6	+	+	+	-	+	-	+	-	+	9.73	13.9
#7	+	-	+	-	-	-	+	+	+	9.73	0.0
#8	+	+	-	-	-	-	+	-	+	0.0	6.1
#9	+	+	+	+	+	-	+	+	+	0.0	4.3
#10	+	+	+	-	+	+	+	-	+	2.6	4.3
#11	+	+	-	-	+	+	+	-	+	4.34	3.5
#12	+	-	+	+	+	+	+	+	+	5.21	0.0
#13	+	-	-	-	-	-	+	-	+	3.5	0.0
Others*										22.6	21.7

[‡]Statistical analysis was done by Fisher's exact test or Pearson's chi-square test.

*Profiles observed in only 1 subject were combined (others).

^a*P*=0.00085; OR=0.11; 95%CI (0.012 to 0.497). Other's profiles didn't have statistical significance

Table 4. Frequencies of *KIR* genes and combinations in Limited SSc (41) and Diffuse SSc (66).

	Limited SSc %	<i>p</i> *	Diffuse SSc %	<i>p</i> *
<i>KIR</i> gene				
2DL1	100	NS	95.4	NS
2DL2	29.26	9.4×10^{-4}	31.8	1.5×10^{-4}
2DL3	82.9	NS	83.3	NS
2DL4	95.1	NS	100	NS
2DS2	46.3	NS	59.1	NS
2DS3	31.7	NS	28.8	NS
2DS5	14.6	NS	13.6	NS
2DS1	17.1	NS	21.2	NS
3DL1	97.6	NS	95.4	NS
3DL2	100	NS	96.9	NS
3DS1	36.6	NS	98.5	NS
3DL3	95.1	NS	39.4	NS
2DL5	56.1	NS	50.0	NS
2DP1	97.5	NS	100	NS
2DS4	97.5	NS	93.9	NS
<i>KIR</i> combinations				
2DS2+/2DL2-	19.5	2.7×10^{-3}	27.3	2.1×10^{-6}
2DS1+/2DL1-	0.0	NS	3.1	NS
2DS3+/2DL3-	12.2	NS	7.6	NS
3DS1+/3DL1-	2.4	NS	4.5	NS
2DS1+/2DS2-	7.3	NS	4.5	NS
2DS1+/2DS2+	53.6	NS	63.6	NS
2DS2+/2DL2+	24.4		31.8	
2DS2-/2DL2+	2.4	NS	0.0	NS
2DS2-/2DL2-	51.2	NS	40.9	NS

*Pearson Chi-Square with Bonferroni's correction. Statistical analysis was compared with healthy controls.
SSc= Systemic Sclerosis

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O papel das células NK em respostas auto-imunes tem sido examinado em muitos modelos animais de doenças auto-imunes. As evidências destes estudos sugerem que a célula NK pode afetar o desenvolvimento da auto-imunidade através de muitos mecanismos, incluindo infecções virais, modulando a resposta de outras células imunes, ou, como células efetoras, causando dano tecidual.

A atividade da célula NK na doença tem um importante papel na interação com as células T, além de fazer parte da regulação da imunidade inata. O resultado final desta interação é a ativação da citotoxicidade com liberação de perforinas, produção de INF γ e proliferação das células NK. Além disso, estas células também participam da resposta imune adaptativa, através de um mecanismo indireto, que envolve a secreção de citocinas na resposta estimulada por citocinas pró-inflamatórias ou interferons, devido à infecções causadas por patógenos.

Quanto á existência do alto polimorfismo dos genes *KIR*, pode-se dizer que resultaria em mais um argumento que contribuiria para a auto-imunidade. Diversos modelos foram propostos, um deles seria que receptores inibidores seriam mais fortes que os ativadores, protegendo da doença.

Outra teoria seria a de uma inapropriada ativação da célula NK, resultando na desregulação da atividade das células T, e por outro lado, uma perda de inibição resultando menos ataque às células. Muitas doenças auto-imunes já evidenciaram receptores KIR ativadores em excesso ou genótipos *KIR* com falta de inibidores, entre elas a artrite psoriática, artrite reumatóide, lupus e espondilite.

APÊNDICE

A – Protocolo de Pesquisa de Dados Clínicos

Serviço de Reumatologia - HCPA

CASO: ____

DATA DA ENTREVISTA: ____/____/____

NOME: _____ REGISTRO: _____/____

IDADE: ____ anos

SEXO ____ (1-masc 2-fem) COR: ____ (1-branco 2-preto 3-misto)

ENDEREÇO: _____

NOME E ENDEREÇO DE PARENTE: _____

TELEFONE : casa: _____ celular: _____ TELEFONE DE PARENTE: _____

Falta de ar (MRC mod): ____

1. não tem falta de ar, exceto com atividade extrema;
2. incomodado pela falta de ar quando caminha rapidamente no plano ou sobe lomba leve;
3. anda mais devagar no plano que pessoas da mesma idade devido à falta de ar ou tem que parar

quando caminha no seu ritmo no plano;

3. pára para respirar após caminhar mais ou menos 100 metros ou após poucos minutos no plano;
4. muita falta de ar para sair de casa ou falta de ar ao vestir ou trocar de roupa.

NYHA: ____ (classe)

1. sem limitação; atividade rotineira sem fadiga exagerada ou dispnéia ou palpitação;
2. com pequena limitação de atividade física; bem em repouso; atividade rotineira causa fadiga, dispnéia ou palpitação;
3. limitação importante; dispnéia aos mínimos esforços; bem em repouso;
4. dispnéia em repouso; qualquer atividade com muito desconforto;

Fumo: ____ (1-sim 2-não 3- no passado) dos ____ aos ____ anos ____ cigs/dia.

O Sr.(a) tem pressão alta? ____ (1-sim 2-não) PA1: ____/____ PA2: ____/____ BRAÇO: ____ cm D E

Sr. (a) tem algum problema cardíaco) ____ Qual? _____

O Sr(a) tem diabetes? ____

Usa inibidor da ECA: ____ Verapa: ____ Nifedi: ____ Amlo: ____ Diltia ____

betabloqueador ____ diurético ____ AINE : ____ Qual? _____ outros (anotar): _____

_____, _____, _____, _____

A medição vasoativa será suspensa: ____ (1-sim 2-não)

Quantos dias antes ? ____ Por quê? _____

AINE será suspenso? ____ (1-sim 2-não)

Quantos dias antes? ____ Por quê? _____ CASO: ____

Dificuldade de deglutição: ____ (0-não; 1- sim, para pedaços de carne; 2- sim, para comer arroz e feijão; 3- sim, para líquidos) ou _____

Vezes: ____ por mês ou ____ por semana ou ____ dia ou sempre

Classifique a severidade do sintoma: ____ (0-não tem 1- leve 2-moderado 3- severo)

Tem azia ou pirose (queimação na boca do estômago ou atrás do peito)? ____ (1-sim 2-não)

Vezes: ____ por mês ou ____ por semana ou ____ dia ou sempre

Classifique a severidade do sintoma: ____ (0-não tem 1- leve 2- moderado 3- severo)

Tem dor ao engolir? ____ (1-sim 2-não)

Vezes: ____ por mês ou ____ por semana ou ____ dia ou sempre

Classifique a severidade do sintoma: ____ (0-não tem 1- leve 2- moderado 3- severo)

Vomita ou sente o conteúdo do estômago voltar até a garganta após as refeições ou longe delas? ____

Vezes: ___ por mês ou ___ por semana ou ___ dia ou sempre

Classifique a severidade do sintoma: ___ (0-não tem 1- leve 2- moderado 3- severo)

Costuma ter dor no peito ou atrás do peito? ___

Vezes: ___ por mês ou ___ por semana ou ___ dia ou sempre

Classifique a severidade do sintoma: ___ (0-não tem 1- leve 2- moderado 3- severo)

Usa omeprazol? ___ (1-sim 2-não)

Vezes: ___ por mês ou ___ por semana ou sempre

Usa rantidina, cimetidina, famotidina? ___ (1-sim 2-não)

Vezes: ___ por mês ou ___ por semana ou sempre

Usa cisaprida (prepulsid) ou metoclopramida (plasil)? ___ (1-sim 2-não)

Vezes: ___ por mês ou ___ por semana ou sempre

Desde quando começou a ter Raynaud? Há ___ anos.

Desde quando notou que a pele começou a ficar endurecida e lisa? Há ___ anos.

Quando foi diagnosticada a ES? Há ___ anos.

Responder a essas perguntas no dia da capilaroscopia (data ___/___/___): CASO: ___

Temperatura na Zona 16: ___ °C

Temperatura do dia pela manhã: ___ °C

Horário em que entrou na Z16: ___

Horário da capilaroscopia: ___ (deve ser pelo menos 20 min após entrada na Z16)

Horário da coleta: ___ (logo após a capilo e em repouso). Raynaud durante a coleta? ___

PA1: ___/___ FC1: ___ PA2: ___/___ FC2: ___ (após as coletas)

Quantas vezes teve episódios de Raynaud (crises em que as mãos ficam pálidas -seguido ou não por cianose e/ou eritema- ou cianóticas) nos últimos 2 dias?

Anteontem: ____ minutos: _____ RCS: ____

Ontem: ____ minutos: _____ RCS: ____

Hoje: ____ minutos: _____ RCS: ____

Raynaud durante a capilo: _____

ESCALA : (nenhum Raynaud) **0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10** (o pior Raynaud que teve)

Fumou ontem? ____ (1-sim 2-não) Quantos cigarros? _____

Usou medicação vasoativa nos últimos 7 dias: ____ (1-sim 2-não)

Quais? _____

Usou medicação vasoativa nas últimas 24 horas: ____ Quais? _____

Usou AINE nos últimos 7 dias: ____ Qual? _____

Usou AINE nas últimas 24 horas: ____ Qual? _____

EXAME FÍSICO:

Critérios:

Maior (esclerodermia simétrica proximal às MCFs ou MTFs): ____ (1-sim 2-não)

Menores:

esclerodactilia: ____ (1-sim 2-não)

pitting scars: _____

perda de substância distal: ____

fibrose em bases pulmonares ao Rx: ____

espessamento da pele proximal aos joelhos e cotovelos: ____ (1-sim 2-não)

calcinoses: ____ (1- sim 2- não)

teleangiectasias: ____ (1-sim 2-não)

Apresenta amputação de extremidades MsSs: ____ Quantos dedos: ____

Apresenta amputação de extremidades Msls: ____ Quantos dedos: ____ CASO: ____

Apresenta úlceras ativas em MsSs: ____ Quantas: ____

Maior diâmetro das úlceras em MsSs em mm: _____

Apresenta úlceras ativas em MsIs: _____ Quantas: _____

Maior diâmetro das úlceras em MsIs em mm: _____

Crepitantes pulmonares: _____ (1-sim 2-não) escala (0- não 1- discreto 2- moderado 3- severo)

Área de crepitantes: (marcas: 5 cm abaixo das bordas inf. escapulares, metade das escápulas)

direita: 1/3inf ___ 1/3 médio ___ 1/3 sup ___

esquada: : 1/3inf ___ 1/3 médio ___ 1/3 sup ___

pulso radial D: ___ (número de cruces em 4) pulso radial esquerdo: _____

pulso femoral D: ___ femoral E: _____ pedioso D: ___ pedioso E: _____

ESCORE CUTÂNEO

Rodnan modificado por Clements: 0= normal 1- espessamento leve 2- moderado 3-severo

	DIREITA	ESQUERDA
Quirodáctilos	0 1 2 3	0 1 2 3
Mãos	0 1 2 3	0 1 2 3
antebraços	0 1 2 3	0 1 2 3
braços	0 1 2 3	0 1 2 3
face	0 1 2 3	
tórax anterior	0 1 2 3	
ABD	0 1 2 3	
Coxas	0 1 2 3	0 1 2 3
pernas	0 1 2 3	0 1 2 3
dorso dos pés	0 1 2 3	0 1 2 3

abertura oral máxima: _____ mm (maior de 3 tentativas)

extensão ativa mão direita: _____ mm extensão ativa mão esquerda: _____ mm (maior de 3 tentativas)

fechamento ativo da mão (**menor de 3 tentativas**) direita: _____ mm esquerda: _____ mm

PESO: _____ Kg ALTURA: _____ cm.

CASO: _____

PROVAS DE FUNÇÃO PULMONAR (data ___/___/___)

EXAMINADOR: _____

Capacidade pulmonar total: _____ ml (_____% do previsto)

Volume residual: _____ ml (_____% do previsto)

capacidade vital: : _____ ml (_____% do previsto)

capacidade vital forçada: : _____ ml (_____% do previsto)

VEF1: : _____ ml (_____% do previsto)

difusão de CO: _____% do previsto

coeficiente de transferência: _____% do previsto

CINTILOGRAFIA DE TRÂNSITO ESOFÁGICO (data ___/___/___)

EXAMINADOR: _____

líquido em pé: _____ % de estase em 60 seg, trânsito (80%) _____ seg; trânsito (90%) _____ ; área : _____

semi-sólido em pé: _____ % de estase em 60 seg; trânsito (80%) _____ seg; ; trânsito (90%) _____ ; área: _____

líquido deitado: _____ % de estase em 60 seg; trânsito (80%) _____ seg; ; trânsito (90%) _____ ; área: _____

semi-sólido deitado: _____ % de estase em 60 seg; trânsito (80%) _____ seg; ; trânsito (90%) _____ ; área: _____

OBS: área corresponde à area em que houve retenção.

EXAMES DE LABORATÓRIO:

Última creatinina sérica _____ mg/dl (data ___/___/___)

Última glicemia de jejum _____ mg/dl (data ___/___/___)

Última TGO _____ U/ml (data ___/___/___)

Última TGP _____ U/ml (data ___/___/___)

Última hemoglobina sérica _____ g/dl (data ___/___/___)

QUE (___/___/___)

: _____

Último FAN em fígado de rato: 1/_____ data (___/___/___) padrão: _____, _____

Último FAN positivo em fígado de rato: 1/_____ data (___/___/___) padrão: _____, _____

Anti-DNA positivo : ____ (1-sim 2-não) ; título: 1/____ ; data (____/____/____)

U1-RNP: ____ Anti-SM: ____ Anti SS-A: ____ Anti SS-B: ____ Scl70: ____ (data ____/____/____)

FAN em HEP-2 (título): 1/____ padrão _____, _____

Centrômero: ____ (1-sim 2-não) U1RNP: ____ Scl70: ____ DOSAGEM DE ET-1: _____

B – Protocolo de Pesquisa

I – Protocolo de coletas de dados

Projeto: **“Estudo do Polimorfismo dos Genes KIR na Esclerose Sistêmica”**

Esclerose Sistêmica *ou* Grupo Controle

Nome do paciente: _____

Número do paciente: _____

Número do prontuário: _____

Raça: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Tipagem KIR: _____

C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Pacientes

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO

Estudo do polimorfismo dos genes KIR na esclerose sistêmica.

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

A Esclerose Sistêmica é uma doença do tecido conjuntivo que afeta a pele, e algumas vezes os órgãos internos. É classificada como uma doença auto-imune, devido ao fato de que o sistema imunológico é ativado para agredir os tecidos do próprio organismo.

Este estudo está sendo realizado para investigar os diversos tipos de genes KIR em população controle e em grupo de pacientes com Esclerose Sistêmica.

DE QUE CONSTA O ESTUDO?

Ele consta de um exame de sangue, que será utilizado para a análise dos genes relacionados com a esclerose sistêmica. O uso dessa parte do sangue para quaisquer outras finalidades é vetado.

QUAIS SÃO AS VANTAGENS EM PARTICIPAR DO ESTUDO?

Colaborar para o avanço e progresso do conhecimento sobre a esclerose sistêmica relacionado aos diversos tipos de genes KIR.

QUAIS SÃO AS DESVANTAGENS DE PARTICIPAR DO ESTUDO?

Realizar punção venosa para coleta de sangue, podendo causar dor temporária e hematoma.

HÁ A POSSIBILIDADE DESTE ESTUDO CONTINUAR?

Este estudo foi planejado para encerrar em 2007, e para avaliar o risco genético apenas através dos genes KIR. No entanto é possível que mais genes relacionados com esclerose sistêmica possam vir a ser analisados mais adiante.

DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE

- Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes em hipótese alguma.
- A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada paciente é livre para decidir de não participar.
- A decisão de não participar não interferirá no acompanhamento normal dos pacientes no Ambulatório, na Emergência nem na Internação do Hospital de Clínicas.
- O paciente é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa.

COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, assinala um X apenas uma das opções abaixo:

() Autorizo o uso dos dados da amostra de sangue para a análise dos diversos tipos de genes KIR relacionados à esclerose sistêmica.

() Autorizo o uso dos dados da amostra de sangue para a análise dos diversos tipos de genes KIR relacionados à esclerose sistêmica, bem como o armazenamento da amostra de sangue para análise dos genes KIR e de outros genes relacionados à esclerose sistêmica que possam vir a ser considerados relevantes dentro desta linha de pesquisa, desde que pelo mesmo grupo de pesquisa. Será requisitado nova autorização dos pacientes no contexto de um

novo projeto, bem como sua aprovação junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCPA e do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa. Caso haja impossibilidade de obtenção de nova autorização, esta situação será avaliada pelo CEP.

() Autorizo o uso dos dados da amostra de sangue para a análise dos diversos tipos de genes KIR relacionados à esclerose sistêmica, bem como o emprego da amostra de sangue coletada na ocasião de outro projeto para análise dos genes KIR.

Paciente: _____

Registro: _____ Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Porto Alegre, _____ de _____ de 200__.

Pesquisadores responsáveis:

Dr. Ricardo Machado Xavier

Dr. Luiz Fernando Jobim

Farm. Patrícia Hartstein Salim

Telefone / FAX: (51) 21018020

D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Controles

REGISTRO BRASILEIRO DE DOADORES VOLUNTARIOS DE MEDULA OSSEA – REDOME

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, abaixo assinado(a) e acima qualificado(a), pelo presente instrumento CONSENTIMENTO 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 hematopoéticas, 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: _____

ANEXOS

Anexo I – Instruções ao autor (Arthritis & Rheumatism)

Manuscripts should be submitted online at:

<http://mc.manuscriptcentral.com/rheumjournal> .

Editorial office contact information :

Arthritis & Rheumatism Editor: Michael D. Lockshin, MD

Hospital for Special Surgery, New York, NY

Editorial office: phone 919-623-1466; fax: 919-363-4788

E-mail: deytonj@hss.edu

Format and organization

Articles are accepted for publication on the condition that they are submitted to this journal only. Articles should pertain to the field of rheumatic disease.

Manuscripts not in compliance with the following instructions may be subject to a delay in the review process.

Submit all new manuscripts online. Launch your web browser and go to <http://mc.manuscriptcentral.com/rheumjournal> . Check for an existing account. If you are submitting for the first time, create a new account. Follow all instructions. At the end of a successful submission, a confirmation screen with manuscript number will appear and you will receive an e-mail confirming that the manuscript has been received by the journal. If this does not happen, please check your submission and/or contact tech support at edsupport@wiley.com .

Submit manuscript and all figures as one file if possible. You do not need to mail any copies.

An electronic cover letter should accompany the manuscript. Note in cover letter what type of manuscript is enclosed (Full-Length Article, Brief Report, Case Report, Concise Communication, or Letter to the Editor). Confirm that the manuscript has not been submitted or is not simultaneously being submitted elsewhere, and that no portion of the data has been or will be published in proceedings or transactions of meetings or symposium volumes. The publication of data in abstracts, and presentation in oral or poster sessions at meetings do not constitute previous publication. Indicate any financial support or other benefits from commercial sources for the work reported on in the manuscript, or any other financial interests that any of the authors may have, which could create a potential conflict of interest or the appearance of a

conflict of interest with regard to the work. Corresponding author should include address, telephone number, fax number, and E-mail address if applicable.

Type all pages of the manuscript, including those containing references, tables, and figure legends, double space in 12-point type, with 1- to 1½-inch margins. Number all sheets in succession, including references, tables, and figure legends. Title page is page 1. On the first page, type the title, name(s) of the author(s) and their major degrees, grant supporter(s), address for reprint requests, and corresponding author's telephone and fax numbers and E-mail address.

Full-Length Articles, Reviews and Brief Reports

Definition: Full-Length Articles are descriptions of original research that adds to the body of knowledge in arthritis and the rheumatic diseases. Reviews critically and analytically discuss new and rapidly evolving fields. Brief Reports are short papers of investigations into disease mechanisms, reports of clinical experience, therapeutic trials, or research and/or clinical contributions to diagnosis, treatment, etiopathology, and epidemiology of rheumatic diseases.

On the second page of Full-Length Articles and Brief Reports (but not reviews), include an abstract of fewer than 250 words. The abstract should be divided into the following sections: Objective, Methods, Results, and Conclusion.

On the third page, begin the introduction (no heading is necessary). Follow this plan of organization: Materials and Methods (or Patients and Methods), Results, Discussion, References, Tables, and Figure Legends. Organization of reviews should be appropriate to the topic discussed.

Full-Length Articles and Reviews should not exceed 4,200 words from introduction through discussion (not including references, tables, and figure legends). The total number of tables and figures combined may not exceed 6, and the number of references may not exceed 50. Captions of tables and figures should be brief but allow the reader to understand the purpose of the table or figure at a glance. Captions do not include descriptions of methods or other material more appropriately presented in the text.

Brief Reports should not exceed 2,500 words from introduction through references. The total number of tables and figures combined may not exceed 3, and the number of references may not exceed 15.

Content

Do not use new technical words, laboratory slang, words not defined in dictionaries, or abbreviations or terminology not consistent with internationally accepted guidelines.

Define any abbreviations the first time they are used.

In order to make the description of patients as clear as possible and to facilitate comparisons with other studies, the Methods section should include, whenever possible, a short paragraph detailing the proportion of patients who satisfy the ACR classification criteria for the particular disease described.

Compliance with research ethics standards

Research carried out with human subjects must be in compliance with the Helsinki Declaration. A statement to this effect must appear in the Methods section of the manuscript, including the name of the body that gave approval. Similarly, for prospective studies involving animal subjects, the Methods section must include a statement indicating approval by the appropriate institutional review board or comparable formal ethics review committee. Clinical research studies must be registered with the appropriate national body. Compliance with Open Access regulations required by funding bodies, such as the National Institutes of Health, is required. *The journal reserves the right to subject any submitted text or figures to electronic scrutiny to ensure that text has not been plagiarized and images have not been inappropriately manipulated.*

Tables

Type tables entirely in double space. Do not include any vertical lines in tables. Include horizontal lines below the title and headings and above the table footnotes only; there should be no horizontal lines separating the individual lines of data in the table body. Limit the width of each table (number of columns) such that it will fit in portrait (not landscape) orientation on a journal column (3¼ inches) or page (7 inches) and will not exceed the height of the page. Refer to current issues of the journal for further guidance regarding table style.

Tables with sections (e.g., Table 1a, Table 1b) are not acceptable and will be handled as two separate tables unless the information can be logically combined into one table with one set of headings.

Provide each table with an explanatory title so that it is intelligible without specific reference to the text.

Provide each table column with an appropriate heading. Indicate clearly any units of measure on a table.

Lengthy descriptions of methods should appear in the Methods section of the article and not in table footnotes.

References

Compile references numerically according to the order of the citation. Use abbreviations for titles of medical periodicals that conform to those in Index Medicus. Ex. Matthey DL, Hutchinson D, Dawes PT, Nixon NB, Clarke S, Fisher J, et al. Smoking and disease severity in rheumatoid arthritis: association with polymorphism at the glutathione S-transferase M1 locus. *Arthritis Rheum* 2002;46:640-7.

Anexo II – Critérios estabelecidos pelo ACR para Esclerose Sistêmica

1980 CRITERIA FOR THE CLASSIFICATION OF SYSTEMIC SCLEROSIS

1. Typical sclerodermatous skin changes: tightness, thickening, and non-pitting induration, excluding the localized forms of scleroderma (morphea or linear scleroderma)
 - a. Sclerodactyly: above-indicated changes limited to (fingers and toes)
 - b. Proximal scleroderma: above-indicated changes proximal to the metacarpophalangeal or metatarsophalangeal joints, affecting other parts of the extremities, face, neck, or trunk (thorax or abdomen); usually bilateral, symmetrical and almost always including sclerodactyly
2. Other skin manifestations attributable to systemic sclerosis or comparison disorders
 - a. Digital pitting scars or loss of substance from the finger pad: depressed areas at tips of digits or loss of digital pad tissue as a result of digital ischemia rather than trauma or exogenous causes
 - b. Bilateral finger or hand edema: firm but pitting edema, especially involving fingers (includes puffy sausage-like swelling of fingers) or the dorsal aspect of the hands
 - c. Abnormal skin pigmentation: hyperpigmentation often containing areas of punctate or patchy hypopigmentation or depigmentation ("pepper and salt")
 - d. Raynaud's phenomenon: at least two-phase color change in fingers and often toes consisting of pallor, cyanosis, and/or reactive hyperemia in response to cold exposure or emotion, as determined by patient's history or physician's observation
3. Visceral manifestations
 - a. Bibasilar pulmonary fibrosis: bilateral reticular pattern of linear or lineonodular densities which are most pronounced in basilar portions of the lungs on standard chest roentgenogram; may assume appearance of diffuse mottling or "honeycomb lung," and should not be attributable to primary lung disease
 - b. Lower (distal) esophageal dysphagia: substernal discomfort on swallowing or sensation of food holdup in the retrosternal location

- c. Lower (distal) esophageal dysmotility: hypoperistalsis or aperistalsis, as demonstrated by either cine esophagram or fluoroscopy or by manometric study, often accompanied by evidence of decrease in lower esophageal sphincter tone with reflux of gastric contents into the esophagus

Colonic sacculations: wide-mouthed diverticula of colon located along the antimesenteric border; found on barium enema examination; these sacculations may also occur in ileum and jejunum

Anexo III – Carta de aprovação do Comitê de Ética do HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 05-549

Versão do Projeto: 11/01/2006

Versão do TCLE: 23/01/2006

Pesquisadores:

RICARDO MACHADO XAVIER

LUIZ FERNANDO JOB JOBIM

PATRICIA HARTSTEIN SALIM

JOAO CARLOS TAVARES BRENOL

Título: ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES KIR NA ESCLEROSE SISTÊMICA

- Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

- De acordo com a regulamentação da Resolução 340/2004 do CNS/MS o CEP/HCPA foi credenciado, através da Carta Circular N° 037 CONEP/CNS/MS de 11 de agosto de 2004, para dar aprovação final para este projeto.

Porto Alegre, 23 de janeiro de 2006

Profª Nadine Clausell