

Otimização de metodologia para o estudo de genes KIR

Methodology optimization for KIR genotyping

Primeira submissão em 20/05/08
Última submissão em 16/03/10
Aceito para publicação em 12/04/10
Publicado em 20/06/10

Cristiane Conceição Chagas Rudnick¹; Gláucia Andréia Soares Guelsin²; Amanda Vansan Marangon³; Danilo Santana Alessio Franceschi⁴; Ana Maria Sell⁵; Jeane Eliete Laguilha Visentainer⁶

unitermos	resumo
Células <i>natural killer</i>	<p>Receptores <i>killer cell immunoglobulin-like</i> (KIRs) são moléculas localizadas na superfície de células <i>natural killer</i> (NK) e em subpopulações de linfócitos T codificadas por genes do cromossomo 19q13.4. A interação entre receptores KIR e moléculas antígeno leucocitário humano (HLA) de classe I determina se células NK exercerão ou não sua função citotóxica e/ou secretora de citocinas ou se esta será inibida. Este trabalho teve por finalidade otimizar a metodologia para a genotipagem KIR, baseando-se nas condições descritas por Martin (2004). A técnica utilizada foi a reação em cadeia da polimerase com <i>primers</i> de sequência específica (PCR-SSP) com iniciadores sintetizados pela Invitrogen[®] e visualização do produto amplificado em gel de agarose a 2% com brometo de etídio. Adaptações foram realizadas e a concentração de alguns reagentes foi alterada, como a do controle interno de 100 nM para 150 nM, iniciadores específicos senso e antissenso de KIR12.5/12.3, KIR13.5/13.3, KIR14.5/14.3, KIR22.5/22.3 e KIR36.5/36.3 de 500 nM para 750 nM e da solução de MgCl₂ de 1,5 mM para 2 mM. As concentrações dos demais reagentes e temperaturas de amplificação foram mantidas. Nessas condições, o uso da Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen[®]) foi satisfatório. Os resultados das genotipagens de 70 indivíduos foram confirmados por rSSO-Luminex[®] (One Lambda, Canoga Park, CA, EUA). A tipagem de genes KIR por essa técnica apresentou sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e baixo custo.</p>
Genotipagem	
KIR	
PCR-SSP	
PCR-SSO	

abstract

key words

The killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) are molecules expressed on natural killer (NK) cells surface and in T-cell subsets encoded by genes located in chromosome 19q13.4. The interaction between KIR receptors and HLA class I molecules determines if the NK cells will fulfill their cytotoxic function and/or cytokine secretion or if this function will be inhibited. The objective of this work was to optimize KIR genotyping method described by Martin (2004). It was used PCR-SSP (polymerase chain reaction-sequence-specific primers) with primers synthesized by Invitrogen[®] and visualization of the amplified products on 2% agarose gel electrophoresis, containing ethidium bromide. Some adaptations were made and the reagents had their concentrations increased: the internal control from 100 nM to 150 nM, forward and reverse specific primers KIR12.5/12.3, KIR13.5/13.3, KIR14.5/14.3, KIR22.5/22.3 and KIR36.5/36.3 from 500 nM to 750 nM, and MgCl₂ solution from 1.5 mM to 2 mM. Other reagent concentrations and amplification temperatures were maintained. Satisfactory results were obtained with Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen[®]). The results of seventy samples were confirmed by rSSO-Luminex[®] (One Lambda, Canoga Park, CA, USA). This KIR typing method proved to be accurate, specific, reproducible and cost effective.

Natural killer cells

Genotyping

KIR

PCR-SSP

PCR-SSO

1. Acadêmica de pós-graduação em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá (UEM).
2. Acadêmica de graduação do curso de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas, da UEM.
3. Acadêmica de graduação do curso de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas, da UEM.
4. Acadêmico de pós-graduação em Análises Clínicas da UEM.
5. Doutora do Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Laboratório de Imunogenética, da UEM.
6. Doutora do Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Laboratório de Imunogenética, da UEM.

Introdução

As células *natural killer* (NK) desempenham importante papel na resposta imune inata, pois são responsáveis pela lise de células infectadas por vírus⁽⁴⁾, células tumorais^(2, 22, 23, 58) e células alogênicas⁽⁶⁾, como também secretam citocinas como interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF) e fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF)⁽⁴⁾. Possuem vários tipos de receptores em sua superfície, entre os quais receptores *killer cell immunoglobulin-like* (KIR), glicoproteínas pertencentes à superfamília das imunoglobulinas que têm como ligantes moléculas de antígeno leucocitário humano (HLA) de classe I⁽³¹⁾. Na ausência ou na expressão reduzida de moléculas HLA de classe I em células-alvo, estas são destruídas pelas células NK⁽²⁹⁾. Os receptores KIR podem ser de ativação e de inibição e, para que as células NK consigam distinguir alvos desprovidos ou não de moléculas HLA de classe I, é necessária a ligação simultânea nestes receptores⁽³¹⁾. Os sinais de inibição predominam sobre os de ativação, prevenindo, assim, a lise de células autólogas normais⁽³⁹⁾. A diversidade KIR está relacionada com a variabilidade no número de genes, no tipo de genes, de seus alelos e haplótipos^(24, 50, 53), e o polimorfismo KIR em humanos pode estar relacionado com a seleção natural exercida por patógenos⁽⁵⁰⁾.

Os receptores KIR são codificados por genes do complexo de receptores leucocitários (LRC), situados no cromossomo 19q13.4⁽⁵⁶⁾. Atualmente, 15 genes e dois pseudogenes KIR foram identificados^(17, 19, 35): *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR3DS1*, *KIR2DP1* e *KIR3DP1*. Até janeiro de 2009, foram descritos 335 alelos distribuídos nos diferentes *locus*⁽²⁵⁾. A importância da tipagem de genes KIR está relacionada com o conhecimento da diversidade desses genes em diferentes indivíduos e, conseqüentemente, em diferentes populações^(1, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 16, 18, 21, 27, 33, 34, 38, 42, 43, 45-47, 49, 52, 57, 54, 55, 59), ao papel exercido por esses receptores na resposta imune inata, sua relação com a predisposição ou com a resistência ao desenvolvimento de doenças virais, autoimunes e tumores^(3, 15, 26, 28, 30, 32, 36) e, ainda, à influência desse polimorfismo nos transplantes de medula óssea alogênicos⁽⁴⁸⁾.

Os métodos utilizados para detectar a presença ou ausência de genes KIR se baseiam em técnicas de biologia molecular: reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR)⁽⁵³⁾, reação em cadeia da polimerase com *primers* de sequência específica (PCR-SSP)^(53, 19, 37, 51), reação em cadeia da polimerase com oligonucleotídeos de

sequência específica (PCR-SSOP)⁽⁹⁾ e, mais recentemente, a técnica oligonucleotídeos de sequência específica reversa rSSO com tecnologia Luminex[®] para tipagem dos genes e alelos KIR⁽⁴¹⁾. A técnica PCR-SSP descrita por Martin⁽³⁷⁾ permite a análise de 14 genes e um pseudogene KIR a um custo não elevado, pois utiliza pouca quantidade de reagentes, muitos dos quais podem ser preparados no laboratório, e os iniciadores podem ser confeccionados a partir de sequências de bases predefinidas. Nesta técnica, a concentração de DNA deve ser de 10 ng e o volume final de reação, de 10 μ l, recomendando-se o uso de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen[®]).

O objetivo do presente estudo foi a otimização da técnica de PCR-SSP, descrita por Martin, tendo em vista a necessidade de métodos que apresentem sensibilidade, especificidade, fácil execução e interpretação, baixo custo e que não exijam equipamentos sofisticados.

Materiais e métodos

O estudo foi conduzido de acordo com as normas preconizadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (COPEP-UEM), conforme Parecer 272/2004.

Cinco mililitros de sangue total de 70 indivíduos não relacionados e selecionados aleatoriamente foram coletados em tubos contendo (EDTA). As amostras foram obtidas de forma a abranger os genótipos KIR representativos da população brasileira⁽⁴⁷⁾. O sangue foi centrifugado para obtenção de uma camada rica em células nucleadas (creme leucocitário), a qual foi congelada em tubos de criopreservação até o momento da extração do DNA.

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo *kit* EZ-DNA (Biological IndustriesTM, Beit Haemek, Israel), de acordo com o protocolo do fabricante, a partir de 150 μ l do creme leucocitário. O DNA foi reidratado com água de injeção e a concentração de DNA foi determinada no fluorômetro QubitTM (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA).

Genotipagem KIR

Para a genotipagem KIR foi utilizada a técnica PCR-SSP, descrita por Martin⁽³⁷⁾, com modificações para a tipagem de 14 genes e um pseudogene: *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*,

KIR2DS5, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR3DS1* e *KIR2DP1*. Para o desenvolvimento desta técnica foram utilizados iniciadores confeccionados pela Invitrogen (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA).

De acordo com o procedimento padrão elaborado por Martin⁽³⁷⁾, a mistura da PCR foi preparada para o volume final de reação igual a 10 µl; tampão PCR 10X – 200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl; 1,5 mM de MgCl₂; 200 µM de cada dNTP; 100nM de iniciadores 5' e 3' do controle interno; 500 nM de iniciadores específicos; 0,25 unidade de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EA), 10 ng de DNA e água destilada estéril suficiente para completar o volume.

De início, a reação foi preparada com todos os reagentes e o DNA, exceto os iniciadores específicos. Essa mistura foi a seguir distribuída em microtubos de volume de 0,2 ml que continham os iniciadores na concentração final de 500 Nm (**Tabela 1**). A enzima utilizada foi a Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA), recomendada por fornecer melhores resultados, ou a Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA). As temperaturas e condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, quatro ciclos de 94°C por 15 segundos, anelamento a 65°C por 15 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, 21 ciclos de 94°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos e 72°C por 30 segundos, 5 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e, finalizando, a 72°C por 7 minutos. Para as amplificações foram utilizados os termocicladores Perkin Elmer GeneAmp 9600 e Applied Biosystem GeneAmp 9700 (Foster City, CA, EUA). Modificações dessas condições foram realizadas quando necessário.

A visualização do produto amplificado foi realizada em gel de agarose a 2% com brometo de etídio (5 g/ml), contra luz ultravioleta. A visualização e a fotodocumentação foram realizadas no transiluminador BioDoc-It™ Imaging System (UVP Upland, CA, EUA). O controle interno amplificou um fragmento de 796 pb do terceiro íntron de HLA-DRB1.

Validação do método

Para validação do método foram utilizados dois kits comerciais: rSSO Luminex® (One Lambda, Canoga Park, CA, EUA) do lote 002 e o kit de genotipagem KIR SSP (DYNAL® Invitrogen Corporation) do lote 003.

O princípio da técnica rSSO Luminex® se baseia primeiramente na amplificação do DNA-alvo por PCR, utilizando três grupos de iniciadores específicos para os éxons 3, 5 e 7-9,

em reações separadas. Cada produto de PCR é biotilado, o que permite a sua detecção pelo conjugado ficoeritrina-estreptavidina (SAPE). Em seguida, cada produto de PCR é desnaturado para ser hibridizado com sondas conjugadas a microesferas fluorescentes codificadas. O DNA hibridizado e ligado às microesferas é marcado com SAPE e a reação é lida no citômetro de fluxo LABscan™ 100, que identifica a intensidade de fluorescência da ficoeritrina em cada microesfera.

O kit de genotipagem KIR SSP da Invitrogen™ é um método baseado na PCR que utiliza sequência específica de iniciadores para a detecção da presença e ausência de genes KIR. O produto da PCR é dispensado em gel de agarose a 2% com brometo de etídio, seguido de eletroforese e visualização contra luz ultravioleta. Para a interpretação dos resultados utiliza-se uma ficha de interpretação padrão proveniente do fabricante.

Resultados

Alteração da concentração do controle interno de 100 nM para 150 nM

As primeiras tipagens foram realizadas de acordo com as condições descritas por Martin⁽³⁷⁾. Como o padrão de bandas do controle interno foi muito fraco, diferentes concentrações do par de iniciadores que amplificava o controle interno foram testadas: 150 nM, 180 nM e 200 nM (dados não mostrados). A menor concentração com melhor resultado foi de 150 nM. Dessa forma, a concentração dos iniciadores do controle interno foi alterada de 100 nM para 150 nM (**Figura 1**).

Alteração da concentração de iniciadores específicos de 500 nM para 750 nM

Os segundos pares dos iniciadores que amplificam os genes *KIR2DL4*, *KIR2DS2*, *KIR3DS1* e *KIR3DL3* apresentaram padrão de banda com menor intensidade (**Figura 2**). Por isso foi alterada a concentração do segundo par de iniciadores específicos KIR8.5/8.3 (*2DL4*), KIR12.5/12.3 (*2DS2*), KIR22.5/22.3 (*3DS1*), KIR36.5/36.6 (*3DL3*). O melhor resultado foi obtido quando a concentração final dos iniciadores específicos KIR12.5/12.3, KIR22.5/22.3 e KIR36.5/36.6 foi aumentada de 500 nM para 750 nM (**Figura 3**). A concentração final do segundo par de iniciadores (KIR8.5/8.3) que amplifica *KIR2DL4* foi mantida em 500 nM.

Para o gene *KIR2DS3* foram realizados testes com as concentrações finais de 500 nM e 750 nM para os dois pares

Tabela 1 Sequência dos iniciadores utilizados para genotipagem KIR por PCR-SSP

Gene	Iniciador	Sequências	Éxon	Posição	Tamanho
2DL1	KIR1.5/1.3A	GTT GGT CAG ATG TCA TGT TTG AA	4	472-494	~330
		GGT CCC TGC CAG GTC TTG CG	4	598-617	
	KIR2.5/2.3A	TGG ACC AAG AGT CTG CAG GA	8	1159-1178	
		TGT TGT CTC CCT AGA AGA CG	9	1403-1422	
2DL2	KIR3.5/3.3	CTG GCC CAC CCA GGT CG	4	419-435	173
		GGA CCG ATG GAG AAG TTG GCT	4	571-591	
	KIRex5.5/5.3	GAG GGG GAG GCC CAT GAA T	5	813-831	
		TCG AGT TTG ACC ACT CGT AT	5	944-963	
2DL3	KIR5.5/5.3	CTT CAT CGC TGG TGC TG	7	1118-1134	~550
		AGG CTC TTG GTC CAT TAC AA	8	1153-1172	
	KIR6.5/6.3	TCC TTC ATC GCT GGT GCT G	7	1116-1134	
		GGC AGG AGA CAA CTT TGG ATC A	9	1350-1371	
2DL4	KIR7.5/7.3	CAG GAC AAG CCC TTC TGC	3	116-133	254
		CTG GGT GCC GAC CAC T	3	354-369	
	KIR8.5/8.3	ACC TTC GCT TAC AGC CCG	5	709-727	
		GGG TTT CCT GTG ACA GAA ACA G	5	975-996	
2DS2	KIR11.5/11.3	TTC TGC ACA GAG AGG GGA AGT A	4	501-522	173
		AGG TCA CTG GGA GCT GAC AA	4	656-675	
	KIR12.5/12.3	CGG GCC CCA CGG TTT	5	729-743	
		GGT CAC TCG AGT TTG ACC ACT CA	5	946-968	
2DS3	KIR13.5/13.3	TGG CCC ACC CAG GTC G	4	420-435	242
		TGA AAA CTG ATA GGG GGA GTG AGG	4	638-661	
	KIR14.5/14.3	CTA TGA CAT GTA CCA TCT ATC CAC	5	787-810	
		AAG CAG TGG GTC ACT TGA C	5	958-976	
2DS4	9Fa/12Ra	CTG GCC CTC CCA GGT CA TCT GTA	4	416-435	204
		GGT TCC TGC AAG GAC AG	4	600-622	
	del.5B del.3	GTT CAG GCA GGA GAG AAT			
		GTT TGA CCA CTC GTA GGG AGC			
2DS5	13F/9R	TGA TGG GGT CTC CAA GGG	4	557-574	125
		TCC AGA GGG TCA CTG GGC	4	665-682	
2DS1	F1/F2/R3	CTTCTCCATCAGTCGCATGAA	4	578-598	102
		CTTCTCCATCAGTCGCATGAG	4	578-598	
		AGAGGGTCACTGGGAGCTGAC	4	659-679	
3DL1	7Fa/3Ra	CGC TGT GGT GCC TCG A	3	144-163	197
		GGT GTG AAC CCC GAC ATG	3	321-340	
	3DS1..5a/13Ra	CCC TGG TGA AAT CAG GAG AGA G	4	435-456	
		TGT AGG TCC CTG CAA GGG CAA	4	600-620	
3DL2	KIR19.5/19.3	CAA ACC CTT CCT GTC TGC CC	3	121-140	245
		GTG CCG ACC ACC CAG TGA	3	348-365	
	KIR20.5/20.3	CCC ATG AAC GTA GGC TCC G	5	822-840	
		CAC ACG CAG GGC AGG G	5	936-951	
3DS1	Ex9.1/9.3	AGC CTG CAG GGA ACA GAA G	8	1169-1189	~300
		GCC TGA CTG TGG TGC TCG	9	1377-1394	
	KIR22.5/22.3	CCT GGT GAA ATC AGG AGA GAG	4	436-456	
		GTC CCT GCA AGG GCA C	4	600-615	

Tabela 1 Sequência dos iniciadores utilizados para genotipagem KIR por PCR-SSP (cont.)

Gene	Iniciador	Sequências	Éxon	Posição	Tamanho
3DL3	KIR35.5/35.3	GTC AGA TGT CAG GTT TGA GCG	4	467-487	112
		CAT GGA ATA GTT GAC CTG GGA AC	4	556-578	
		GCA GCT CCC GGA GCT TG	5	763-779	
		GGG TCT GAC CAC GCG TG	5	936-952	
2DL5	KIR29.5/29.3	GCG CTG TGG TGC CTC G	3	148-163	214
		GAC CAC TCA ATG GGG GAG C	3	343-361	
		TGC AGC TCC AGG AGC TCA	5	771-788	
		GGG TCT GAC CAC TCA TAG GGT	5	941-961	
2DP1	KIR33.5/33.3	GTC TGC CTG GCC CAG CT	3	134-150	205
		GTG TGA ACC CCG ACA TCT GTA C	3	317-338	
		CCA TCG GTC CCA TGA TGG	4	583-600	
		CAC TGG GAG CTG ACA ACT GAT G	4	651-672	
CONTROLE	IC 5'/IC 3'	TGC CAA GTG GAG CAC CCA A GCA TCT TGC TCT GTG CAG AT			796

Fonte: Martin⁽³⁷⁾.

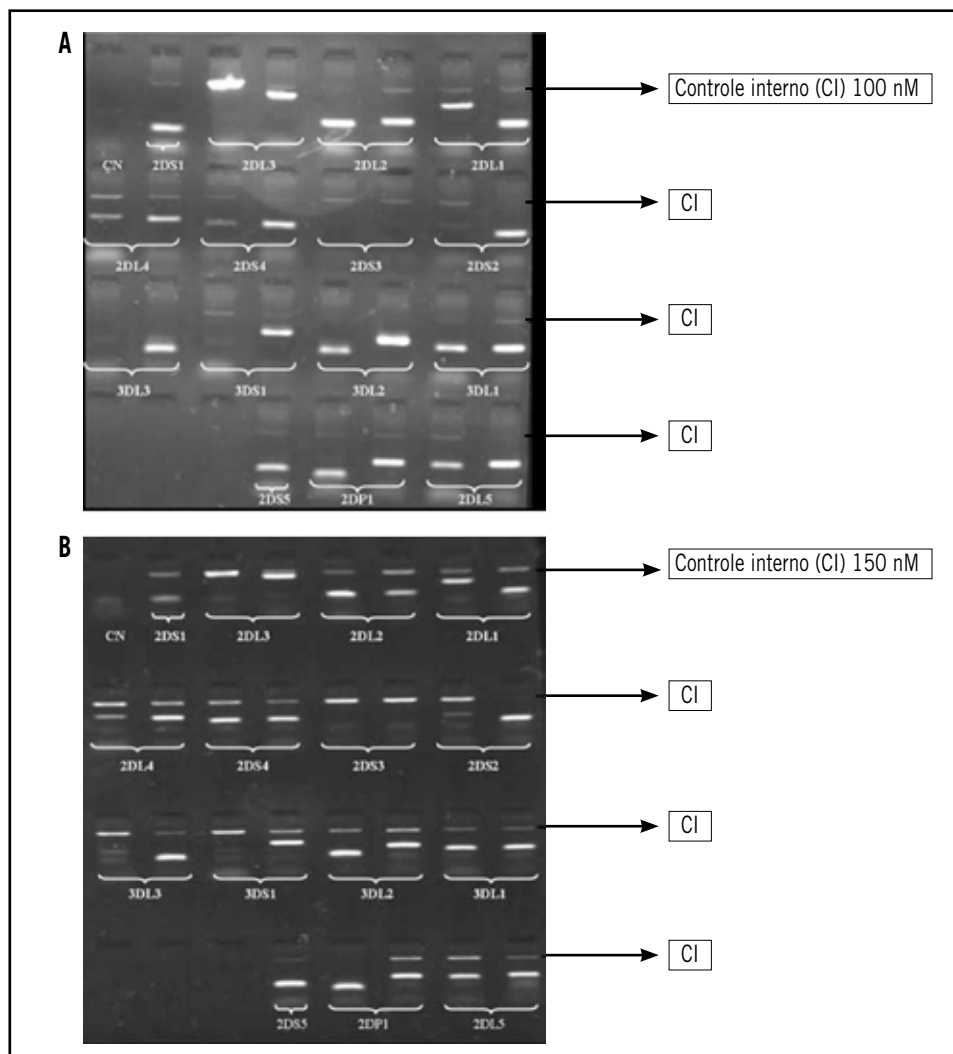


Figura 1 – Fotodocumentação de genotipagem KIR. Concentração final dos iniciadores do controle interno: 100 nM (**A**) e 150 nM (**B**)
CN: controle negativo.

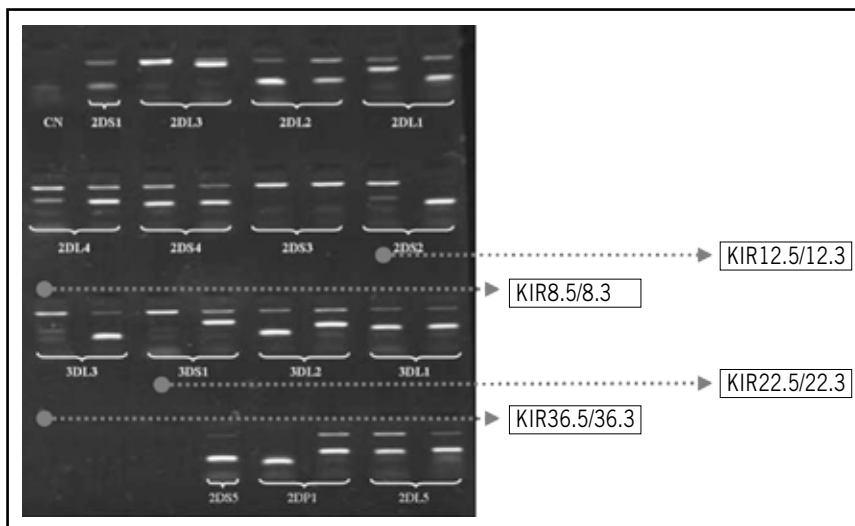


Figura 2 – Padrão de bandas dos genes KIR2DL4, KIR2DS2, KIR3DS1 e KIR3DL3 com iniciadores específicos na concentração de 500 nM. O primeiro e o segundo par de iniciadores localizam-se à direita e à esquerda, respectivamente. Observar que o segundo par de iniciadores destes genes apresentaram padrão de banda de menor intensidade em relação aos demais

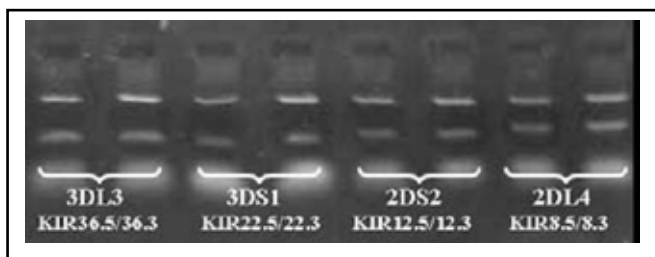


Figura 3 – Padrão de bandas dos genes KIR2DL4, KIR2DS2, KIR3DS1 e KIR3DL3. O segundo par dos iniciadores específicos KIR8.5/8.3 (2DL4), KIR12.5/12.3 (2DS2), KIR22.5/22.3 (3DS1) e KIR36.5/36.6 (3DL3) foi testado na concentração de 750 nM. O teste foi realizado em duplicata

de iniciadores: KIR13.5/13.3 e KIR14.5/14.3. Para ambos, os melhores resultados foram obtidos na concentração final de 750 nM.

Alteração na concentração de cloreto de magnésio (MgCl₂) de 1,5 mM para 2 mM

Como o padrão de banda dos genes KIR2DS2, KIR3DS1 e KIR3DL3 continuava fraco, mesmo após aumento na concentração do segundo par dos iniciadores KIR12.5/12.3 (2DS2), KIR22.5/22.3 (3DS1) e KIR36.5/36.6 (3DL3) para 750 nM, uma modificação na concentração de MgCl₂ foi realizada. A alteração da concentração de 1,5 mM para 2 mM contribuiu para a obtenção de melhores resultados (Figura 4).

Verificação da ocorrência de reações inespecíficas

Na PCR, o cloreto de magnésio atua como cofator para a enzima Taq DNA polimerase e sua presença é indispensável; no entanto, em excesso, pode provocar reações inespecíficas⁽⁴⁴⁾. Em nosso experimento, o desenvolvimento da PCR usando solução de MgCl₂ a 2 mM (acima da recomendada

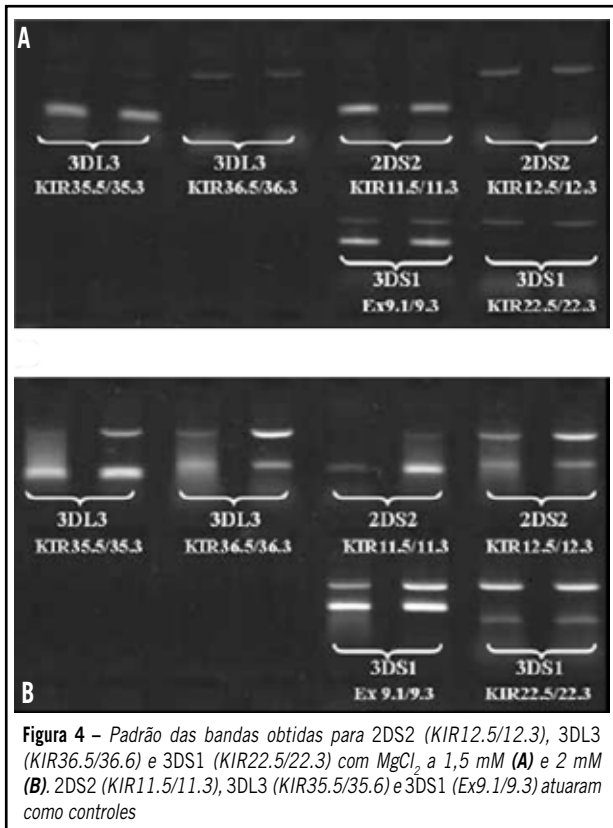
pelo protocolo original, ou seja, 1,5 mM) não provocou a formação de reações inespecíficas, conforme apresentado na Figura 6.

Uso da enzima Taq DNA polimerase recombinante

De acordo com o protocolo padrão, melhores resultados são obtidos com o uso da enzima Platinum® Taq DNA polimerase. No entanto, a enzima Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA) mostrou eficiência na PCR para tipagem de genes KIR. Os resultados são apresentados na Figura 5.

Condições finais da reação

As condições finais da PCR para a tipagem de genes KIR adequadas às nossas condições laboratoriais são descritas a seguir: para 10 µl de reação foram utilizados de tampão PCR 10X – 200 mM Tris-HCl (pH 8,4) e 500 mM KCl; 2 mM de MgCl₂; 200 µM de cada desorribonucleotídeo trifosfatado (dNTP); 150 nM de iniciadores 5' e 3' do controle interno; 750 nM dos iniciadores específicos KIR12.5/12.3 (2DS2), KIR13.5/13.3 e KIR14.5/14.3 (2DS3), KIR22.5/22.3 (3DS1),



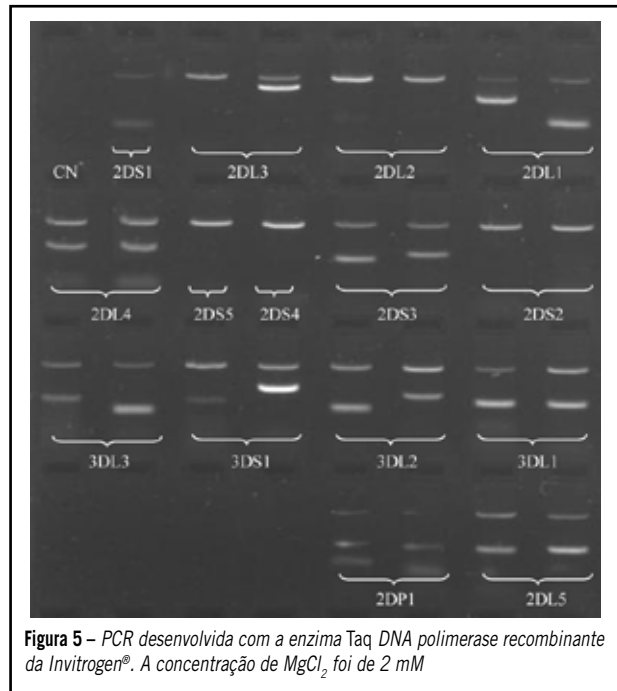
KIR36.5/36.6 (3DL3) e 500 nM para os demais; 0,25 unidade de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA) ou Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA); aproximadamente 10 ng de DNA e água destilada estéril suficiente para completar 10 µl. As temperaturas e condições de amplificação foram mantidas.

Validação do método

As 70 amostras genotipadas por PCR-SSP foram analisadas pelo kit de genotipagem rSSO (One Lambda, Canoga Park, EUA), tecnologia Luminex®. Três amostras apresentaram resultados divergentes em apenas um gene KIR, sendo duas amostras para KIR2DS5 e uma para KIR2DL1, e essas diferenças se mantiveram após a repetição por ambas as técnicas.

Uma amostra genotipada como positiva para o gene KIR2DS5 e outra como positiva para o gene KIR2DL1, pelo método PCR-SSP otimizado, foram genotipadas como negativas pelo método rSSO Luminex®, enquanto, uma amostra genotipada como negativa para o gene KIR2DS5 pelo método PCR-SSP otimizado foi positiva pelo rSSO Luminex.

No entanto, quando essas amostras foram avaliadas pelo kit comercial de genotipagem KIR SSP (DYNAL® Invitrogen Corporation, lote 003), para confirmação dos resultados,



houve concordância com todos os resultados referentes às reações da PCR-SSP otimizada.

Discussão

A partir da genotipagem KIR descrita por Uhrberg *et al.*⁽⁵³⁾, vários grupos desenvolveram metodologias para a tipagem destes genes^(9, 19, 34, 41, 51), de forma a obter um aprimoramento na identificação dos genes e permitir a definição dos alelos.

Os métodos utilizados para detectar a presença ou ausência de genes KIR se baseiam em técnicas de biologia molecular. Pela técnica RT-PCR, Uhrberg *et al.*⁽⁵³⁾ verificaram que a combinação de genes KIR em humanos é altamente polimórfica, levando à expressão de diferentes fenótipos. No mesmo estudo, eles desenvolveram a metodologia PCR-SSP para identificar 12 genes KIR a partir do DNA genômico, obtido de células mononucleares do sangue periférico.

Crum *et al.*⁽⁹⁾ utilizaram a técnica molecular PCR-SSOP para tipagem de 12 genes KIR, com base na amplificação de três diferentes regiões: os domínios extracelulares do tipo imunoglobulina proximal e distal à membrana e os domínios transmembranaral-citoplasmático, seguida da hibridização com sondas de sequência específica marcadas com digoxigenina. Por esta técnica também conseguiram distinguir dois alelos de KIR3DL1.

Em 2002, Gómez-Lozano e Vilches⁽¹⁹⁾ identificaram genes e pseudogenes recém-descritos KIR2DLS, KIR3DL3,

KIR3DP1 e *KIR2DP1* e as variantes de *KIR2DLS*, utilizando a técnica PCR-SSP.

A genotipagem KIR pela técnica PCR-SSP, utilizando iniciadores que fornecem pequenos amplicons (108-565 pb), foi descrita por Sun *et al.*⁽⁵¹⁾ e aprimorada por Martin⁽³⁷⁾. Essa técnica apresentou como vantagens a economia no custo de reagentes e de mão de obra qualificada e a obtenção de bons resultados com DNA parcialmente degradado.

A técnica rSSO com tecnologia Luminex® para tipagem dos genes e alelos KIR foi descrita por Nong *et al.*⁽⁴¹⁾. Essa técnica apresenta como vantagens a determinação de alelos nulos não identificados por métodos convencionais e permite a análise de várias amostras em um sistema múltiplo. No entanto, o custo é elevado quando comparado com as outras técnicas.

Neste estudo, a proposta foi a otimização de uma metodologia de genotipagem KIR por PCR-SSP, de baixo custo, fácil execução, reprodutível e confiável, utilizando iniciadores sintetizados. A metodologia foi baseada na PCR-SSP descrita por Martin⁽³⁷⁾, que permitiu a detecção de 14 genes KIR e um pseudogene, o *KIR2DP1*. O produto de amplificação foi um pequeno fragmento em sua maioria, de 90 a 200 pb; dois produtos apresentaram aproximadamente 300 pb, um 550 pb e outro com 800 pb. Todos os produtos foram facilmente identificados e definidos em gel de agarose.

Para a confiabilidade das reações foi utilizado um controle interno para cada reação que amplifica o terceiro íntron do gene HLA-DRB1, cujo produto é um fragmento de 796 pb. O uso do controle interno na PCR determina se a ausência de amplificação específica é realmente devida à ausência do gene na amostra de DNA, e não à falha de amplificação de PCR⁽¹²⁾. Devido a diferentes concentrações e temperaturas de hibridização dos iniciadores específicos comparados com os iniciadores do controle interno, a intensidade da banda do controle geralmente foi menos intensa quando ocorreu amplificação específica^(12, 19).

Para confirmar a presença ou ausência de um determinado gene foram realizadas duas reações com diferentes pares de iniciadores, os quais amplificavam diferentes éxons de um mesmo gene, exceto para *KIR2DS1* e *KIR2DSS*, com reação única.

A análise envolveu 15 genes em 70 indivíduos não relacionados pela técnica PCR-SSP otimizada e por rSSO sistema Luminex®, totalizando 1.050 tipagens. Do total das amostras avaliadas, foram observados resultados divergentes para três genes, sendo um para o gene *KIR2DL1* e outros dois para o gene *KIR2DSS* (0,29%; $p = 0,2478$).

Esses resultados se mantiveram conflitantes após repetição das genotipagens por ambas as metodologias.

Em função desses resultados conflitantes, foi utilizada uma terceira metodologia, que usa o kit comercial de genotipagem KIR SSP (DYNAL® Invitrogen Corporation, lote 003) para genotipar essas amostras. Os resultados foram concordantes com aqueles obtidos na PCR-SSP otimizada e, conseqüentemente, discordantes do método rSSO comercial Luminex®. Dessa forma podemos observar que todos os resultados obtidos na PCR-SSP otimizada foram confirmados por uma ou outra técnica comercial.

Podem existir algumas explicações para essas divergências, como a especificidade dos *primers* e sondas utilizados nas técnicas de SSO e SSP, os quais podem se ligar a regiões diferentes dos genes *KIR2DSS* e *KIR2DL1*; a utilização de um único *primer* e sonda para identificar o gene *KIR2DSS*, pela ausência de outra sequência capaz de identificá-lo; problemas técnicos, como a reduzida ou aumentada sensibilidade dos *primers* usados, resultando em falsos positivos ou falsos negativos ou a caracterização de variantes alélicas. O sequenciamento genômico é a única maneira de averiguar esses achados.

Interessantemente, resultados divergentes também foram observados em uma caracterização multilaboratorial (três laboratórios) de genotipagem KIR para o Décimo Workshop Internacional de Histocompatibilidade⁽⁷⁾. Do total de 25 linhagens celulares, três apresentaram divergências para esses mesmos genes, *KIR2DL1* e *KIR2DSS*, quando genotipadas pelas técnicas de PCR-SSP e PCR-SSOP.

Esses resultados poderiam sugerir que a tipagem para esses particulares genes KIR devem ser observadas com cautela e que futuros estudos são necessários para resolver esse fato, o que pode incluir a construção de *primers* e sondas mais específicos.

Uma das vantagens dessa técnica foi relacionada com a concentração de DNA, ou seja, 10 ng em cada reação. No entanto, a qualidade e a concentração de DNA são pontos críticos da reação. Outras vantagens foram o baixo custo, pois utiliza pouca quantidade de reagentes (volume final da reação foi de 10 µl), e a possibilidade de ser desenvolvida em laboratório de biologia molecular sem a exigência de equipamentos sofisticados. Além disso, a enzima Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA) pôde ser substituída pela *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA), de menor custo.

Finalmente, essa técnica mostrou sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e que pode ser de fácil execução para a maioria dos laboratórios de biologia molecular.

Conclusão

A metodologia PCR-SSP otimizada neste estudo pode ser utilizada por laboratórios de biologia molecular em diversos estudos de genotipagem KIR, a qual se mostrou sensível, específica, reprodutível, de fácil execução e baixo custo.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos voluntários que participaram deste estudo e ao Dr. Eduardo José Melo dos Santos e à Dra. Luiza Tamie Tsuneto pelas sugestões e críticas na leitura do manuscrito.

Referências

1. BECKER, S. *et al.* Assessment of killer cell immunoglobulinlike receptor expression and corresponding HLA class I phenotypes demonstrates heterogenous KIR expression independent of anticipated HLA class I ligands. *Hum Immunol*, v. 64, n. 2, p. 183-93, 2003.
2. BERAN, M.; HANSSON, M.; KIESSLING, R. Human natural killer cells can inhibit clonogenic growth of fresh leukemic cells. *Blood*, v. 61, n. 3, p. 596-9, 1983.
3. BESSON, C. *et al.* Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with Hodgkin's Lymphoma in a familial study. *PLoS ONE*, v. 2, n. 5, e406, p. 1-10, 2007.
4. BIRON, C.A. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Opin Immunol*, v. 9, n. 1, p. 24-34, 1997.
5. BONTADINI, A. *et al.* Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genes in the Italian Caucasian population. *J Transl Med*, v. 4, 44, 2006.
6. COLONNA, M. *et al.* Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science*, v. 260, n. 5111, p.1121-24, 1993.
7. COOK, M. A. *et al.* A multi-laboratory characterization of the KIR genotypes of 10th international histocompatibility workshop cell lines. *Hum Immunol*, v. 64, n. 5, p. 567-71, 2003.
8. COOK, M. A.; MOSS, P. A. H.; BRIGGS, D. C. The distribution of 13 killer-cell immunoglobulin-like receptor *loci* in UK blood donors from three ethnic groups. *Eur J Immunogenet*, v. 30, n. 3, p. 213-21, 2003.
9. CRUM, K. A. *et al.* Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires. *Tissue Antigens*, v. 56, n. 4, p. 313-26, 2000.
10. DE OLIVEIRA, D. C. M. *et al.* Identificação dos genótipos KIR na população brasileira. *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 28, Suppl. 1, p. 22-34, 2006.
11. DENIS, L. *et al.* Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Réunion. *Tissue Antigens*, v. 66, n. 4, p. 267-76, 2005.
12. DYNAL. *Tissue typing Dynal-SSP*. Technical handbook. 1. ed. Norway, 1996. 63 p.
13. EWERTON, P. D. *et al.* Amazonian Amerindians exhibit high variability of KIR profiles. *Immunogenetics*, v. 59, n. 8, p. 625-30, 2007.
14. FLORES, A. C. *et al.* KIR genes polymorphism in Argentinean Caucosoid and Amerindian populations. *Tissue Antigens*, v. 69, n. 6, p. 568-76, 2007.
15. FLORES-VILLANUEVA, P. O. *et al.* Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 98, n. 9, p. 5140-5, 2001.
16. FRASSATI, C. *et al.* Distribution of killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) in Comoros and Southeast France. *Tissue Antigens*, v. 67, n. 5, p. 356-67, 2006.
17. GARCIA, C.A. *et al.* Human KIR sequences 2003. *Immunogenetics*, v. 55, n. 4, p.227-39, 2003.
18. GENDZEKHADZE, K. *et al.* High KIR diversity in Amerindians is maintained using few gene-content haplotypes. *Immunogenetics*, v. 58, n. 5-6, p. 474-80, 2006.
19. GÓMEZ-LOZANO, N. *et al.* Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. *Immunogenetics*, v. 54, n. 5, p. 314-9, 2002.
20. GÓMEZ-LOZANO, N.; VILCHES, C. Genotyping of human killer-cell immunoglobulin-like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence-specific primers: an update. *Tissue Antigens*, v. 59, n. 3, p. 184-93, 2002.
21. GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, M. E. *et al.* KIR gene in ethnic and mestizo populations from Mexico. *Hum Immunol*, v. 67, n. 1-2, p. 85-93, 2006.
22. HAYAKAWA, Y.; SMYTH, M. J. Innate immune recognition and suppression of tumors. *Adv Cancer Res*, v. 95, p.293-322, 2006.
23. HERCEND, T. *et al.* Characterization of natural killer cells with antileukemia activity following allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, v. 67, n. 3, p. 722-8, 1986.
24. HSU, K.C. *et al.* 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*, v. 169, n. 9, p. 5118-29, 2002.
25. IPD-KIR DATABASE. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/stats.html>>. Acesso em: 29 out. 2009.
26. JENNES, W. *et al.* Cutting edge: resistance to HIV-1 infection among African female sex workers is associated with inhibitory KIR in the absence of their HLA ligands. *J Immunol*, v. 177, n. 10, p. 6588-92, 2006.
27. JIANG, K. *et al.* Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population. *Tissue Antigens*, v. 65, n. 6, p. 556-63, 2005.
28. JONES, D. C. *et al.* Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combinations in ulcerative colitis

- susceptibility. *Genes Immun*, v. 7, n. 7, p. 576-82, 2006.
29. KÄRRE, K. NK cells, MHC class I molecules and missing self. *Scand J Immunol*, v. 55, n. 3, p. 221-8, 2002.
 30. KHAKOO, S. I. *et al.* HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving Hepatitis C virus infection. *Science*, v. 305, n. 5685, p. 872-4, 2004.
 31. LANIER, L. L. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*, v. 16, p. 359-93, 1998.
 32. LÓPEZ-VÁZQUEZ, A. *et al.* Interaction between KIR3DL1 and HLA-B*57 supertype alleles influences the progression of HIV-1 infection in a Zambian population. *Hum Immunol*, v. 66, n. 3, p. 285-9, 2005.
 33. LUSZCZEK, W. *et al.* Inhibitory and activatory KIR gene frequencies in the Polish population. *Int J Immunogenet*, v. 33, n. 3, p. 167-70, 2006.
 34. MAHFOUZ, R. *et al.* Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genotypes in the Lebanese population. *Tissue Antigens*, v. 68, n. 1, p. 66-71, 2006.
 35. MARSH, S. G. E. *et al.* Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Immunogenetics*, v. 55, n. 4, p. 220-6, 2003.
 36. MARTIN, M. P. *et al.* Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet*, v. 31, n. 4, p. 429-34, 2002.
 37. MARTIN, M. P. Tipagem de genes KIR e sua aplicação em estudos de populações, associação com doenças e transplantes. In: VIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA, 2004, Curitiba.
 38. MAXWELL, L. D. *et al.* Investigation of KIR diversity in immunosenescence and longevity within the Irish population. *Exp Gerontol*, v. 39, n. 8, p. 1223-32, 2004.
 39. MORETTA, A. *et al.* Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med*, v. 182, n. 3, p. 875-84, 1995.
 40. NIOKOU, D. *et al.* Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors in the Greek population. *Hum Immunol*, v. 64, n. 12, p. 1167-76, 2003.
 41. NONG, T. *et al.* KIR genotyping by reverse sequence-specific oligonucleotide methodology. *Tissue Antigens*, v. 69, Suppl. 1, p. 92-5, 2007.
 42. NORMAN, P. J. *et al.* Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. *Immunogenetics*, v. 52, n. 3-4, p. 195-205, 2001.
 43. NORMAN, P. J. *et al.* Natural killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) locus profiles in African and South Asian populations. *Genes Immun*, v. 3, n. 2, p. 86-95, 2002.
 44. PROMEGA. *PCR core systems*. Technical bulletin. N. 254 USA, 2001. 20 p.
 45. RAJALINGAM, R. *et al.* Distinctive KIR and HLA diversity in a panel of north Indian Hindus. *Immunogenetics*, v. 53, n. 12, p. 1009-19, 2002.
 46. RAJALINGAM, R. *et al.* Identification of seventeen novel KIR variants: fourteen of them from two non-Caucasian donors. *Tissue Antigens*, v. 57, n. 1, p. 22-31, 2001.
 47. RUDNICK, C. C. *et al.* Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Southern Brazilian population from the state of Paraná. *Hum Immunol*, v. 69, n. 12, p. 872-6, 2008.
 48. RUGGERI, L. *et al.* Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, v. 94, n. 1, p. 333-39, 1999.
 49. SANTIN, I. *et al.* Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes in the Basque population: association study of KIR gene contents with type I Diabetes Mellitus. *Hum Immunol*, v. 67, n. 1-2, p. 118-24, 2006.
 50. SHILLING, H. G. *et al.* Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *J Immunol*, v. 168, n. 5, p. 2307-15, 2002.
 51. SUN, J.Y. *et al.* Development of a multiplex PCR-SSP method for killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping. *Tissue Antigens*, v. 64, n. 4, p. 462-68, 2004.
 52. TONEVA, M. *et al.* Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. *Tissue Antigens*, v. 57, n. 4, p. 358-62, 2001.
 53. UHRBERG, M. *et al.* Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*, v. 7, n. 6, p. 753-63, 1997.
 54. VELICKOVIC, M.; VELICKOVIC, Z.; DUNCKLEY, H. Diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Pacific Islands populations. *Immunogenetics*, v. 58, n. 7, p. 523-32, 2006.
 55. WHANG, D. H. *et al.* Haplotype analysis of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in 77 Korean families. *Hum Immunol*, v. 66, n. 2, p. 146-154, 2005.
 56. WILSON, M. J. *et al.* Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 97, n. 9, p. 4778-83, 2000.
 57. WITT, C. S. *et al.* Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. *Transplantation*, v. 68, n. 11, p. 1784-89, 1999.
 58. YANG, Q. *et al.* Antitumor activity of NK cells. *Immunol Res*, v. 36, n. 1-3, p. 13-25, 2006.
 59. YAWATA, M. *et al.* Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression. *Immunogenetics*, v. 54, n. 8, p. 543-50, 2002.

Endereço para correspondência

Jeanete Eliete Laguilha Visentainer
 Universidade Estadual de Maringá
 Departamento de Ciências Básicas da Saúde
 Laboratório de Imunogenética
 Av. Colombo, 5.790
 CEP: 87020-900 - Maringá-PR
 Tel.: (44) 3011-4864
 Fax: (44) 3011-4931
 e-mail: jelvisentainer@uem.br;
 jelvisentainer@gmail.com