



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ASSOCIAÇÃO DOS GENES *KIR2DL2/KIR2DL3* E ALELOS DE HLA-C
DO GRUPO 1 COM A MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-
1/PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL (HAM/TSP)**

IGOR IVES SANTOS FRAGA

**Salvador – Bahia – Brasil
2014**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**ASSOCIAÇÃO DOS GENES *KIR2DL2/KIR2DL3* E ALELOS HLA-C DO
GRUPO 1 COM A MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-
1/PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL (HAM/TSP)**

IGOR IVES SANTOS FRAGA

Orientadora: Maria Fernanda Rios Grassi

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Mestre.

**Salvador – Bahia – Brasil
2014**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Fraga, Igor Ives Santos

F811a Associação dos genes *KIR2DL2/KIR2DL3* e alelos HLA-C do grupo 1 com a
mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). /
Igor Ives Santos Fraga. - 2014.

58f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Maria Fernanda Rios Grassi

Laboratório Avançado de Saúde Pública.

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz, 2014.

1. HTLV-1. 2. Receptores KIR. 2. Mielopatia associada ao HTLV-1. 3.
HLA. I. Título.

CDU 616.98

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar forças e me iluminar em todos os meus desafios.

À Fernanda Grassi, minha orientadora, pela oportunidade concedida, pelos ensinamentos, pela confiança e paciência.

À Viviana Olavarria, pela imensa colaboração nesse estudo, ensinamentos passados, pela amizade, pelo constante incentivo, pela conversas e momentos de descontração.

Ao Dr. Galvão pela oportunidade de trabalhar no Centro de HTLV.

Ao corpo docente do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz que foram fundamentais para minha formação acadêmico-científica.

Aos funcionários da Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna pela disponibilidade e suporte oferecido.

Aos pacientes do Centro de HTLV que, sempre generosos, aceitam participar dos nossos projetos de pesquisa.

À toda equipe do LASP, que me ajudaram e compartilharam experiências comigo.

À Andreas Stöcker pela sua colaboração essencial na padronização do PCR deste estudo.

Aos meus pais e minha irmã que sempre me apoiaram, me deram suporte emocional e nunca mediram esforços para eu atingir meus objetivos. Vocês são meus pilares, amo vocês.

À minha namorada, Luana Nobre, por sempre estar ao meu lado, pelo seu amor, incentivo, companheirismo e por me fazer tão feliz.

Aos amigos do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Afrânio, Candace, Carol, Jaqueline, Maíra, Marcus, Regina, Tayane, dentre outros, pelas conversas científicas ou não, pelos cafezinhos compartilhados, pelas experiências e discussões que engradeceram muito meu aprendizado, além das inúmeras confraternizações e momentos de descontração.

Aos meus grandes amigos Alex e Maurício, pelo companheirismo e pela amizade mesmo estando distantes.

Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.

(Albert Einstein)

FRAGA, Igor Ives Santos. Associação dos genes *KIR2DL2/KIR2DL3* e alelos HLA-C do grupo 1 com a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). 58 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

RESUMO

O controle da carga proviral do HTLV-1 depende em parte da lise de células infectadas por células citotóxicas mediada pelos linfócitos T CD8⁺ e pelas células NK (*Natural killer*). A família de receptores KIR (*killer-cell immunoglobulin-like receptor*) interage com as moléculas de HLA de classe I, principalmente os alelos do HLA C do grupo 1 (*C*01, C*03, C*07, C*08, C*12, C*13, C*14 e C*16*), ativando ou inibindo a função destas células. O objetivo do presente estudo foi avaliar se os genes *KIR2DL2/KIR2DL3* e os alelos de HLA-C do grupo 1 estão associados ao controle da carga proviral do HTLV-1 e ao diagnóstico de HAM/TSP. O estudo foi realizado no Centro de HTLV da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, em Salvador-Bahia. A presença dos genes *KIR2DL2* e *KIR2DL3* foi determinada por PCR em tempo real (Syber Green). Foram incluídos 248 indivíduos infectados pelo HTLV-1 (161 assintomáticos e 87 com HAM/TSP) cujos alelos de HLA de classe I haviam sido previamente determinados. A carga proviral (quantificada por PCR em tempo real) e as frequências de indivíduos assintomáticos e com diagnóstico de HAM/TSP (Possível, Provável e Definido) foram comparadas de acordo com a presença ou ausência dos genes KIR avaliados. As frequências dos genes *KIR2DL2* e *KIR2DL3* foi 84,3% e 96,8%, respectivamente. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na frequência de indivíduos que possuíam os genes (*KIR2DL2* ou *KIR2DL3*) nos grupos clínicos, assim como na frequência de indivíduos que tinham simultaneamente os genes KIR e os alelos de HLA-C do grupo 1. Os indivíduos do grupo HAM/TSP possível que apresentavam o gene *KIR2DL2* tinham menor carga proviral (2,9% de células infectadas) que os indivíduos sem este gene (19,2% de células infectadas) ($p < 0,001$). Quando avaliamos a combinação da presença do gene *KIR2DL2* com os alelos de HLA-C do grupo 1, menor carga proviral (2,1%) foi observada nos indivíduos que apresentavam algum dos alelos de HLA-C do grupo 1, comparados aqueles que portavam apenas *KIR2DL2* (5,0%) ($p = 0,013$). Menor carga proviral também foi observada nos indivíduos assintomáticos que portavam simultaneamente o gene *KIR2DL2* e o alelo *HLA-C*07*, comparados aos indivíduos com apenas o gene *KIR2DL2* ($p = 0,03$), enquanto que os indivíduos com HAM/TSP-PB que tinham essa combinação (*KIR2DL2/HLA-C*07*) apresentaram tendência de menor carga proviral

($p=0,051$). Em conclusão, a presença da combinação do gene *KIR2DL2* e de algum alelo de HLA-C do grupo 1 está associada ao controle da carga proviral. Este estudo quantificou pela primeira vez as frequências de genes KIR em uma coorte de indivíduos infectados pelo HTLV-1 do estado da Bahia. Estudos futuros são necessários para confirmar estes achados em outras populações e avaliar o valor prognóstico da associação de *KIR2DL2* e HLA-C do grupo 1.

Palavras-chaves: HTLV-1; Receptores KIR; HAM/TSP; HLA.

FRAGA, Igor Ives Santos. Association of genes *KIR2DL2/KIR2DL3* and HLA-C alleles group 1 with associated myelopathy HTLV-1/tropical spastic paraparesis (HAM / TSP). 58 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

ABSTRACT

The control of proviral load of HTLV-1 depends in part of the lysis of infected cells mediated by cytotoxic CD8⁺T lymphocytes and NK (Natural killer) cells. The family of KIR (killer-cell immunoglobulin-like receptor) interacts with HLA class I molecules, especially those HLA-C alleles in-group 1 (*C*01*, *C*03*, *C*07*, *C*08*, *C*12*, *C*13*, *C*14* and *C*16*) by activating or inhibiting the function of these cells. The aim of this study was to evaluate if the *KIR2DL2*, *KIR2DL3* genes and group 1 HLA-C alleles are associated with the control of proviral load of HTLV-1 and the diagnosis of HAM/TSP. The study was performed at Bahiana School HTLV Center of Medicine and Health Public, in Salvador, Bahia. The presence of *KIR2DL2* and *KIR2DL3* genes was determined by real-time PCR (Syber Green). The study included 248 subjects infected with HTLV-1(161 and 87 asymptomatic with HAM/TSP) whose HLA class I alleles were previously determined. The proviral load (quantified by real-time PCR) and the frequency asymptomatic individuals diagnosed with HAM/TSP (possibly, probably and definitive) were compared according to the presence or absence of KIR genes evaluated. The frequencies of *KIR2DL2* and *KIR2DL3* genes were 84.3% and 96.8%, respectively. No statistically significant differences were observed in the frequency of individuals who possessed the genes (*KIR2DL2* or *KIR2DL3*) in clinical groups, as well as the frequency of individuals who had both the KIR genes and HLA-C alleles group 1. Individuals in the group HAM/TSP possible to *KIR2DL2* showed that the gene had lower proviral load (2.9% of cells infected) individuals without this gene (19.2% infected cells) ($p < 0.001$). When we evaluated the combination of the presence of *KIR2DL2* and *2DL3* genes with HLA-C genes in group 1, lower proviral load (2.1%) was observed in individuals with any of the alleles of HLA-C group 1, compared who those which harbored only *KIR2DL2* (5.0%) ($p = 0.013$). Minor proviral load was also observed in asymptomatic individuals which carried both the *KIR2DL2* gene and *HLA-C*07* allele when compared to individuals with only *KIR2DL2* gene ($p = 0.03$), whereas patients with HAM/TSP-PB that had this combination (*KIR2DL2/HLA-C*07*) tended to lower proviral load ($p = 0.051$). In conclusion, the presence of the combination of *KIR2DL2* gene and a HLA-C group 1 allele is associated with proviral load control. This study quantified for the first time the frequencies of KIR genes in a cohort of

individuals infected with HTLV-1 in Bahia. Future studies are needed to confirm these findings in other populations and to evaluate the prognostic value of *KIR2DL2* association and HLA-C group 1.

Keywords: HTLV-1; KIR; HAM/TSP; HLA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição global da infecção pelo HTLV-1. Fonte: Jacobson, 2013	21
Figura 2.	Soroprevalência da infecção pelo HTLV-1 em bancos de sangue dos 26 estados do Brasil e do Distrito Federal. Fonte: Catalan-Soares, 2005.	21
Quadro 1.	Doenças associadas à infecção pelo HTLV-1. Fonte: Gessain, 2012.	21
Quadro 2.	Critérios de Belém para diagnóstico de HAM/TSP.	23
Figura 3	Receptores das células NK e seus supostos ligantes. BAT-3, transcrito 3 associado a HLA-B; CRTAM, molécula associada a células T restritas a classe I; HA, hemaglutinina; HLA-E, antígeno de histocompatibilidade de classe I cadeia alfa E; IgG, imunoglobulina G, LFA-1, antígeno associado a função de leucócitos 1; LLT1, transcrito semelhante a lectina 1; TIGIT, imunoglobulina de células T e domínio ITIM. Fonte: Chan, 2014.	29
Figura 4	Representação do gene ancestral de KIR. Fonte: Barishova, 2006	31
Figura 5	Domínios extracelulares dos receptores KIR: DO, D1 e D2. As caudas citoplasmáticas poder ser curtas (S) de ativação ou longas (L) de inibição. Fonte: Barishova, 2006	31
Figura 6	Receptores KIR e seus ligantes HLA de classe I. Fonte: Rajalingam, 2012.	34
Figura 7	Fluxograma de seleção dos pacientes infectados pelo HTLV-1	37
Quadro 3.	Primers utilizados para amplificação dos genes <i>KIR2DL2</i> e <i>KIR2DL3</i> . Fonte: Vilches, 2007.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características gerais dos pacientes infectados pelo HTLV-1 assintomáticos e com diagnóstico de HAM/TSP de acordo com os critérios de Belém (Possível, Provável e Definido)	40
Tabela 2	Frequência dos genes <i>KIR2DL2</i> e <i>2DL3</i> e associação com os alelos de HLA-C do grupo 1 em pacientes infectados com HTLV-1 de acordo com o diagnóstico clínico	41
Tabela 3	Carga proviral dos pacientes infectados pelo HTLV-1 de acordo com a presença dos genes <i>KIR2DL2</i> e <i>2DL3</i>	41
Tabela 4	Influência da associação dos genes <i>KIR2DL2</i> e <i>2DL3</i> e alelos de HLA-C do grupo 1 sobre a carga proviral	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
AP-1	Ativador de proteína-1
ASS	Assintomático
ATL	Leucemia/Linfoma de células T do adulto
BAT-3	Transcrito 3 associado ao HLA-B
CA	Capsídeo
CHTLV	Centro de HTLV-1
CMV	Citomegalovírus
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc
CRTAM	Molécula associada a células T restritas a classe I
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DAP-12	Proteína de ativação de DNAX
EBV	Vírus Epstein-Barr
GLUT-1	Transportador de glicose-1
HA	Hemaglutinina
HAM/TSP	Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia espástica tropical
HBZ	Fator de leucina zíper
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HSPG	ProteoglicanoHeparan Sulfato
HTLV-1	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do tipo 1
HTLV-2	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do tipo 2
HTLV-3	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do tipo 3
HTLV-4	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do tipo 4
IL-2	Interleucina 2
IL-2R	Receptor de interleucina 2
INF- γ	Interferon gama
ITAM	Motivos de ativação com base na tirosina do imunorreceptor
ITIM	Motivos de inibição com base na tirosina do imunorreceptor
Kb	Quilobase
KIR	Receptores semelhantes a imunoglobulina das células <i>killers</i>
LCR	Complexo de receptores de leucócitos
LFA-1	Antígeno 1 associado à função de linfócitos
LLT1	Transcrito semelhante a lectina 1
LTR	Sequências terminais repetitivas longas
MA	Proteína matrix
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal

NCR	Receptores de citotoxicidade natural
NF-KB	Fator de Transcrição Nuclear
NK	<i>Natural killers</i>
NRP-1	Neuropilina 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Fases de leitura abertas (<i>Open reading frame</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
SNC	Sistema nervoso central
STLV-1	Vírus linfotrópico de células T de símios do tipo 1
STLV-2	Vírus linfotrópico de células T de símios do tipo 2
STLV-3	Vírus linfotrópico de células T de símios do tipo 3
SU	Proteína de superfície
SyK	Proteína tirosina kinase esplênica
TCR	Receptor de linfócitos T
TGF-β	Fator transformador de crescimento β
TM	Proteína transmembrana
TNF	Fator de necrose tumoral
ZAP-70	Proteína kinase 70 associada a cadeia zeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	HISTÓRICO	17
2.2	ESTRUTURA E GENOMA DO HTLV-1.....	18
2.3	CICLO VIRAL.....	19
2.4	EPIDEMIOLOGIA	20
2.6	CARGA PROVIRAL.....	25
2.7	CÉLULAS NK (NATURAL KILLERS)	27
2.8	RECEPTORES KIR.....	30
2.9	HAPLÓTIPOS KIR	32
2.10	EXPRESSÃO DE KIR.....	33
2.11	LIGANTES DOS RECEPTORES KIR	34
4.13	KIR E INFECÇÕES VIRAIS	35
3	OBJETIVOS	37
3.1	GERAL	37
3.2	ESPECÍFICOS	37
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	38
4.1	DESENHO DO ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	38
4.2	QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DO HTLV-1.....	39
4.3	FREQUÊNCIA DOS GENES KIR2DL2 E KIR2DL3	40
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5	RESULTADOS	42
6	DISCUSSÃO	45
7	CONCLUSÕES	48
8	PERSPECTIVAS	49
	REFERÊNCIAS	50
	APÊNDICE	62

1. INTRODUÇÃO

O vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus humano identificado, associado a doenças. No Brasil, Salvador está entre as cidades que apresentam as maiores prevalências: 1,3% entre doadores de sangue e 1,8% na população geral (DOURADO et al., 2003; GALVAO-CASTRO et al., 1997). O HTLV-1 é o agente etiológico da mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) (GESSAIN et al., 1985), da leucemia de células T adultas (ATL) (HINUMA et al., 1981) e da uveíte associada ao HTLV-1 (MOCHIZUKI et al., 1992). Contudo, a maioria dos indivíduos infectados pelo vírus não desenvolve estas doenças.

A HAM/TSP é uma disfunção neurológica que resulta em uma paraparesia espástica, com perda progressiva da função motora, principalmente nos membros inferiores. A patogenia da HAM/TSP não está completamente esclarecida, mas a carga proviral tem sido descrito como importante fator. Diversos estudos indicam que pacientes com HAM/TSP têm carga proviral significativamente maior que indivíduos assintomáticos (GRASSI et al., 2011; OLINDO et al., 2005).

A carga proviral nos portadores do HTLV-1 é mantida pela proliferação dos linfócitos T infectados e é parcialmente controlada pela resposta imune celular. Os linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CTLs) lisam as células infectadas através do reconhecimento de peptídeos virais apresentados pelas moléculas de HLA de classe I presentes na superfície da célula infectada. Alguns poucos estudos relatam a associação entre alelos de HLA de classe I e o desenvolvimento ou proteção de doenças associadas ao HTLV-1, porém com resultados controversos. No Japão, em estudos conduzidos em pacientes infectados pelo HTLV-1, foi descrito que os alelos *HLA-A*02* e *HLA-C*08* estavam associados a menor risco de desenvolvimento de HAM/TSP e ao controle maior da carga proviral. Por outro lado, o alelo *HLA-B*5401* foi associado a maior risco de HAM/TSP e elevada carga proviral (JEFFERY et al., 2000). No Irã, não foram observadas associações entre a presença de alelos do HLA de classe I e desenvolvimento ou proteção de HAM/TSP (SABOURI et al., 2005). No Brasil, o alelo *HLA-A*02* foi mais comum em pacientes assintomáticos e, na ausência deste, o *HLA-C*07* foi associado à presença de HAM/TSP. O *HLA-B*5401* não foi encontrado na população brasileira estudada e a frequência do alelo *HLA-C*08* foi semelhante entre indivíduos assintomáticos e com HAM/TSP (CATALAN-SOARES et al., 2009).

As células NK, células citotóxicas da imunidade inata, também são importantes para o controle da carga proviral. A função das células NK é controlada pelo equilíbrio entre sinais de inibição e de ativação que envolvem os receptores transmembranares KIR (*killer immunoglobulin-like receptors*) (MINGARI; MORETTA; MORETTA, 1998). A família KIR é composta por 14 receptores expressos principalmente em células NK e em alguns subtipos de linfócitos T. Estes receptores interagem com moléculas de HLA classe I e podem ativar ou inibir a função destas células (PARHAM, 2005). Em pacientes japoneses, a presença do gene *KIR2DL2* reforçava tanto o efeito protetor do alelo *HLA-C*08* quanto o efeito prejudicial do alelo *HLA-B*54* (SEICH AL BASATENA et al., 2011). No entanto, no Peru estes resultados não foram observados (TALLEDO et al., 2010). O presente estudo pretende avaliar se a presença dos genes *KIR2DL2* e *KIR2DL3* em combinação com genes de HLA-C do grupo I está associada ou não ao diagnóstico de HAM/TSP e ao controle da carga proviral em pacientes de Salvador, Bahia.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo-1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus humano a ser identificado, sendo primeiramente isolado em um paciente com linfoma cutâneo no início da década de 80 (POIESZ et al., 1980). Subsequentemente, o HTLV-1 foi associado com a paraparesia espástica tropical na Martinica (GESSAIN et al., 1985) e com a mielopatia associada ao HTLV-1 no Japão (OSAME et al., 1986). Devido ao fato de ter sido demonstrado que estas duas patologias se tratavam da mesma entidade nosológica, Román e Osame propuseram a unificação da terminologia em mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) (ROMAN; OSAME, 1988).

Dois anos após o isolamento do HTLV-1, Kalyanaraman e colaboradores (KALYANARAMAN et al., 1982) isolaram o HTLV-2 a partir de células T de um paciente com tricoleucemia (leucemia de células pilosas). O HTLV-2 apresenta 65% de similaridade com genoma do HTLV-1 e foi associado a raros casos neurológicos (BISWAS et al., 2009; DOONEIEF et al., 1996; FEUER; GREEN, 2005).

Tem sido sugerido que a origem do HTLV ocorreu através da transmissão zoonótica decorrente do contato entre humanos e primatas não-humanos infectados. Em concordância com isto, o HTLV-1 apresenta maior homologia com o vírus linfotrópico de células T de

símios tipo 1 (STLV-1) do que com o HTLV-2 (GOUBAU; VANDAMME; DESMYTER, 1996). Acredita-se que o HTLV-1 e HTLV-2 tenham surgido independentemente e estão relacionados ao STLV-1 e STLV-2, respectivamente.

Mais recentemente, na década de 2000, os tipos HTLV-3 e HTLV-4 foram descobertos em uma população de caçadores camaroneses que tinham contato com primatas não humanos (CALATTINI et al., 2005; WOLFE et al., 2005). O HTLV-3 tem sua origem sugerida do STLV-3, porém para o HTLV-4 ainda não foi identificado um STLV equivalente. Devido à escassez de informações sobre o HTLV-3 e HTLV-4, a hipótese de transmissão entre humanos e associação com doenças ainda não pode ser descartada (WOLFE et al., 2005).

2.2 ESTRUTURA E GENOMA DO HTLV-1

O HTLV-1 pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero *Deltaretrovirus*. A estrutura do HTLV-1 é composta pelo envelope, nucleocapsídeo e nucleóide, medindo aproximadamente 100 nm. O envelope viral contém a proteína de superfície (SU) e a proteína transmembrana (TM) que ancora a proteína SU na membrana plasmática do envelope. A membrana interna do envelope é revestida pela proteína da matriz (MA). O capsídeo do HTLV-1 apresenta forma icosaédrica e é composto pela proteína do capsídeo (CA) e abriga o material genético associado à proteína do nucleocapsídeo. No interior do capsídeo também se encontram a transcriptase reversa e a integrase (PROIETTI, A. B. F. C., 2006).

O genoma do HTLV-1 é composto por duas moléculas idênticas de RNA de fita simples senso positivo que contém 9032 nucleotídeos. Semelhante a outros retrovírus, o genoma do HTLV-1 possui os genes *gag*, *env* e *pol*, além da região *px* que contém os genes regulatórios *tax* e *rex*. O genoma do HTLV-1 é flanqueado por sequências de repetições terminais longas (LTR – *long terminal repeat*) que são fundamentais para a integração do genoma viral no genoma do hospedeiro, assim como para a regulação da transcrição do genoma viral. O gene *env* codifica a proteína de superfície (SU) e a proteína transmembrana (TM), que são responsáveis pela ligação e fusão à membrana celular durante a entrada do vírus na célula do hospedeiro. O gene *gag* codifica as proteínas estruturais nucleocapsídeo (NC), capsídeo (CA) e matrix (MA). As enzimas transcriptase reversa, responsável pela síntese de DNA viral a partir da molécula de RNA, integrase, que promove a integração do

DNA viral no DNA do hospedeiro, e protease são codificadas pelo gene *pol* (PROIETTI, A. B. F. C., 2006).

A região *px* do genoma do HTLV-1 é uma sequência única deste retrovírus que contém quatro ORFs (*Open reading frame*) e codifica as proteínas regulatórias e acessórias. A ORF I codifica as proteínas p12 e p8, enquanto a ORF II codifica as proteínas p13 e p30. As proteínas acessórias contribuem para a manutenção de altas cargas provirais, infectividade viral, regulação da transcrição gênica e ativação celular (BINDHU; NAIR; LAIRMORE, 2004). A principal proteína regulatória do HTLV-1 é *tax*, codificada pela ORF IV. *Tax* interage com fatores celulares e com a região LTR, sendo essencial para a replicação e infectividade viral (FELBER et al., 1985; LEUNG; NABEL, 1988). Através da interação com fatores de transcrição celulares, como a proteína CREB, NF-KB e AP-1, a proteína *tax* promove aumento da expressão de genes de várias citocinas, receptores e proto-oncogenes envolvidos no crescimento e proliferação de células T (KIM, S. J. et al., 1990; TSCHACHLER et al., 1993). Além disso, *tax* suprime a atividade de genes responsáveis pela inibição do crescimento celular, podendo inibir a apoptose e o reparo do DNA (COPELAND et al., 1994; JEANG et al., 1990; JIN; SPENCER; JEANG, 1998; MULLOY et al., 1998). *Rex*, codificada pela ORF III, é outra proteína regulatória importante e atua a nível pós-transcricional transportando RNAs mensageiros virais do núcleo para o citoplasma (YOUNIS; GREEN, 2005).

A proteína HBZ (*HTLV-1 basic leucinae zipper factor*) é codificada pela fita negativa do genoma do HTLV-1 a partir da LTR 3'. HBZ suprime a atividade transativadora de *tax* sobre o genoma do provirus através da sua ligação com o fator de transcrição CREB, reduzindo assim a expressão viral (LEMASSON et al., 2007). Já foi descrito que, além da proteína, o RNA de HBZ pode estimular a expressão de vários genes celulares relacionados com a proliferação de células T (ARNOLD et al., 2008; SATOU et al., 2006).

2.3 CICLO VIRAL

O HTLV-1 infecta preferencialmente linfócitos T CD4⁺, mas a infecção de células T CD8⁺, monócitos e células dendríticas *in vivo* já foi demonstrada (HANON et al., 2000; JONES et al., 2008; KOYANAGI et al., 1993). O ciclo replicativo do HTLV-1 é semelhante ao dos demais retrovírus. A adsorção é mediada pelas proteínas SU e TM do envelope viral e os receptores da célula do hospedeiro. Até o momento, três receptores celulares foram

associados à entrada da partícula viral: GLUT-1 (transportador de glicose 1), HSPG (proteoglicano heparan-sulfato) e NRP-1 (neuropilina-1). Primeiramente, ocorre a ligação entre a proteína SU do HTLV-1 com HSPG. Em seguida, há a ligação com NRP-1 que estabiliza o complexo. A fusão do envelope viral com a membrana da célula é desencadeada após a associação de GLUT-1 ao complexo e então o cerne viral é introduzido no citoplasma da célula.

Logo após a entrada na célula, o genoma do HTLV-1 é transcrito reversamente pela TR. Com a conclusão da transcrição, o cerne viral é rompido e o DNA do HTLV-1 entra no núcleo da célula. A integrase promove a inserção do genoma do HTLV-1 no genoma da célula hospedeira, formando o provírus. Este processo de integração do provírus finaliza a fase precoce e inicia a fase tardia do ciclo de replicação do HTLV-1. Na fase tardia, a síntese do RNA viral ocorre através dos mecanismos de reprodução celular, utilizando o provírus integrado como molde. A transcrição do provírus origina um longo transcrito primário que é processado para gerar o RNA genômico e os mRNAs. As proteínas virais são sintetizadas nos ribossomos, podendo ocorrer mudanças pós-traducionais.

2.4 EPIDEMIOLOGIA

O HTLV-1 está presente ao redor do mundo, porém, diferentemente do HIV, a sua distribuição se apresenta na forma de aglomerados, com áreas de alta endemicidade circundadas por áreas vizinhas que frequentemente não apresentam o vírus. A origem da formação desses aglomerados ainda não está esclarecida, mas acredita-se que seja, em parte, decorrente do efeito fundador e também devido à persistência de alta taxa de transmissão viral (GESSAIN; CASSAR, 2012).

A prevalência da infecção pelo HTLV-1 aumenta progressivamente com a idade, principalmente em mulheres (CATALAN-SOARES,; PROIETTI; CARNEIRO-PROIETTI, 2001; DOURADO et al., 2003). Vários estudos têm relatado a prevalência mundial do HTLV-1 em 10 – 20 milhões de indivíduos infectados, porém esta estimativa foi feita com dados de mais de 25 anos e provavelmente não reflete mais a situação atual (HLELA et al., 2009). Recentemente, Gessain e colaboradores estimaram a prevalência mundial em 5 a 10 milhões de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (GESSAIN; CASSAR, 2012). As principais áreas endêmicas para o HTLV-1 são o sudoeste do Japão, ilhas do Caribe, África Equatorial, Oriente Médio e América do Sul (PROIETTI et al., 2005) (Figura 1).



Figura 1. Distribuição global da infecção pelo HTLV-1. Fonte: Jacobson, 2013

O Brasil é considerado o país com o maior número absoluto de indivíduos infectados com o HTLV-1, com uma estimativa de 2,5 milhões de infectados (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002). O HTLV-1 encontra-se disseminado por todo o país, apresentando distribuição heterogênea com prevalências mais elevadas nas regiões norte e nordeste (CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2005) (Figura 2).

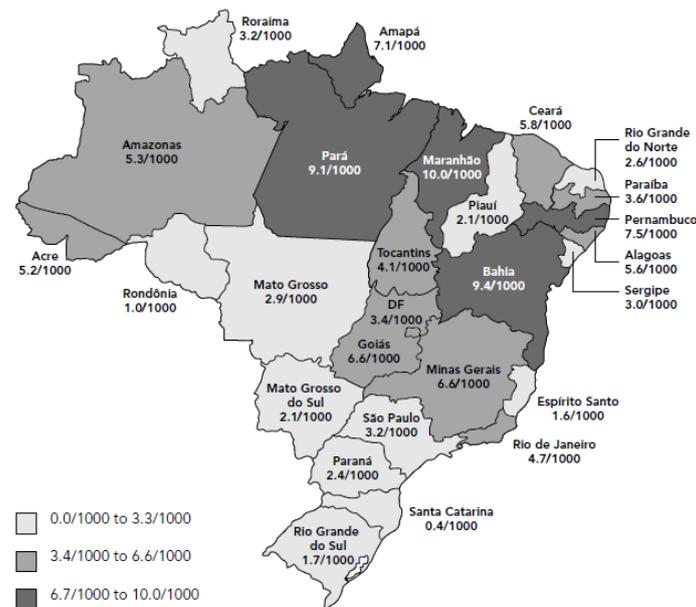


Figura 2. Soroprevalência da infecção pelo HTLV-1 em bancos de sangue dos 26 estados do Brasil e do Distrito Federal. Fonte: Catalan-Soares, 2005.

Em um estudo multicêntrico realizado em bancos de sangue, a cidade de Salvador apresentou a maior prevalência do HTLV-1 (1,35%) (GALVAO-CASTRO et al., 1997). No único estudo de base populacional do Brasil, Salvador apresentou prevalência do HTLV-1 de 1,8% na população em geral, sendo 2% em mulheres e 1,2% em homens (DOURADO et al., 2003).

A transmissão do HTLV-1 pode ocorrer através das vias sexual, parenteral e vertical. A principal forma de transmissão vertical é através da amamentação, ocorrendo em 20% dos filhos de mães infectadas e está correlacionada com a carga proviral materna e com altos títulos de anticorpos anti-HTLV-1 (KINOSHITA et al., 1984; URETA-VIDAL et al., 1999). A transmissão através da transfusão sanguínea teve papel importante no passado quando os bancos de sangue não realizavam a triagem para o HTLV-1. Outra via de transmissão parenteral é por meio do compartilhamento de agulhas entre usuários de drogas intravenosas. Já a transmissão pela via sexual, estudos tem demonstrado maior eficácia de transmissão de homens para mulheres do que o inverso (LARSEN et al., 2000; MURPHY et al., 1989).

2.5 DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-1

O HTLV-1 é o agente etiológico da leucemia de células T do adulto (ATL) (HINUMA et al., 1981), da mielopatia associada ao HTLV-1/ paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) (GESSAIN et al., 1985) e da uveíte associada ao HTLV-1 (MOCHIZUKI et al., 1992). Apesar de 95% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 não desenvolverem essas doenças ao longo da vida, diversas outras doenças tem sido descritas com diferentes graus de associação ao HTLV-1 (Quadro 1).

Quadro 1. Doenças associadas à infecção pelo HTLV-1. Fonte: Gessain, 2012.

Doença	Associação
HAM/TSP	++++
ATL	++++
Uveíte	++++
Dermatite infectiva	+++
Polimiosite	++
Artrite associada ao HTLV-1	++
Pneumonia infiltrativa	++
Síndrome de Sjogren	+
++++, associação provada, +++ associação provável, ++ e +, associação possível.	

A ATL é uma malignidade de células T CD4⁺ com uma prevalência de 1 – 5% em indivíduos infectados pelo HTLV-1 (MURPHY et al., 1989). Foi à primeira doença maligna identificada como causada por um retrovírus. O HTLV-1 não possui um oncogene no seu genoma e o seu potencial oncogênico advém da atividade das suas proteínas regulatórias que interferem na expressão de genes responsáveis pelo controle da proliferação celular (LEMASSON et al., 2007; YAO; WIGDAHL, 2000). A ATL apresenta quatro apresentações clínicas: aguda, crônica, linfomatosa e indolente (*smouldering*), sendo caracterizada pela infiltração de baço, linfonodos, pele e trato gastrointestinal, com a presença de células T com núcleo multilobulado conhecidas como *flowercells*. A forma mais grave da ATL é a aguda, com evolução rápida para o óbito e tempo de sobrevida em torno de seis meses.

A mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) é uma disfunção neurológica progressiva que resulta em paraparesia espástica com perda progressiva da função motora dos membros inferiores. Outros sintomas como disfunção erétil e intestinal, incontinência urinária e distúrbios sensoriais nos membros inferiores já forma relatados pelos pacientes. A HAM/TSP acomete aproximadamente 1 – 5% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1, ocorrendo mais em mulheres que em homens com uma razão de 2:1.

A patogênese da HAM/TSP ainda não está totalmente esclarecida, mas fatores virais e do hospedeiro, como resposta imune e carga proviral, são fundamentais para o desenvolvimento da doença (BANGHAM; OSAME, 2005). Três modelos têm sido propostos para elucidar a patogênese da HAM/TSP: 1) células T CD8⁺ citotóxicas HTLV-1 específicas

atravessariam a barreira hematoencefálica e reconheceriam células gliais infectadas, destruindo-as por citotoxicidade direta; 2) o mimetismo molecular entre a riboproteína nuclear (hnRNP)-A1 e proteína viral tax resultaria em um processo inflamatório autoimune causando dano neuronal; 3) modelo do dano circundante, no qual linfócitos T CD4⁺ infectados e linfócitos T CD8⁺ específicos anti-tax atravessariam a barreira hematoencefálica e produziram grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, resultando em dano ao SNC (TAKENOUCI; YAO; JACOBSON, 2004).

O diagnóstico de HAM/TSP é baseado em uma lista de achados clínicos e laboratoriais que devem estar presentes em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e que foram sistematizados em 1989, pela OMS (ORGANIZATION, 1989). Devido ao fato de muitos pacientes não apresentarem a síndrome completa, mas apresentarem alterações sugestivas, De Castro-Costa e colaboradores elaboraram uma diretriz revisada para diagnóstico de HAM/TSP. De acordo com a nova proposta, os pacientes podem ser classificados em HAM/TSP possível, provável e definido, segundo os critérios de definição diagnóstica, sendo uma ferramenta complementar para o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes. Os pacientes com HAM/TSP possível apresentam a síndrome completa ou incompleta, porém outras causas de mielopatia não foram excluídas. Os pacientes com HAM/TSP provável são monossintomáticos (por exemplo, apresentam bexiga neurogênica ou apenas o sinal de Babinski presente) porém outras causas de mielopatia foram excluídas. Os pacientes com HAM/TSP definido preenchem os critérios estabelecidos pelo OMS (DE CASTRO-COSTA et al., 2006) (Quadro 2).

Quadro 2. Critérios de Belém para diagnóstico de HAM/TSP.

Definido
1. Paraparesia espástica crônica, progressiva, não-remissiva com comprometimento suficiente da marcha que pode ser percebido pelo paciente. Sintomas ou sinais sensitivos podem ou não estar presentes. Quando presentes, eles permanecem leves e sem níveis sensitivos. Sinais ou sintomas urinários e intestinais podem ou não estar presentes.
2. Presença de anticorpos HTLV-1 no soro e líquor, confirmado por Western-blot e/ou PCR para HTLV-1 positivo no sangue e/ou líquor.
3. Exclusão de outras patologias que se assemelhem a HAM/TSP.
Provável
1. Apresentação monossintomática: espasticidade ou hiperreflexia nos membros inferiores ou sinais de Babinsk isolado com ou sem sinais sensitivos leves, ou bexiga neurogênica, somente confirmada por estudo urodinâmico.
2. Presença de anticorpos HTLV-1 no soro e/ou líquor, confirmado por Western-blot e/ou PCR para HTLV-1 positivo no sangue e/ou líquor.
3. Exclusão de outras patologias que se assemelhem a HAM/TSP.
Possível
1. Apresentação clínica incompleta ou completa.
2. Presença de anticorpos HTLV-1 no soro e/ou líquor, confirmado por Western-blot e/ou PCR para HTLV-1 positivo no sangue e/ou líquor.
3. As outras patologias que se assemelham a HAM/TSP não foram excluídas.

2.6 CARGA PROVIRAL

Os indivíduos infectados pelo HTLV-1 não apresentam vírions extracelulares detectáveis. Desse modo, a carga viral é quantificada como carga proviral (proporção de células mononucleares periféricas que possuem o provírus do HTLV-1 integrado ao seu genoma).

A carga proviral tem sido considerada um marcador para desenvolvimento das doenças associadas ao HTLV-1. Diversos estudos demonstraram que indivíduos assintomáticos apresentam carga proviral significativamente menor comparados aos indivíduos sintomáticos (HISHIZAWA et al., 2004; MONTANHEIRO et al., 2005; NAGAI et al., 1998; OLINDO et al., 2005). Um ponto de corte de 5% de células infectadas foi determinado como o melhor valor para diferenciar indivíduos assintomáticos de pacientes com HAM/TSP (Grassi, 2011). Porém, pode haver uma variação da carga proviral de até 1000

vezes entre indivíduos, de modo que há sobreposição dos valores entre indivíduos assintomáticos e sintomáticos (ASQUITH; BANGHAM, 2008).

Além de ser um fator de risco para desenvolvimento de HAM/TSP, diversos estudos já associaram a carga proviral a outras complicações clínicas, como uveíte (ONO et al., 1995) e artrite reumatoide (YAKOVA et al., 2005). Pacientes que perdem rapidamente as funções motoras apresentam carga proviral maior que indivíduos com progressão mais lenta (MATSUZAKI et al., 2001). A coinfeção do HTLV-1 com *Strongyloides stercoralis* também está associada com alta carga proviral, devido aos antígenos do *S. stercoralis* induzirem a proliferação policlonal das células infectadas pelo HTLV-1 (SATO et al., 2003). Em outro estudo, carga proviral maior que 100.000 cópias/10⁶ PBMC foi associada à presença de ceratoconjuntivite seca (CASTRO-LIMA VARGENS et al., 2011).

De acordo com o modelo de evolução da carga proviral proposto por Grant e colaboradores, durante a infecção primária, ocorre inicialmente um pico da carga proviral no sangue periférico seguido de uma queda em consequência da resposta do sistema imune, mantendo a carga proviral equilibrada durante o período de latência clínica. A qualidade da resposta imune do hospedeiro determinará se a carga proviral irá se manter em equilíbrio, e desse modo o portador permanecerá assintomático, ou aumentar continuamente, elevando o risco de desenvolver HAM/TSP. Após o estabelecimento da doença, a carga proviral alcança um novo platô e mantém-se com pouca variação ao longo da doença (GRANT et al., 2002).

A carga proviral é mantida principalmente pela proliferação dos linfócitos TCD4⁺ de memória. Esta proliferação é resultado da atividade transativadora de tax que estimula a expressão de genes, como c-fos, IL-2, IL-2R, TGF- β , que induzem a proliferação celular. Portanto, quanto maior a expressão de tax, maior tende a ser a carga proviral. Por outro lado, a expressão de tax também expõe as células infectadas ao sistema imune, resultando na destruição destas células e consequente diminuição da carga proviral. Dessa forma, o equilíbrio entre esses dois fatores opostos irá determinar o nível da carga proviral (ASQUITH; BANGHAM, 2008).

O controle da carga proviral do HTLV-1 depende de fatores virais e do hospedeiro. Estudos realizados na década de 90 não encontraram associação entre genótipos do HTLV-1 e manifestações clínicas (DAENKE et al., 1990; KOMURIAN; PELLOQUIN; DE THE, 1991). Devido à diferença entre a sequência do HTLV-1 entre os indivíduos infectados ser limitada, acredita-se que as diferenças genéticas do hospedeiro sejam responsáveis pelos diferentes desfechos da infecção. Existem evidências que um dos principais determinantes da

carga proviral e do risco de desenvolver HAM/TSP é a resposta dos linfócitos T CD8⁺ (CTLs) mediada pelo HLA de classe I aos antígenos do HTLV-1.

Em um estudo realizado na população japonesa, Jeffrey e colaboradores demonstraram que os alelos de *HLA-A*02* e *HLA-C*08* foram associados a menor risco de desenvolvimento de HAM/TSP e menor carga proviral nos indivíduos assintomáticos. Por outro lado, o alelo *HLA-B*54* foi associado a maior susceptibilidade à HAM/TSP e maior carga proviral em pacientes com HAM/TSP. Este mesmo grupo também observou que alelo de classe II *HLA-DR*0101*, na ausência do *HLA-A*02*, foi associado a maior chance de desenvolver HAM/TSP (JEFFERY et al., 2000; JEFFERY et al., 1999). O efeito protetor dos alelos *HLA-A*02* e *HLA-C*08* não foram encontrados em outro estudo realizado no Irã, porém foi confirmada a associação do *HLA-DR*0101* com susceptibilidade à HAM/TSP, na ausência de *HLA-A*02* (SABOURI et al., 2005). No Brasil, Catalan Soares observou que o alelo *HLA-A*02* foi mais frequente em indivíduos assintomáticos, e na ausência deste, o alelo *HLA-C*07* foi associado à presença de HAM/TSP (CATALAN-SOARES, B. C. et al., 2009). A diferença nos resultados encontrados nestes estudos, poderia ser decorrente das diferenças dos perfis genéticos encontradas nestas regiões.

Em concordância com o efeito protetor do alelo *HLA-A*02*, Macnamara e colaboradores demonstraram que alelos preditos de ligar fortemente à proteína viral HBZ, incluindo o alelo *HLA-A*02*, foram associados a menor carga proviral e a menor susceptibilidade a HAM/TSP (MACNAMARA et al., 2010).

2.7 CÉLULAS NK (NATURAL KILLERS)

As células NK são componentes da imunidade inata e correspondem à primeira linha de defesa contra diversos tipos de patógenos, incluindo vírus, bactérias e fungos (BAR et al., 2014; CERWENKA; LANIER, 2001). Elas foram inicialmente descritas como grandes linfócitos granulares com citotoxicidade natural contra células tumorais. Posteriormente, as células NK foram reconhecidas como uma linhagem linfocítica distinta com capacidade citolítica também contra células infectadas por vírus. Além disso, as células NK podem liberar citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas envolvidas nos eventos precoces das respostas inflamatórias (VIVIER et al., 2011).

Embora as células NK compartilhem algumas características com as células T, elas não expressam TCR (receptor de células T) nem a molécula acessória CD3. Os principais

marcadores de células NK são CD56, uma isoforma da molécula de adesão celular (NCAM), e CD16, um receptor para a porção Fc de IgG (CALIGIURI, 2008). De acordo com o nível de expressão de CD56, as células NK podem ser divididas em NK CD56^{dim} e NK CD56^{bright}. Aproximadamente 90% das células do baço e do sangue periférico são CD56^{dim} CD16⁺. Estas células apresentam uma potente atividade citotóxica e também produzem rapidamente IFN- γ , bem como outras citocinas do tipo I e quimiocinas após a ativação através de seus receptores de ativação (BRYCESON et al., 2006; DE MARIA et al., 2011). Por outro lado, as células NK CD56^{bright} CD16⁻ estão principalmente localizadas nos linfonodos e órgãos linfoides secundários, e possuem pouca atividade citotóxica. Acredita-se que as células NK CD56^{bright} sejam responsáveis pela produção de longa duração de citocinas e quimiocinas, principalmente IFN- γ e TNF (CALIGIURI, 2008).

A atividade citotóxica das células NK é mediada pela liberação de grânulos líticos contendo granzima e perforina. A perforina age formando poros na membrana celular das células alvo que alteram a permeabilidade celular, culminando na lise osmótica. Já a granzima pertence a uma família de serina-proteases, sendo a granzima B a principal enzima pró-apoptótica desta família. Ela age através da sua atividade semelhante a caspases que cliva a molécula Bid, um membro da família pró-apoptótica Bcl-2, e clivando parcialmente algumas caspases, induz a morte celular por apoptose (TRAPANI, 2001).

A função das células NK é regulada pelo balanço de sinais dos receptores de ativação e inibição presentes na superfície celular (Figura 3). Nos últimos 20 anos, houve um grande avanço no conhecimento da função das células NK. Diversos receptores, tanto de ativação quanto de inibição, foram descobertos e acredita-se que o equilíbrio de sinais gerados por estes receptores regulem a destruição de células alvo, como também são responsáveis pela tolerância ao próprio (CHEENT; KHAKOO, 2009).

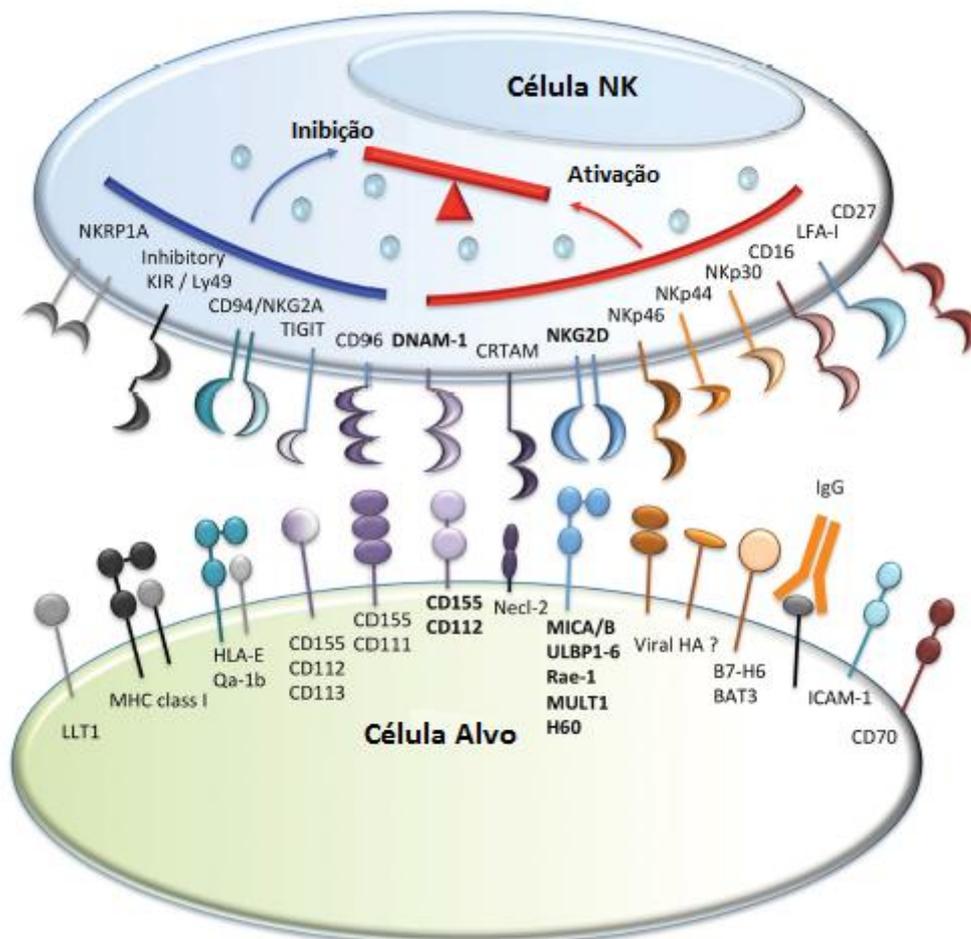


Figura 3. Receptores das células NK e seus supostos ligantes. BAT-3, transcrito 3 associado a HLA-B; CRTAM, molécula associada a células T restritas a classe I; HA, hemaglutinina; HLA-E, antígeno de histocompatibilidade de classe I cadeia alfa E; IgG, imunoglobulina G, LFA-1, antígeno associado a função de leucócitos 1; LLT1, transcrito semelhante a lectina 1; TIGIT, imunoglobulina de células T e domínio ITIM. Fonte: Chan, 2014.

Os principais receptores de ativação das células NK são os receptores de citotoxicidade natural (NCR) NKp30, NKp44 e NKp46, o receptor da família semelhante a lectina do tipo-C NKG2D, CD16 (receptor de Fc de baixa afinidade) e 2B4, que pode ter função tanto de ativação quanto de inibição (CHEENT; KHAKOO, 2009; PAROLINI et al., 2000). De maneira geral, os receptores de ativação monitoram mudanças no nível de expressão de seus ligantes que são induzidos pelo estresse celular. Estes ligantes são proteínas próprias que são raramente expressas em células normais, mas são hiperexpressos em células tumorais ou infectadas por vírus (THIELENS; VIVIER; ROMAGNE, 2012).

Os receptores KIR e o CD94/NKG2A são os principais receptores de inibição que regulam a atividade das células NK através do reconhecimento de MHC de classe I próprio. Os ligantes para os receptores KIR de inibição são as moléculas de HLA clássicas (HLA-A, HLA-B e HLA-C), enquanto CD94/NKG2A reconhece a molécula de HLA-G carregada com

a sequência líder do HLA-A, B ou C. Além de controlar a função das células NK, os receptores inibitórios específicos para MHC de classe I também são cruciais para a maturação, estado funcional das células NK e tolerância (KIM, S. et al., 2005; ORR; LANIER, 2010). As células NK reconhecem e destroem células que apresentam diminuição ou perda da expressão de MHC-I, como ocorre em infecções virais e tumores (LJUNGGREN; KARRE, 1990). Por outro lado, células NK de animais deficientes de MHC de classe I não são autorreativas e não rejeitam células deficientes em MHC de classe I, apesar de apresentarem ligantes de ativação (HOGLUND et al., 1991; LIAO et al., 1991).

2.8 RECEPTORES KIR

Os receptores KIR são considerados os principais receptores que controlam a função e o desenvolvimento das células NK (LANIER, 1998; LONG et al., 2001; MORETTA et al., 2001; VILCHES; PARHAM, 2002). Os genes que codificam os receptores KIR formam uma família multigênica que ocupa uma região de 150 kb, contida no complexo de receptores de leucócitos (LRC) no braço curto do cromossomo 19q13.4 (BIASSONI et al., 2003). A família KIR compreende 15 genes (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e *KIR3DS1*) e dois pseudogenes (*KIR2DP1* e *KIR3DP1*) (RAJALINGAM, 2012). A estrutura básica apresentada pelos genes KIR é uma unidade de nove éxons que representa o gene ancestral (Figura 4), sendo que cada gene KIR pode conter de 4 a 9 éxons (UHRBERG et al., 1997). Os éxons 1 e 2 codificam as sequências líder e os domínios extracelulares (D0, D1 e D2) são codificados pelos éxons 3, 4 e 5. O éxon 6 codifica a cauda, que fica situado entre o domínio extracelular e a membrana, enquanto que a porção transmembrana é codificada pelo éxon 7 e a cauda citoplasmática pelos éxons 8 e 9 (WILSON et al., 2000). Os genes apresentam grande similaridade de sequência (ABI-RACHED; PARHAM, 2005; MARTIN, A. M. et al., 2004).

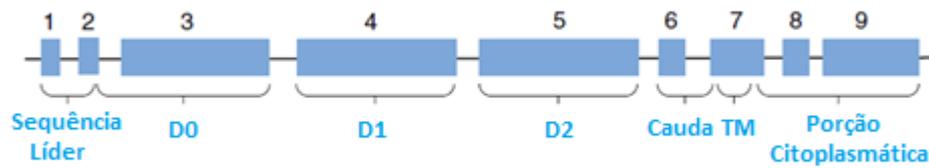


Figura 4. Representação do gene ancestral de KIR. Fonte: Barishova, 2006.

A família destes receptores é composta por 14 receptores que desencadeiam sinais de ativação (3DS1, 2DS1-5), inibição (3DL1-3, 2DL1-3 e 2DL5) ou ambos (2DL4) (WILSON et al., 2000).

A nomenclatura dos receptores KIR é baseada no número de domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulinas (2D e 3D) e de acordo com o tamanho da cauda citoplasmática, S para cauda curta e L para cauda longa (Figura 5) (BASHIROVA et al., 2006). Os receptores KIR3D possuem, obrigatoriamente, os domínios D0, D1 e D2, enquanto que os KIR2D podem ter os domínios D1 e D2 (Tipo I) ou D0 e D2 (Tipo II) (VILCHES; PANDO; PARHAM, 2000).

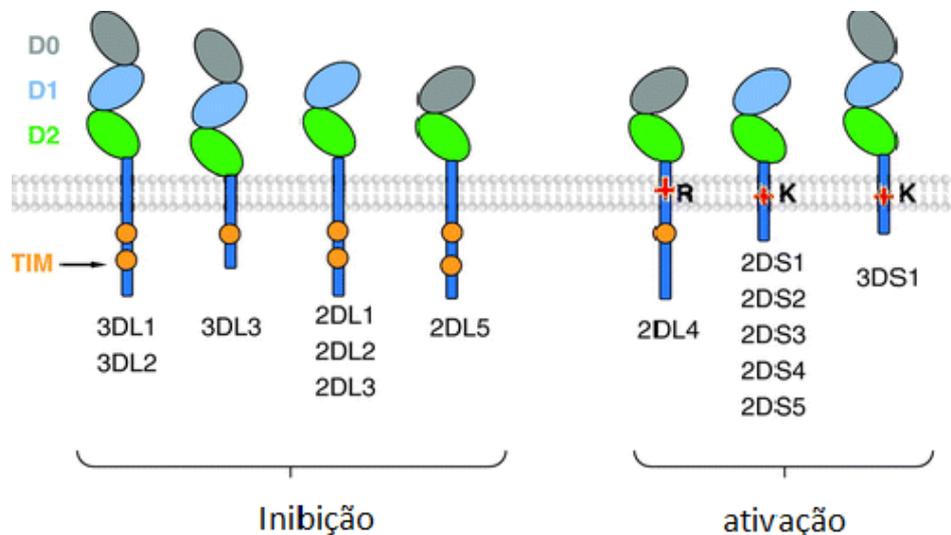


Figura 5. Domínios extracelulares dos receptores KIR: D0, D1 e D2. As caudas citoplasmáticas podem ser curtas (S) de ativação ou longas (L) de inibição. Fonte: Barishova, 2006.

A cauda citoplasmática e a porção transmembrana são responsáveis pela atividade funcional do receptor. A cauda citoplasmática longa é associada a motivos ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based inhibition Motifs*) que libera um sinal de inibição para a célula. Este sinal de inibição é decorrente da fosforilação de um resíduo de tirosina que

promove o recrutamento de (SHP-1 e SHP-2), que promovem a desfosforilação de substratos proteicos de tirosina quinases relacionadas à ativação das células NK (BARROW; TROWSDALE, 2006; BILLADEAU; LEIBSON, 2002).

Por outro lado, os receptores de ativação possuem motivos ITAMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*) no seu domínio transmembrana que se associam com a molécula adaptadora DAP-12. A interação desses receptores com seus ligantes resulta no recrutamento das tirosinas quinases SyK e ZAP-70 pelos ITAMs, resultando na reorganização do citoesqueleto para liberação de grânulos e também na transcrição de genes de citocinas e quimiocinas (BARROW; TROWSDALE, 2006; LANIER, 2008).

2.9 HAPLÓTIPOS KIR

Existem dois grupos de haplótipos KIR, haplótipo do grupo A e do grupo B. Estes dois grupos são diferenciados principalmente pelo número de genes para receptores de ativação (MIDDLETON; CURRAN; MAXWELL, 2002). Cada indivíduo pode ter de 9 a 17 genes KIR (SHILLING et al., 2002). Além da variação no conteúdo e número de genes, os haplótipos KIR apresentam polimorfismo alélico (SHILLING et al., 2002; UHRBERG et al., 1997). Apesar da grande diversidade de conteúdo gênico, os genes *KIR2DL4*, *3DL2*, *3DL3* e *3DP1* estão presentes em virtualmente 100% dos haplótipos KIR. A extremidade centromérica dos haplótipos é flanqueada pelo loco *KIR3DL3*, enquanto que a extremidade telomérica é flanqueada pelo *KIR3DL2*, além de dois loci centrais, o *KIR3DP1* e *KIR2DL4*. Devido a isto, estes quatro genes são denominados de genes estruturais ou *framework* (LONG et al., 2001). Ao contrário dos genes estruturais, a presença dos outros 13 genes é bastante variável. Os receptores *KIR2DL2* e *2DL3* segregam como alelos do mesmo *locus*, do mesmo modo que ocorre com *KIR3DL1* e *3DS1*, sendo que virtualmente todos os haplótipos irão ter *KIR2DL2* ou *2DL3* e *3DL1* ou *3DS1* (RAJALINGAM, 2012).

O haplótipo do grupo A é formado por nove genes e tem como principal característica possuir apenas um receptor de ativação, o *KIR2DS4*. Este gene possui um alelo nulo com frequência populacional de 84% (MIDDLETON et al., 2002). Desse modo, alguns indivíduos homocigotos para o haplótipo A podem não ter nenhum gene KIR de ativação expresso (HSU et al., 2002). Além dos quatro genes estruturais, o haplótipo A possui os genes *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4* e *KIR2DP1*.

Ao contrário do grupo A, os haplótipos do grupo B variam bastante em relação ao seu conteúdo gênico e compreende vários genes que não estão presentes no grupo A. O haplótipo B é caracterizado pela presença de um ou mais dos seguintes genes: *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1*. Desse modo, este grupo geralmente possui mais genes de ativação do que o haplótipo A (UHRBERG; PARHAM; WERNET, 2002; WILSON et al., 2000).

As frequências do haplótipos do grupo A e B são bastante variáveis de acordo com a população de estudo (WHANG et al., 2005). O haplótipo do grupo A tem frequência de 75% na população japonesa (YAWATA et al., 2002), 13% em aborígenes australianos (TONEVA et al., 2001) e frequência similar à do grupo B em caucasóides, apesar do grupo B possuir maior variedade de subgrupos (HSU et al., 2002).

A variação do conteúdo gênico e a diversidade alélica dos genes KIR, além da elevada heterozigotidade nas populações, torna a ocorrência de duas pessoas não-relacionadas a possuírem o mesmo haplótipo KIR um evento bastante raro (SAMBROOK et al., 2006).

2.10 EXPRESSÃO DE KIR

Os receptores KIR são expressos em células NK e em alguns subtipos de células T (UHRBERG et al., 2001). O nível de expressão de RNAm varia de acordo com o gene e alelos KIR. A análise de expressão de RNAm e proteínas tem demonstrado que clones de células não expressam todos os genes KIR que estão presentes no seu genoma. O mecanismo que regula a expressão dos receptores KIR não é bem conhecido, mas os receptores são expressos aparentemente de maneira aleatória (VALIANTE et al., 1997).

Apesar dos genes KIR apresentarem ampla diversidade, as regiões promotoras destes genes são altamente homólogas, com mais de 90% de similaridade. Dessa forma, diversos mecanismos epigenéticos têm sido propostos para explicar a expressão diferencial dos genes KIR. A metilação de ilhas CpG é um dos principais mecanismos de regulação gênica. Em um estudo realizado por Santourlidis e colaboradores, foi observada correlação entre ilhas CpG altamente metiladas e genes KIR não expressos, tanto em células NK de linhagem quanto em células NK recém isoladas (SANTOURLIDIS et al., 2002). Segundo mecanismo proposto por Chan e colaboradores, a quantidade de compostos de desmetilação durante o desenvolvimento das células NK regula o padrão aleatório de metilação dos genes KIR e este padrão estabelecido é preservado nas gerações subsequentes (CHAN et al., 2005).

2.11 LIGANTES DOS RECEPTORES KIR

Os receptores KIR reconhecem como ligantes moléculas específicas de HLA de classe I, que são codificados pelos genes altamente polimórficos de MHC (CARRINGTON, M. A. N., P., 2003). A figura 6 apresenta os ligantes dos receptores KIR. As moléculas de HLA-C são os principais ligantes dos receptores KIR. Todos os alótipos de HLA-C carregam uma valina (V) na posição 76, enquanto apresenta um dimorfismo na posição 80, podendo ser asparagina (N) ou lisina (K). Os alótipos que possuem asparagina na posição 80 (N80) são denominados do grupo 1 (C*01, C*03, C*07 e C*08) e são os ligantes dos receptores de inibição KIR2DL2/3. Por outro lado, os alótipos que possuem lisina na posição 80 (K80) pertencem ao grupo 2 (C*02, C*04, C*05, C*06 e C*15) e se ligam ao receptor KIR2DL1 (Figura 6).

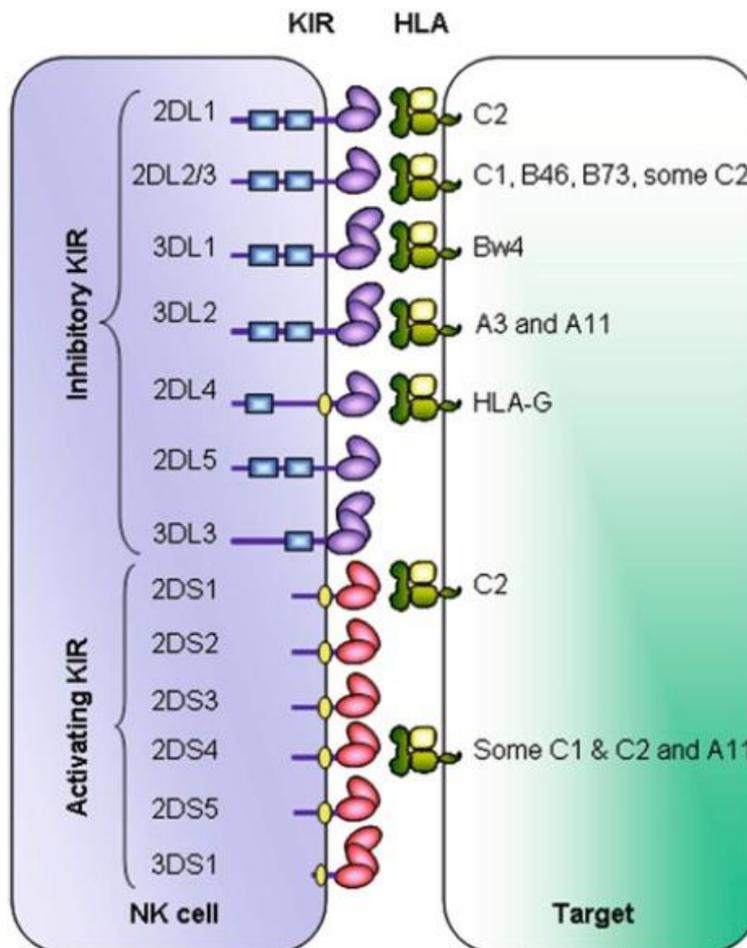


Figura 6. Receptores KIR e seus ligantes HLA de classe I. Fonte: Rajalingam, 2012.

Os receptores KIR2DL2/3 também interagem com dois ligantes de HLA-B46 e B73, que têm uma valina na posição 76 e uma asparagina na posição 80, e com alguns alótipos de HLA-C do grupo 2, C*0501 e C*0202 (MOESTA et al., 2008). Os sinais de inibição desencadeados pela interação entre KIR2DL2/3 e HLA-C do grupo 1 são relativamente mais fracos quando comparados aos sinais decorrentes da interação entre KIR2DL1 e HLA-C do grupo 2 (MOESTA et al., 2008; WINTER et al., 1998).

As moléculas de HLA-B são classificadas sorologicamente em Bw4 e Bw6. Os alótipos HLA-B Bw4 são ligantes para o receptor KIR3DL1 (GUMPERZ et al., 1995). Não há evidências que alótipos de HLA-B Bw6 se liguem a algum receptor KIR, embora KIR3DL1 possa ter uma ligação de baixa afinidade com estes alótipos (CARR; PANDO; PARHAM, 2005).

Os genes KIR e HLA segregam-se de maneira independente, de modo que é possível um indivíduo expressar um determinado receptor KIR e não ter o seu ligante, tornando o receptor não-funcional (WILLIAMS; BATEMAN; KHAKOO, 2005).

4.13 KIR E INFECÇÕES VIRAIS

Infecções virais promovem a diminuição dos níveis de expressão de MHC de classe I nas células infectadas como uma forma de escapar da resposta das células T CD8⁺ citotóxicas, porém as tornam susceptíveis à lise pelas células NK (JONCKER; RAULET, 2008). Diversos estudos genéticos tem demonstrado a influência das interações KIR/HLA no desfecho de várias doenças, como doenças autoimunes (MARTIN, M. P.; NELSON; et al., 2002), infecções virais (COOK et al., 2006; KHAKOO et al., 2004; MARTIN, M. P.; GAO; et al., 2002) e cânceres (CARRINGTON, M. et al., 2005; NAUMOVA et al., 2005).

Indivíduos portadores do HIV com rápida progressão para Aids foram associados à presença de KIR3DS1/HLA-Bw4¹⁸⁰ (MARTIN, M. P.; GAO; et al., 2002). Este estudo foi o primeiro a demonstrar que um KIR de ativação tem significância biológica na imunidade antiviral. Surpreendentemente, um subconjunto de alelos de *KIR3LS1* com alta expressão e alta capacidade de inibição em combinação com HLA-Bw4¹⁸⁰ foi associado com proteção a progressão para Aids e a baixos níveis de carga viral (MARTIN, M. P.; GAO; et al., 2002). Esse efeito protetor decorrente de um receptor de inibição pode ser atribuído a processo de maturação mais eficiente durante o desenvolvimento das células NK KIR3DL1⁺, que resulta em ativação mais forte dessas células NK.

Na infecção pelo HCV, a combinação *KIR2DL3* e HLA-C do grupo 1 em homozigose foi associada com efeito protetor na infecção pelo HCV (KHAKOO et al., 2004; ROMERO et al., 2008). Este efeito protetor foi associado a indivíduos infectados através do uso de drogas intravenosas ou acidentes com perfuro cortantes, ou seja, infectados com baixo inóculo. Uma vez que *KIR2DL3* se liga a HLA-C com afinidade menor em relação aos outros receptores KIR de inibição (WINTER et al., 1998), acredita-se que seu efeito protetor na infecção por HCV seja resultado dos sinais inibitórios mais fracos que são mais facilmente superados pelos sinais de ativação.

Em pacientes japoneses, a presença do gene *KIR2DL2* reforçava tanto o efeito protetor do alelo *HLA-C*08* quanto o efeito prejudicial do alelo *HLA-B*54* na infecção pelo HTLV-1 (SEICH AL BASATENA et al., 2011). No entanto, no Peru estes resultados não foram observados (TALLEDO et al., 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a associação entre genes *KIR2DL2*, *KIR2DL3* e genes de HLA-C do grupo I e o diagnóstico de HAM/TSP em pacientes infectados pelo HTLV-1 em Salvador, Brasil.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência dos genes *KIR2DL2* e *KIR2DL3*;
- Comparar a carga proviral e prevalência de HAM/TSP nos subgrupos de pacientes com genes *KIR2DL2* e *KIR2DL3* em presença dos genes de HLA-C do grupo 1.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Trata-se de um estudo corte transversal, envolvendo pacientes acompanhados no Centro de HTLV da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. O CHTLV dispõe de um banco de amostras de DNA de 420 pacientes (280 Assintomáticos e 140 com HAM/TSP), dos quais cerca de 70% são do sexo feminino (cerca de 300 pacientes). Estas amostras foram previamente coletadas e o DNA extraído utilizando o Kit Qiagen (QIAamp DNA BLOOD Mini kit 250), de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração de DNA de cada amostra foi determinada por espectrofotometria utilizando o Nanodrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA). Foram incluídos 248 indivíduos infectados pelo HTLV-1 com status clínico definido para os quais a genotipagem do HLA classe I foi realizada em um projeto anterior. Todos os indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram previamente avaliados por um neurologista e classificados de acordo com o seu status clínico em assintomático (ASS), HAM/TSP-provável (PB), HAM/TSP-possível (PS) e HAM/TSP-definido (D). O processo de seleção dos pacientes está ilustrado na figura 7. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz. Consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os participantes do estudo.

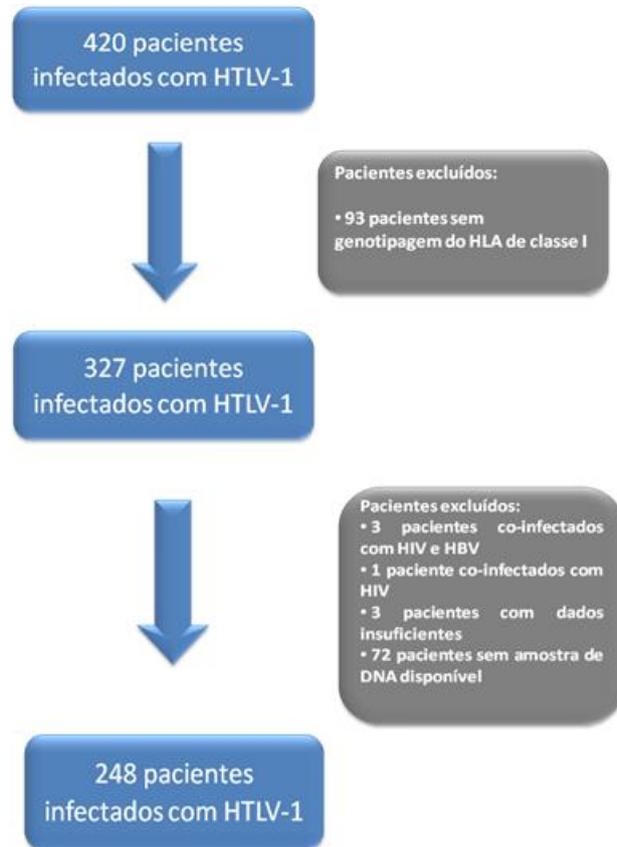


Figura 7. Fluxograma de seleção dos pacientes infectados pelo HTLV-1.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DO HTLV-1

A carga proviral do HTLV-1 foi realizada através do método de quantificação absoluta por PCR em tempo real utilizando sondas TaqMan (DEHEE et al., 2002). A albumina foi utilizada como gene endógeno. Para a obtenção de curva padrão para a albumina e HTLV-1 foi utilizado o plasmídeo pc DNA 3,1 (Invitrogen, Groningen, The Netherlands), que tem uma dupla inserção, uma porção do íntron do gene da albumina humana (na posição 15758 – 16940, GenBank número do acesso M12523) e do gene *pol* do genoma do HTLV-1 (na posição 4708 – 4953, GenBank número de acesso J02029). O plasmídeo foi diluído seriadamente em fator de 10 a partir de 10^7 . Para a realização da curva foi utilizada apenas as concentrações de 10^5 a 10 cópias/ μ L.

Para quantificação do HTLV-1 foram utilizados seguintes primers direcionados para o gene *pol*, SK110 (5-CCCTACAATCCAACCAGCTCAG-3) e SK111 (5-GTGGTGAAGCTGCCATCGGGTTTT-3). Enquanto que para a quantificação da albumina humana foram utilizados os primers Alb (5-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3) e Alb-AS (5-AAACTCATGGGAGCTGCT GGTT-3). A sonda interna TaqMan da albumina foi a 5-CCTGTCATGCCACACAAATCTCTCC-3 com o reporter dye FAM (6-carboxy

fluorescein), enquanto que a do HTLV-1 foi a 5-CTTTACTGACAAACCCGACCTACCCATGGA-3 com o repórter dye VIC. As duas sondas continham o quencher dye TAMRA (6-carboxy tetramethylrhodamine).

O mix de PCR com volume total de 25µL para Albumina ou HTLV-1 continha 4µL do DNA extraído (concentração 50 - 100 ng/µL), 2,25 uL (concentração de 10 uM de cada) para os primers SK110 e SK111 ou Alb-S e Alb-AS, 1,25 uL da sonda (na concentração de 5uM de cada), para HTLV-I ou albumina, 12,5 uL do TaqMan Universal PCR Master Mix. Todos os reagentes do PCR foram adquiridos da Applied Biosystems(Foster City, Califórnia, EUA).

Para a amplificação do DNA do HTLV-1 e albumina, após um ciclo de 50 °C por 2 minutos, seguido de outro ciclo de 95 °C por 10 minutos, duas temperaturas são utilizadas: 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 65 °C por 45 ciclos. Os dados da amplificação são analisados utilizando ABI Prism 7700 Sequence Detector System (Perkin–Elmer Applied Biosystems).

4.3FREQUÊNCIA DOS GENES *KIR2DL2* E *KIR2DL3*

A presença dos genes *KIR2DL2* e *KIR2DL3* foi determinada por PCR em tempo real com o método de incorporação de SYBR Green. O quadro 2 apresenta os primers que foram utilizados para os genes *KIR2DL2* e *KIR2DL3*.

Quadro3. Primers utilizados para amplificação dos genes *KIR2DL2* e *KIR2DL3* (VILCHES et al., 2007).

Gene	Sentido	Sequência 5' - 3'	Tamanho do fragmento
<i>KIR2DL2</i>	Direto	AAACCTTCTCTCTCAGCCCA	142 pb
	Reverso	GCCCTGCAGAGAACCTACA	
<i>KIR2DL3</i>	Direto	AGACCCTCAGGAGGTGA	156 pb
	Reverso	CAGGAGACAACCTTTGGATCA	

O mix da PCR teve um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL do 2X SYBR Green PCR Master Mix, 0,5 µL de cada primer na concentração de 10 µM, 2,5 µL da amostra de DNA (concentração 50 - 100 µL) e 9 µL de água livre de RNase. Os ciclos da reação foram compostos por uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguida por 45 ciclos com uma etapa de 94°C por 20 segundos e outra etapa a 60°C por 40 segundos. Após os 45 ciclos, foi realizada uma curva de melting para verificar a especificidade da reação. Os

dados da amplificação são analisados utilizando ABI Prism 7700 Sequence Detector System (Perkin–Elmer AppliedBiosystems).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A frequência de cada gene foi estimada por contagem direta. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar as proporções dos genes *KIR2DL2* e *KIR2DL3* entre os grupos assintomáticos e HAM/TSP-PS, -PB e -D. A mediana da carga proviral dos subgrupos de pacientes que apresentam os genes *KIR2DL2* e *KIR2DL3* em presença das moléculas de HLA-C do grupo 1 foi comparada utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O programa SPSS Statistics 17.0 foi utilizado para realizar os cálculos estatísticos.

5. RESULTADOS

A tabela 1 apresenta as principais características clínicas dos 248 indivíduos incluídos no estudo. No geral, o sexo feminino foi predominante em todos os grupos clínicos, com frequência aproximada de 70%. A mediana da idade do grupo assintomático (49 anos) foi estatisticamente menor quando comparado aos grupos com diagnóstico de HAM/TSP-PS e – D. A carga proviral do HTLV foi estatisticamente maior nos grupos com HAM/TSP (PS, PB e D) comparado ao grupo assintomático.

Tabela 1. Características Gerais dos pacientes infectados pelo HTLV-1 assintomáticos e com diagnóstico de HAM/TSP de acordo os critérios de Belém (Possível, Provável e Definido) (n=248) (DE CASTRO-COSTA et al., 2006)

	Assintomático n=161	HAM/TSP			Valor de p
		Possível n=20	Provável n=24	Definido n=43	
Mulheres, n(%)	117 (72,6)	14 (70,0)	15 (62,5)	30 (69,7)	0,777 ^a
Idade, mediana (variação)	49 (13 – 90)	61,5 (41 – 78)	54,5 (21 – 87)	57 (35 – 84)	< 0,001 ^b
Carga Proviral, mediana (percentil)	1,1 (0,06 – 4,6)	3,4 (0,7 – 8,2)	8,8 (4,3 – 15,2)	11,6 (6,3 – 19,5)	< 0,001 ^b

Dados representam a mediana; a= Qui-quadrado; b= Kruskal-Wallis

As frequências dos genes *KIR2DL2* e *2DL3* nos pacientes infectados pelo HTLV-1 foram de 84,3% e 96,8%, respectivamente. As frequências dos genes *KIR2DL2* e *2DL3* foram semelhantes entre os indivíduos assintomáticos e com HAM/TSP, tanto isoladamente tanto em associação com os seus ligantes, os alelos de HLA-C do grupo 1 (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência dos genes *KIR2DL2* e *2DL3* e associação com os alelos de HLA-C do Grupo 1 (n=248) em pacientes infectados pelo HTLV-1 de acordo com o diagnóstico clínico

	HAM/TSP				
	TOTAL	ASS	PS	PB	D
	n (%)	n (%)	n(%)	n(%)	n(%)
<i>2DL2</i>	209 (84,3)	134 (83,2)	15 (75,0)	22 (91,7)	38(88,4)
<i>2DL3</i>	240 (96,8)	157 (97,5)	20 (100,0)	22 (91,7)	41 (95,3)
<i>2DL2+2DL3</i>	202 (81,4)	131 (81,4)	15 (75,0)	20 (83,3)	36 (83,7)
<i>2DL2+HLA-C1</i>	156 (62,9)	103 (64,0)	12 (60,0)	16 (66,7)	25 (58,1)
<i>2DL3+HLA-C1</i>	181 (73,0)	119 (73,9)	16 (80,0)	17 (70,8)	29 (67,4)

ASS: Assintomático, PS: Possível, PB: Provável, D: Definido.

HLA-C grupo-1: *C*01*, *C*03*, *C*07*, *C*08*, *C*12*, *C*13*, *C*14* e *C*16*.

Em relação à associação entre a presença dos genes *KIR2DL2* e *2DL3* e carga proviral (Tabela 3), menor carga proviral foi encontrada nos pacientes com diagnóstico de HAM/TSP possível com o gene *2DL2*(2,8%) comparado ao grupo de pacientes que não apresentavam o genótipo (19,2%) (p=0,001).

Tabela 3. Carga Proviral dos pacientes infectados com HTLV-1 de acordo com a presença dos genes *KIR2DL2* e *2DL3*.

	TODOS	ASS	HAM/TSP		
			PS	PB	D
<i>2DL2</i>	(n=248)	(n=161)	(n=20)	(n=24)	(n=43)
+	2,6 (0,2 – 10,0)	1,1 (0,08 – 3,7)	2,8* (0,3 – 4,3)	8,6 (4,2 – 12,7)	12,8 (6,2 – 20,3)
-	5,7 (0,1 – 11,0)	0,3 (0 – 6,7)	19,2* (8,6 – 30,0)	21,8 (20,9 – 22,7)	8,2 (7,4 – 11,6)
<i>2DL3</i>					
+	2,9 (0,2 – 10,2)	1,1 (0,06 – 4,8)	3,4 (0,7 – 8,2)	9,7 (4,4 – 15,8)	11,1 (6,2 – 19,5)
-	3,6 (0,2 – 8,9)	0,2 (0,07 – 1,9)	-	4,7 (3,5 – 5,9)	15,7 (11,8 – 19,5)
<i>2DL2 e 2DL3</i>					
+	2,5 (0,2 – 10,0)	1,1 (0,09 – 3,7)	2,8* (0,3 – 4,3)	8,8 (4,3 – 13,7)	12,4 (5,8 – 20,3)
-	5,6 (0,1 – 11,6)	0,2 (0 – 5,7)	19,2* (8,6 – 30,0)	13,3 (4,7 – 21,8)	11,6 (7,8 – 13,0)

Dados da carga proviral representam a mediana em porcentagem de células mononucleares infectadas pelo HTLV-1. ASS: Assintomático, PS: Possível, PB: Provável, D: Definido.

Mann-Whitney *p=0,001

Quando avaliamos a associação entre o gene *KIR2DL2* e a presença de um dos alelos do HLA-C do grupo 1, observamos menor carga proviral (2,1% de células infectadas) naqueles que tinham os dois genótipos, quando comparados aos indivíduos com apenas o gene *KIR2DL2* (5,0% de células infectadas) ($p=0,013$) (Tabela 4). No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quando a análise foi realizada estratificando-se os grupos de acordo com o status clínico.

Tabela 4. Influência da associação dos genes *KIR2DL2* e *2DL3* e alelos de HLA-C do grupo 1 sobre a carga proviral.

	TODOS	ASS	HAM/TSP		
			PS	PB	D
<i>2DL2</i> +	(n=209)	(n=134)	(n=15)	(n=22)	(n=38)
HLA-C1 +	2,1*	0,7	2,9	7,9	11,0
	(0,1 – 8,0)	(0,07 – 3,3)	(0,1 – 4,3)	(3,8 – 13,6)	(4,6 – 19,5)
HLA-C1 -	5,0*	2,2	1,2	8,8	16,7
	(0,9 – 13,7)	(0,2 – 7,9)	(1,1 – 2,4)	(5,9 – 12,7)	(8,5 – 20,3)
<i>2DL2</i> +					
HLA-C*07 +	2,2	0,2**	1,8	4,2†	12,3
	(0,07 – 6,2)	(0 – 3,3)	(0,2 – 3,8)	(3,5 – 11,6)	(6,2 – 23,2)
HLA-C*07 -	2,6	1,4**	2,8	8,9†	12,7
	(0,3 – 11,0)	(0,2 – 4,7)	(0,5 – 3,9)	(7,3 – 15,7)	(6,9 – 19,3)
<i>2DL3</i> +	(n=240)	(n=157)	(n=20)	(n=22)	(n=41)
HLA-C1 +	2,5	0,9	3,6	10,6	11,0
	(0,1 – 9,8)	(0,05 – 4,1)	(0,3 – 11,9)	(4,2 – 20,9)	(6,2 – 19,0)
HLA-C1 -	4,5	2,1	2,4	8,9	15,1
	(0,6 – 11,0)	(0,1 – 7,7)	(1,1 – 5,7)	(8,6 – 12,7)	(6,9 – 20,9)

Dados da carga proviral expressos em porcentagem de PBMC infectado pelo HTLV-1.

ASS: Assintomático, PS: Possível, PB: Provável, D: Definido.

HLA-C grupo-1: C*01, C*03, C*07, C*08, C*12, C*13, C*14 e C*16 (KULKARNI; MARTIN; CARRINGTON, 2008)

Mann-Whitney * $p=0,013$; ** $p=0,03$; † $p=0,051$

Tanto os indivíduos assintomáticos quanto os com HAM/TSP-Pb que apresentavam o gene *KIR2DL2* em associação com o alelo *HLA-C*07* tiveram carga proviral menor comparado aos indivíduos com o gene *KIR2DL2* isolado. Em relação ao gene *KIR2DL3*, cargas provirais similares foram observadas tanto na presença quanto ausência dos alelos de HLA-C do grupo 1.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou pela primeira vez associação protetora entre a presença do gene do receptor *KIR2DL2* e de algum dos alelos dos seus ligantes HLA-C do grupo 1, sendo que menor carga proviral do HTLV-1 foi observada nos pacientes que apresentavam esta combinação. Além disso, redução da carga proviral também foi observada no grupo de indivíduos assintomático que tinham o gene *KIR2DL2* e o alelo *HLA-C*07*. Os indivíduos com HAM/TSP provável que também tinham essa combinação apresentaram carga proviral menor, porém a diferença ficou no limite da significância estatística ($p=0,051$).

A frequência do gene *KIR2DL2* é bastante heterogênea no Brasil. Já foi descrita a frequência de 75% em uma população de Belém (PEDROZA et al., 2011), enquanto que em um estudo realizado em Rondônia foi observada frequência de 26,1% para o *KIR2DL2* (SINGLE et al., 2007). Esta diferença exemplifica a grande diversidade genética presente na população brasileira, fruto da colonização heterogênea e migração contínua da população. Em relação ao gene *KIR2DL3*, sua distribuição mundial é mais homogênea e frequências similares à encontrada neste estudo já foram reportadas em Rondônia (97,8%) e Amazônia (93,8%) (SINGLE et al., 2007).

Para verificar se a associação observada entre os genes *KIR2DL2* e HLA-C do grupo 1 e a carga proviral era decorrente apenas do efeito do *HLA-C*07*, a análise foi repetida excluindo-se os indivíduos que apresentavam o *HLA-C*07*. Surpreendentemente, o mesmo efeito foi observado, portadores dos genes *KIR2DL2* e algum dos alelos de HLA-C do grupo 1 apresentaram uma menor carga proviral que os portadores apenas de *KIR2DL2* ($p=0,048$).

Um achado interessante neste estudo foi que a redução da carga proviral, na presença da associação do gene *KIR2DL2* e o alelo *HLA-C*07*, foi observada em indivíduos assintomáticos. Os indivíduos assintomáticos são aqueles que não apresentam as doenças associadas ao HTLV-1, embora possam apresentar alterações reumatológicas, neurológicas como parestesias, disfunção erétil entre outros (CASKEY et al., 2007). Poder-se-ia especular que a associação entre os receptores *KIR2DL2* e de seus ligantes (alelos do HLA de classe I do grupo C), teria um efeito protetor reduzindo a carga proviral e protegendo contra o desenvolvimento das doenças associadas. Indivíduos com HAM/TSP apresentam carga proviral mais elevada em comparação a indivíduos assintomáticos (NAGAI et al., 1998). Um ponto de corte de 5% de células infectadas foi descrito como o melhor valor de carga proviral para diferenciar indivíduos assintomáticos de pacientes com HAM/TSP (GRASSI et al., 2011). No entanto, o desenho de corte transversal do presente estudo não permite avaliar essa

inferência. Estudos prospectivos devem ser conduzidos com maior número de indivíduos para avaliar se a associação entre *KIR2DL2* e algum dos seus ligantes é um fator protetor para o desenvolvimento de doença associada.

Associações entre os genes KIR e HLA podem influenciar o desfecho de infecções virais. De maneira geral, genótipos que teoricamente predispõem menor inibição e maior ativação podem ser benéficos contra infecções virais, enquanto que genótipos de ativação representam um risco para doenças autoimunes e neoplasias que estão associados à inflamação localizada, como o câncer cervical (BASHIROVA et al., 2006). Na infecção pelo HIV, indivíduos que apresentam a combinação dos genes *KIR3DS1* e de seu ligante HLA-B Bw4^{80I} apresentam progressão mais lenta para AIDS, menor carga viral e proteção contra infecções oportunistas (MARTIN, M. P.; GAO; et al., 2002; QI et al., 2006). Em concordância com o suposto efeito protetor de um gene KIR de ativação em infecções virais, o gene *KIR3DS1* em combinação com os alelos HLA-Bw4 demonstrou efeito protetor associado com a resolução da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) (KHAKOO et al., 2004).

Interessantemente, estudos também têm demonstrado associações protetoras entre genes KIR de inibição e seus ligantes em infecções virais. Um estudo realizado na mesma coorte na qual foi demonstrada a associação entre *KIR3DS1* e HLA-Bw4, demonstrou que alótipos do KIR3DL1 que possuem uma alta expressão, KIR3DL1*h, juntamente com seus ligantes HLA-Bw4^{80I}, estavam associados a uma menor carga viral e progressão mais lenta para AIDS comparados a indivíduos que possuíam outros alótipos KIR3DL1/HLA-B (MARTIN, M. P. et al., 2007). Os genes *KIR2DL3* e HLA-C do grupo 1 em homozigose também tiveram um efeito protetor, sendo associado a resolução da infecção pelo HCV (KHAKOO et al., 2004). Basatena e colaboradores observaram que o gene *KIR2DL2* reforçava o efeito dos genes de HLA na infecção pelo HTLV-1 e HCV. Em indivíduos infectados pelo HTLV-1, a presença do gene *KIR2DL2* reforçava tanto o efeito protetor do alelo *HLA-C**08* quanto o efeito prejudicial do alelo *HLA-B*54*. Diferentemente do nosso estudo, este trabalho de Basatena não observou associação entre o gene *KIR2DL2* e os alelos de HLA-C do grupo 1 de forma geral, a associação foi detectada apenas com o alelo *HLA-C*08*. Além disso, o subtipo do *HLA-C*08* mais frequente neste estudo realizado na população japonesa foi o *HLA-C*0801*, que se liga muito fracamente a KIR2DL2 (WINTER et al., 1998). Devido a isto, entre outros fatores, os autores propõem que o efeito observado do gene *KIR2DL2* seja decorrente da sua expressão em células T CD8⁺ e não em células NK.

Nossos resultados demonstram a associação do genes *KIR2DL2* com os seus ligantes HLA-C do grupo 1, e assim, suporta possível efeito das células NK no controle da carga proviral.

Apesar da associação protetora entre um receptor KIR de inibição e seu ligante, no contexto de uma infecção viral, parecer controversa, esses dados podem ser justificados pela hierarquia da força de interação entre os receptores KIR2DL e os seus ligantes HLA-C, no qual a interação entre KIR2DL1-HLA-C do grupo 2 é a mais forte, enquanto que KIR2DL3-HLA-C do grupo 1 é a interação mais fraca (MAENAKA et al., 1999; VALES-GOMEZ; REYBURN; STROMINGER, 2000; WINTER et al., 1998). Isto poderia explicar, em parte, a redução da carga proviral observada nos indivíduos com os genes *KIR2DL2*+HLA-C do grupo 1. Essa interação pode desencadear sinais de inibição mais fracos em relação à *KIR2DL1*+HLA-C do grupo 2 permitindo que o estado de inibição da célula NK possa ser mais facilmente superado pelos estímulos de ativação, favorecendo assim a destruição das células infectadas.

Outro modo pelos quais os receptores KIR de inibição podem contribuir para a imunidade antiviral é através da expressão de KIR2DL2 em células T CD8⁺. A expressão de receptores KIR em um subconjunto de células T CD8⁺ com fenótipo de memória efetora já foi demonstrada em infecções crônicas como HIV-1, EBV e HCV (ALTER et al., 2008; BONORINO et al., 2007; POON et al., 2005). Além disso, a esta expressão de KIR em células T CD8⁺ foi associada a níveis elevados da molécula anti-apoptótica Bcl-2 e com baixo nível de morte celular (YOUNG et al., 2001). Dessa forma, a expressão de KIR2DL2 em células T CD8⁺ poderia contribuir para redução da morte destas células e contribuir para o controle da carga proviral. As células NK também atuam na destruição de células T ativadas e a expressão de KIR2DL2 sobre as células NK pode contribuir para menor destruição das células T e favorecer o controle da infecção (SODERQUEST et al., 2011).

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a associação entre os genes *KIR2DL2*/HLA-C do grupo 1 contribui para o controle da carga proviral em indivíduos infectados pelo HTLV-1. Este resultado auxilia na compreensão dos possíveis mecanismos envolvidos no controle da carga proviral do HTLV-1. Porém, este feito protetor da associação entre os genes *KIR2DL2* e HLA-C do grupo 1 precisa ser confirmado por estudos posteriores e ensaios funcionais são necessários para elucidar o mecanismo pelo qual este receptor pode contribuir para o controle da infecção pelo HTLV-1.

7. CONCLUSÕES

Indivíduos infectados pelo HTLV-1 que apresentam os genes *KIR2DL2* e algum dos alelos de HLA-C do grupo 1 apresentam melhor controle da carga proviral comparados a indivíduos que possuem apenas o gene *KIR2DL2*.

O gene *KIR2DL2* e o alelo *HLA-C*07* foram associados a menor carga proviral em indivíduos assintomáticos e com HAM/TSP-PB.

Não foi observada associação entre o gene *KIR2DL3* ao controle da carga proviral ou a presença de HAM/TSP no grupo estudado.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar análise de ancestralidade na população de estudo para avaliar a presença de viés devido às diferenças genéticas entre as populações.
- Avaliar a expressão dos receptores KIR2DL2 e KIR2DL3 e HLA de classe I em células NK e linfócitos T de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

REFERÊNCIAS

- ABI-RACHED, L.; PARHAM, P. Natural selection drives recurrent formation of activating killer cell immunoglobulin-like receptor and Ly49 from inhibitory homologues. **J. Exp. Med.**, v. 201, n. 8, p. 1319-1332, apr 18 2005.
- ALTER, G. et al. Ligand-independent exhaustion of killer immunoglobulin-like receptor-positive CD8⁺ T cells in human immunodeficiency virus type 1 infection. **J. Virol.**, v. 82, n. 19, p. 9668-9677, oct 2008.
- ARNOLD, J. et al. Human T-cell leukemia virus type-1 antisense-encoded gene, Hbz, promotes T-lymphocyte proliferation. **Blood**, v. 112, n. 9, p. 3788-3797, nov 1 2008.
- ASQUITH, B.; BANGHAM, C. R. How does HTLV-I persist despite a strong cell-mediated immune response? **Trends Immunol**, v. 29, n. 1, p. 4-11, jan 2008.
- BANGHAM, C. R.; OSAME, M. Cellular immune response to HTLV-1. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6035-6046, sep 5 2005.
- BAR, E. et al. IL-17 regulates systemic fungal immunity by controlling the functional competence of NK cells. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 117-127, jan 16 2014.
- BARROW, A. D.; TROWSDALE, J. You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling. **Eur. J. Immunol.**, v. 36, n. 7, p. 1646-1653, Jul 2006.
- BASHIROVA, A. A. et al. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 7, p. 277-300, 2006.
- BIASSONI, R. et al. Human natural killer cell receptors: insights into their molecular function and structure. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 7, n. 4, p. 376-387, oct-dec 2003.
- BILLADEAU, D. D.; LEIBSON, P. J. ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. **J. Clin. Invest**, v. 109, n. 2, p. 161-168, Jan 2002.
- BINDHU, M.; NAIR, A.; LAIRMORE, M. D. Role of accessory proteins of HTLV-1 in viral replication, T cell activation, and cellular gene expression. **Front. Biosci.**, v. 9, p. 2556-2576, Sep 1 2004.
- BISWAS, H. H. et al. Neurologic abnormalities in HTLV-I- and HTLV-II-infected individuals without overt myelopathy. **Neurology**, v. 73, n. 10, p. 781-789, Sep 8 2009.

BONORINO, P. et al. Features and distribution of CD8 T cells with human leukocyte antigen class I-specific receptor expression in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 46, n. 5, p. 1375-1386, nov 2007.

BRYCESON, Y. T. et al. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 159-166, jan 1 2006.

CALATTINI, S. et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, v. 2, p. 30, 2005.

CALIGIURI, M. A. Human natural killer cells. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 461-9, aug 1 2008.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. et al. [Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 5, p. 499-508, sep-oct 2002.

CARR, W. H.; PANDO, M. J.; PARHAM, P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. **J. Immunol.**, v. 175, n. 8, p. 5222-5229, oct 15 2005.

CARRINGTON, M. et al. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. **J. Exp. Med.**, v. 201, n. 7, p. 1069-75, apr 4 2005.

CARRINGTON, M. A. N., P. **The KIR gene cluster**. 2003.

CASKEY, M. F. et al. Clinical manifestations associated with HTLV type I infection: a cross-sectional study. **AIDS Res. Human Retrov.**, v. 23, n. 3, p. 365-371, mar 2007.

CASTRO-LIMA VARGENS, C. et al. Keratoconjunctivitis sicca of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infected individuals is associated with high levels of HTLV-1 proviral load. **J. Clin. Virol.**, v. 52, n. 3, p. 177-180, nov 2011.

CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B.; PROIETTI, F. A. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cad. Saude Publ.**, v. 21, n. 3, p. 926-931, may-jun 2005.

CATALAN-SOARES, B. C. et al. HLA class I alleles in HTLV-1-associated myelopathy and asymptomatic carriers from the Brazilian cohort GIPH. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 198, n. 1, p. 1-3, feb 2009.

CATALAN-SOARES, B. C.; PROIETTI, F. A.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. D. F. Os vírus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000): aspectos epidemiológicos. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 4, p. 81-95, 2001.

CERWENKA, A.; LANIER, L. L. Natural killer cells, viruses and cancer. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 1, n. 1, p. 41-49, oct 2001.

CHAN, H. W. et al. Epigenetic control of highly homologous killer Ig-like receptor gene alleles. **J. Immunol.**, v. 175, n. 9, p. 5966-5974, nov 1 2005.

CHEENT, K.; KHAKOO, S. I. Natural killer cells: integrating diversity with function. **Immunology**, v. 126, n. 4, p. 449-457, apr 2009.

COOK, M. et al. Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation. **Blood**, v. 107, n. 3, p. 1230-1232, feb 1 2006.

COPELAND, K. F. et al. Inhibition of apoptosis in T cells expressing human T cell leukemia virus type I Tax. **AIDS Res. Human Retrov.**, v. 10, n. 10, p. 1259-1268, oct 1994.

DAENKE, S. et al. Sequence variants of human T-cell lymphotropic virus type I from patients with tropical spastic paraparesis and adult T-cell leukemia do not distinguish neurological from leukemic isolates. **J. Virol.**, v. 64, n. 3, p. 1278-1282, mar 1990.

DE CASTRO-COSTA, C. M. et al. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). **AIDS Res. Human Retrov.**, v. 22, n. 10, p. 931-935, oct 2006.

DE MARIA, A. et al. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 108, n. 2, p. 728-732, jan 11 2011.

DEHEE, A. et al. Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. **J. Virol. Meth.**, v. 102, n. 1-2, p. 37-51, apr 2002.

DOONEIEF, G. et al. Neurologic consequences of HTLV-II infection in injection-drug users. **Neurology**, v. 46, n. 6, p. 1556-1560, jun 1996.

DOURADO, I. et al. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 34, n. 5, p. 527-5231, dec 15 2003.

FELBER, B. K. et al. The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its long terminal repeats. **Science**, v. 229, n. 4714, p. 675-679, aug 16 1985.

FEUER, G.; GREEN, P. L. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 5996-6004, sep 5 2005.

GALVAO-CASTRO, B. et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion**, v. 37, n. 2, p. 242-243, feb 1997.

GESSAIN, A. et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v. 2, n. 8452, p. 407-410, aug 24 1985.

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. **Front. Microbiol.**, v. 3, p. 388, 2012.

GOUBAU, P.; VANDAMME, A. M.; DESMYTER, J. Questions on the evolution of primate T-lymphotropic viruses raised by molecular and epidemiological studies of divergent strains. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Human Retrovirol.**, v. 13 Suppl 1, p. S242-247, 1996.

GRANT, C. et al. Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. **J. Cell. Physiol.**, v. 190, n. 2, p. 133-159, feb 2002.

GRASSI, M. F. et al. Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load of HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients according to new diagnostic criteria of HAM/TSP. **J. Med. Virol.**, v. 83, n. 7, p. 1269-1274, jul 2011.

GUMPERZ, J. E. et al. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. **J. Exp. Med.**, v. 181, n. 3, p. 1133-1144, mar 1 1995.

HANON, E. et al. Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. **Immunity**, v. 13, n. 5, p. 657-664, nov 2000.

HINUMA, Y. et al. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, n. 10, p. 6476-6480, oct 1981.

HISHIZAWA, M. et al. Kinetics of proviral DNA load, soluble interleukin-2 receptor level and tax expression in patients with adult T-cell leukemia receiving allogeneic stem cell transplantation. **Leukemia**, v. 18, n. 1, p. 167-169, jan 2004.

HLELA, C. et al. The prevalence of human T-cell lymphotropic virus type 1 in the general population is unknown. **AIDS Rev.**, v. 11, n. 4, p. 205-214, oct-dec 2009.

HOGLUND, P. et al. Recognition of beta 2-microglobulin-negative (beta 2m-) T-cell blasts by natural killer cells from normal but not from beta 2m- mice: nonresponsiveness controlled by beta 2m- bone marrow in chimeric mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 22, p. 10332-10336, nov 15 1991.

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. 5118-5129, nov 1 2002.

JEANG, K. T. et al. HTLV-I trans-activator protein, tax, is a trans-repressor of the human beta-polymerase gene. **Science**, v. 247, n. 4946, p. 1082-1084, mar 2 1990.

JEFFERY, K. J. et al. The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection. **J. Immunol.**, v. 165, n. 12, p. 7278-7284, dec 15 2000.

JEFFERY, K. J. et al. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 7, p. 3848-3853, mar 30 1999.

JIN, D. Y.; SPENCER, F.; JEANG, K. T. Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1. **Cell**, v. 93, n. 1, p. 81-91, apr 3 1998.

JONCKER, N. T.; RAULET, D. H. Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells. **Immunol. Rev.**, v. 224, p. 85-97, aug 2008.

JONES, K. S. et al. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. **Nat. Med.**, v. 14, n. 4, p. 429-436, apr 2008.

KALYANARAMAN, V. S. et al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, v. 218, n. 4572, p. 571-573, nov 5 1982.

KHAKOO, S. I. et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. **Science**, v. 305, n. 5685, p. 872-874, aug 6 2004.

KIM, S. et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 709-713, aug 4 2005.

KIM, S. J. et al. Transactivation of the transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) gene by human T lymphotropic virus type 1 tax: a potential mechanism for the increased production of TGF-beta 1 in adult T cell leukemia. **J. Exp. Med.**, v. 172, n. 1, p. 121-129, jul 1 1990.

KINOSHITA, K. et al. Demonstration of adult T-cell leukemia virus antigen in milk from three sero-positive mothers. **Gann**, v. 75, n. 2, p. 103-105, feb 1984.

KOMURIAN, F.; PELLOQUIN, F.; DE THE, G. In vivo genomic variability of human T-cell leukemia virus type I depends more upon geography than upon pathologies. **J. Virol.**, v. 65, n. 7, p. 3770-3778, jul 1991.

KOYANAGI, Y. et al. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. **Virology**, v. 196, n. 1, p. 25-33, sep 1993.

KULKARNI, S.; MARTIN, M. P.; CARRINGTON, M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. **Semin. Immunol.**, v. 20, n. 6, p. 343-352, dec 2008.

LANIER, L. L. Activating and inhibitory NK cell receptors. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 452, p. 13-18, 1998.

_____. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. **Nat. Immunol.**, v. 9, n. 5, p. 495-502, may 2008.

LARSEN, O. et al. Prevalences of HTLV-1 infection and associated risk determinants in an urban population in Guinea-Bissau, West Africa. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 25, n. 2, p. 157-163, oct 1 2000.

LEMASSON, I. et al. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) bZIP protein interacts with the cellular transcription factor CREB to inhibit HTLV-1 transcription. **J. Virol.**, v. 81, n. 4, p. 1543-1553, feb 2007.

LEUNG, K.; NABEL, G. J. HTLV-1 transactivator induces interleukin-2 receptor expression through an NF-kappa B-like factor. **Nature**, v. 333, n. 6175, p. 776-778, jun 23 1988.

LIAO, N. S. et al. MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. **Science**, v. 253, n. 5016, p. 199-202, jul 12 1991.

LJUNGGREN, H. G.; KARRE, K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. **Immunol. Today**, v. 11, n. 7, p. 237-244, jul 1990.

LONG, E. O. et al. Inhibition of natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158). **Immunol. Rev.**, v. 181, p. 223-233, jun 2001.

MACNAMARA, A. et al. HLA class I binding of HBZ determines outcome in HTLV-1 infection. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 9, p. e1001117, 2010.

MAENAKA, K. et al. Killer cell immunoglobulin receptors and T cell receptors bind peptide-major histocompatibility complex class I with distinct thermodynamic and kinetic properties. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 40, p. 28329-28334, oct 1 1999.

MARTIN, A. M. et al. Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. **Gene**, v. 335, p. 121-131, jun 23 2004.

MARTIN, M. P. et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. **Nat. Genet.**, v. 31, n. 4, p. 429-434, aug 2002.

MARTIN, M. P. et al. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. **J. Immunol.**, v. 169, n. 6, p. 2818-2822, sep 15 2002.

MARTIN, M. P. et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. **Nat. Genet.**, v. 39, n. 6, p. 733-740, jun 2007.

MATSUZAKI, T. et al. HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. **J. Neurovirol.**, v. 7, n. 3, p. 228-234, jun 2001.

MIDDLETON, D.; CURRAN, M.; MAXWELL, L. Natural killer cells and their receptors. **Transpl. Immunol.**, v. 10, n. 2-3, p. 147-164, aug 2002.

MINGARI, M. C.; MORETTA, A.; MORETTA, L. Regulation of KIR expression in human T cells: a safety mechanism that may impair protective T-cell responses. **Immunol. Today**, v. 19, n. 4, p. 153-157, apr 1998.

MOCHIZUKI, M. et al. HTLV-I and uveitis. **Lancet**, v. 339, n. 8801, p. 1110, may 2 1992.

MOESTA, A. K. et al. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. **J. Immunol.**, v. 180, n. 6, p. 3969-3979, mar 15 2008.

MONTANHEIRO, P. A. et al. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA viral load among asymptomatic patients and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n. 11, p. 1643-1647, nov 2005.

MORETTA, L. et al. Human natural killer cell function and receptors. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 1, n. 4, p. 387-391, aug 2001.

MULLOY, J. C. et al. Human T-cell lymphotropic/leukemia virus type 1 Tax abrogates p53-induced cell cycle arrest and apoptosis through its CREB/ATF functional domain. **J. Virol.**, v. 72, n. 11, p. 8852-8860, nov 1998.

MURPHY, E. L. et al. Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). **Ann. Intern. Med.**, v. 111, n. 7, p. 555-560, oct 1 1989.

NAGAI, M. et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. **J. Neurovirol.**, v. 4, n. 6, p. 586-593, dec 1998.

NAUMOVA, E. et al. Genetic polymorphism of NK receptors and their ligands in melanoma patients: prevalence of inhibitory over activating signals. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 54, n. 2, p. 172-178, feb 2005.

OLINDO, S. et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression. **J. Neurol. Sci.**, v. 237, n. 1-2, p. 53-59, oct 15 2005.

ONO, A. et al. Increased number of circulating HTLV-1 infected cells in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-1 uveitis patients: a quantitative polymerase chain reaction study. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 79, n. 3, p. 270-276, mar 1995.

ORGANIZATION, W. H. Report of the scientific group on HTLV-1 infection and associated diseases; December 10-15, 1988; Kagoshima, Japan. Viral disease: HTLV-1. **WHO Wkly Epidemiol. Rec.**, v. 49, p. 382-383, 1989.

ORR, M. T.; LANIER, L. L. Natural killer cell education and tolerance. **Cell**, v. 142, n. 6, p. 847-856, sep 17 2010.

OSAME, M. et al. Blood transfusion and HTLV-I associated myelopathy. **Lancet**, v. 2, n. 8498, p. 104-105, jul 12 1986.

PARHAM, P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, n. 3, p. 201-214, mar 2005.

PAROLINI, S. et al. X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. **J. Exp. Med.**, v. 192, n. 3, p. 337-346, aug 7 2000.

PEDROZA, L. S. et al. Systemic lupus erythematosus: association with KIR and SLC11A1 polymorphisms, ethnic predisposition and influence in clinical manifestations at onset revealed by ancestry genetic markers in an urban Brazilian population. **Lupus**, v. 20, n. 3, p. 265-273, Mar 2011.

POIESZ, B. J. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. U SA**, v. 77, n. 12, p. 7415-7419, dec 1980.

POON, K. et al. Expression of leukocyte immunoglobulin-like receptors and natural killer receptors on virus-specific CD8+ T cells during the evolution of Epstein-Barr virus-specific immune responses in vivo. **Viral Immunol**, v. 18, n. 3, p. 513-522, 2005.

PROIETTI, A. B. F. C. Caderno Hemominas. v. 13, n. 4 ed. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais. 2006.

PROIETTI, F. A. et al. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6058-6068, sep 5 2005.

QI, Y. et al. KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. **PLoS Pathog.**, v. 2, n. 8, p. e79, aug 2006.

RAJALINGAM, R. Overview of the killer cell immunoglobulin-like receptor system. **Meth. Mol. Biol.**, v. 882, p. 391-414, 2012.

ROMAN, G. C.; OSAME, M. Identity of HTLV-I-associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I-associated myelopathy. **Lancet**, v. 1, n. 8586, p. 651, mar 19 1988.

ROMERO, V. et al. Interaction of NK inhibitory receptor genes with HLA-C and MHC class II alleles in Hepatitis C virus infection outcome. **Mol. Immunol.**, v. 45, n. 9, p. 2429-2436, may 2008.

SABOURI, A. H. et al. Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals. **J. Gen. Virol.**, v. 86, n. pt 3, p. 773-781, mar 2005.

SAMBROOK, J. G. et al. Identification of the ancestral killer immunoglobulin-like receptor gene in primates. **BMC Genomics**, v. 7, p. 209, 2006.

SANTOURLIDIS, S. et al. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. **J. Immunol.**, v. 169, n. 8, p. 4253-4261, oct 15 2002.

SATOH, M. et al. Predictive markers for development of strongyloidiasis in patients infected with both *Strongyloides stercoralis* and HTLV-1. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 133, n. 3, p. 391-396, sep 2003.

SATOU, Y. et al. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 3, p. 720-725, jan 17 2006.

SEICH AL BASATENA, N. K. et al. KIR2DL2 enhances protective and detrimental HLA class I-mediated immunity in chronic viral infection. **PLoS Pathog.**, v. 7, n. 10, p. e1002270, oct 2011.

SHILLING, H. G. et al. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. **J. Immunol.**, v. 168, n. 5, p. 2307-2315, mar 1 2002.

SINGLE, R. M. et al. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. **Nat. Genet.**, v. 39, n. 9, p. 1114-1119, sep 2007.

SODERQUEST, K. et al. Cutting edge: CD8+ T cell priming in the absence of NK cells leads to enhanced memory responses. **J. Immunol.**, v. 186, n. 6, p. 3304-3308, mar 15 2011.

TAKENOUCHI, N.; YAO, K.; JACOBSON, S. Immunopathogenesis of HTLV-I associated neurologic disease: molecular, histopathologic, and immunologic approaches. **Front. Biosci.**, v. 9, p. 2527-2539, sep 1 2004.

TALLEDO, M. et al. Role of killer cell immunoglobulin-like receptor gene content and human leukocyte antigen-C group in susceptibility to human T-lymphotropic virus 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Peru. **Human Immunol.**, v. 71, n. 8, p. 804-808, aug 2010.

THIELENS, A.; VIVIER, E.; ROMAGNE, F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 24, n. 2, p. 239-245, apr 2012.

TONEVA, M. et al. Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. **Tissue Antigens**, v. 57, n. 4, p. 358-362, apr 2001.

TRAPANI, J. A. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. **Genome Biol.**, v. 2, n. 12, p. Reviews3014, 2001.

TSCHACHLER, E. et al. Human T-lymphotropic virus type I tax regulates the expression of the human lymphotoxin gene. **Blood**, v. 81, n. 1, p. 95-100, jan 1 1993.

UHRBERG, M.; PARHAM, P.; WERNET, P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. **Immunogenetics**, v. 54, n. 4, p. 221-229, jul 2002.

UHRBERG, M. et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. **Immunity**, v. 7, n. 6, p. 753-763, dec 1997.

UHRBERG, M. et al. The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94:NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical alpha beta TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns. **J. Immunol.**, v. 166, n. 6, p. 3923-3932, mar 15 2001.

URETA-VIDAL, A. et al. Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. **Int. J. Cancer**, v. 82, n. 6, p. 832-836, sep 9 1999.

VALES-GOMEZ, M.; REYBURN, H.; STROMINGER, J. Molecular analyses of the interactions between human NK receptors and their HLA ligands. **Human Immunol.**, v. 61, n. 1, p. 28-38, jan 2000.

VALIANTE, N. M. et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. **Immunity**, v. 7, n. 6, p. 739-751, dec 1997.

VILCHES, C.; PANDO, M. J.; PARHAM, P. Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D2 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain. **Immunogenetics**, v. 51, n. 8-9, p. 639-646, jul 2000.

VILCHES, C.; PARHAM, P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 217-251, 2002.

VIVIER, E. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**, v. 331, n. 6013, p. 44-49, jan 7 2011.

WHANG, D. H. et al. Haplotype analysis of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in 77 Korean families. **Human Immunol.**, v. 66, n. 2, p. 146-154, feb 2005.

WILLIAMS, A. P.; BATEMAN, A. R.; KHAKOO, S. I. Hanging in the balance. KIR and their role in disease. **Mol. Interv.**, v. 5, n. 4, p. 226-240, aug 2005.

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. 4778-4783, apr 25 2000.

WINTER, C. C. et al. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. **J. Immunol.**, v. 161, n. 2, p. 571-577, jul 15 1998.

WOLFE, N. D. et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, n. 22, p. 7994-7799, may 31 2005.

YAKOVA, M. et al. Increased proviral load in HTLV-1-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. **Retrovirology**, v. 2, p. 4, 2005.

YAO, J.; WIGDAHL, B. Human T cell lymphotropic virus type I genomic expression and impact on intracellular signaling pathways during neurodegenerative disease and leukemia. **Front. Biosci.**, v. 5, p. D138-68, jan 1 2000.

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. 543-550, nov 2002.

YOUNG, N. T. et al. Differential expression of leukocyte receptor complex-encoded Ig-like receptors correlates with the transition from effector to memory CTL. **J. Immunol.**, v. 166, n. 6, p. 3933-3941, mar 15 2001.

YOUNIS, I.; GREEN, P. L. The human T-cell leukemia virus Rex protein. **Front. Biosci.**, v. 10, p. 431-445, jan 1 2005.

APÊNCICE

Association of genes *KIR2DL2/KIR2DL3* and HLA-C alleles group 1 with associated myelopathy HTLV-1/tropical spastic paraparesis (HAM / TSP)

Igor Ives Santos Fraga, Viviana Nilla Olavarria, Andreas Stöcker, Becca Asquith, Bernardo Galvão Castro, Maria Fernanda Rios Grassi

ABSTRACT

The control of proviral load of HTLV-1 depends in part of the lysis of infected cells mediated by cytotoxic CD8⁺T lymphocytes and NK (Natural killer) cells. The family of KIR (killer-cell immunoglobulin-like receptor) interacts with HLA class I molecules, especially those HLA-C alleles in-group 1 (*C*01*, *C*03*, *C*07*, *C*08*, *C*12*, *C*13*, *C*14* and *C*16*) by activating or inhibiting the function of these cells. The aim of this study was to evaluate if the *KIR2DL2*, *KIR2DL3* genes and group 1 HLA-C alleles are associated with the control of proviral load of HTLV-1 and the diagnosis of HAM/TSP. The study was performed at Bahiana School HTLV Center of Medicine and Health Public, in Salvador, Bahia. The presence of *KIR2DL2* and *KIR2DL3* genes was determined by real-time PCR (Syber Green). The study included 248 subjects infected with HTLV-1 (161 and 87 asymptomatic with HAM/TSP) whose HLA class I alleles were previously determined. The proviral load (quantified by real-time PCR) and the frequency asymptomatic individuals diagnosed with HAM/TSP (possibly, probably and definitive) were compared according to the presence or absence of KIR genes evaluated. The frequencies of *KIR2DL2* and *KIR2DL3* genes were 84.3% and 96.8%, respectively. No statistically significant differences were observed in the frequency of individuals who possessed the genes (*KIR2DL2* or *KIR2DL3*) in clinical groups, as well as the frequency of individuals who had both the KIR genes and HLA-C alleles group 1. Individuals in the group HAM/TSP possible to *KIR2DL2* showed that the gene had lower proviral load (2.9% of cells infected) individuals without this gene (19.2% infected cells) ($p < 0.001$). When we evaluated the combination of the presence of *KIR2DL2* and *2DL3* genes with HLA-C genes in group 1, lower proviral load (2.1%) was observed in individuals with any of the alleles of HLA-C group 1, compared who those which harbored only *KIR2DL2* (5.0%) ($p = 0.013$). Minor proviral load was also observed in asymptomatic individuals which carried both the *KIR2DL2* gene and *HLA-C*07* allele when compared to individuals with only

KIR2DL2 gene ($p=0.03$), whereas patients with HAM/TSP-PB that had this combination (*KIR2DL2/HLA-C*07*) tended to lower proviral load ($p=0.051$). In conclusion, the presence of the combination of *KIR2DL2* gene and a HLA-C group 1 allele is associated with proviral load control. This study quantified for the first time the frequencies of KIR genes in a cohort of individuals infected with HTLV-1 in Bahia. Future studies are needed to confirm these findings in other populations and to evaluate the prognostic value of *KIR2DL2* association and HLA-C group 1.

Keywords: HTLV-1; KIR; HAM/TSP; HLA.

INTRODUCTION

The human T-lymphotropic virus (HTLV-1) is the etiologic agent of the HTLV-1 associated myelopathy / tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) (GESSAIN et al., 1985), a neurological disease characterized by spastic paraparesis, progressive loss of motor function, especially in the lower limbs. Although HAM/TSP pathogenesis remains unclear, HTLV-1 proviral load has been identified as a possible biomarker for the development of this disease. Patients with HAM/TSP have HTLV-1 proviral load significantly higher than asymptomatic individuals, especially those with more than 5% of infected cells (Grassi et al, 2011; OLINDO et al, 2005, Nagai.)

The balance between the spontaneous proliferation of T-lymphocytes, triggered by the viral protein Tax, and the lyses of infected cells maintain the HTLV-1 proviral load stable in infected individuals. Cytotoxic CD8⁺ T-lymphocytes (CTLs) and NK cells lyse infected cells by recognizing viral peptides presented by HLA class I molecules of infected cells and decrease or absence of HLA class I on the infected cells, respectively.

An association has been reported between the presence of a specific HLA class I genotypes and development or protection for HAM/TSP, but with controversial results depending on the studied population. For example, in Japan the presence of both HLA-A*02 and HLA-C*08 alleles was associated with low risk for HAM/TSP development, while HLA-B*5401 allele was associated with HAM/TSP development. (JEFFERY et al., 2000). In contrast, no associations were found between HLA class I alleles and presence of HAM/TSP in Iran (SABOURI et al., 2005). In Brazil, one study found a similar frequency of HLA-C*08 allele in asymptomatic individuals and HAM / TSP patients. In addition, HLA-A* 02 allele was more common in asymptomatic patients and, in its absence, HLA-C*07 was associated

with presence of HAM/TSP. The HLA-B*5401 allele was not found in the Brazilian population (CATALAN-Soares et al., 2009).

NK cells are components of innate immunity that exert a cytotoxic role and are important in the control of viral infections. Viral infections which promote the reduction of HLA class I expression in infected cells as a CTL escape mechanism, make these cells susceptible to lysis by NK cells (JONCKER; RAULET, 2008). The function of NK cells is controlled by the balance between inhibition and signals triggered by activation of transmembrane killer immunoglobulin-like receptors (KIR) (MINGARI; MORETTA; MORETTA, 1998). The KIR family is composed of 12 receptors expressed primarily on NK cells and in some T-lymphocyte subtypes. Depending on the interaction between KIR and HLA class I molecules CTL and NK cell the function of CTL and NK cells maybe activated or inhibited (PARHAM, 2005). Several genetic studies have demonstrated the influence of the KIR / HLA molecules interaction on the outcome of various viral infections such as HIV, HCV and CMV (COOK et al., 2006; KHAKOO et al., 2004; MARTIN et al., 2002). With respect to HTLV-1 infection, a study conducted in Japan found that the presence of KIR2DL2 gene either reinforced the protective effect of HLA-C* 08 allele and as the detrimental effect of the HLA-B*54(SEICH AL BASATENA et al., 2011). However, these findings were not observed in Peruvian individuals observed (TALLEDO et al., 2010). This study intends to evaluate whether the presence of KIR2DL2 and/or KIR2DL3 genes in combination with HLA C do grupo 1 (C*01, C*03, C*07, C*08, C*12, C*13, C*14 e C*16) molecules are associated with the development of HAM/TSP and control of proviral load in patients from Salvador, Brazil.

METHODS

STUDY DESIGN

It is a cross-sectional study involving patients treated at Bahia School HTLV Center of Medicine and Public Health. The CHTLV has a bank of DNA samples from 420 patients (280 asymptomatic and 140 with HAM / TSP), of which about 70% are female (about 300 patients). These samples had previously been collected and the DNA extracted using the Qiagen kit (QIAamp DNA Mini Kit BLOOD 250) according to the recommendations of fabricante. A DNA concentration of each sample was determined by spectrophotometry using Nanodrop™ 2000 / 2000c (ThermoScientific, Wilmington, Delaware, USA) .There were included all individuals infected with HTLV-1 clinical status defined for which the HLA class

I genotyping was performed on a previous project. All individuals infected with HTLV-1 have been previously evaluated by a neurologist and classified according to their clinical status in asymptomatic (ASS), HAM / TSP-likely (PB), HAM / TSP-possible (PS) and HAM / TSP -definido (D). This project was approved by the Ethics Committee of Fiocruz Research.

MEASUREMENT OF HTLV-1 PROVIRAL LOAD

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) blood by density gradient centrifugation, and cryopreserved until use. DNA was extracted using a spin column DNA extraction system (QUIAGEN, Germany). HTLV-1-PVL was measured using a real-time TaqMan PCR method, in accordance with Dehéee et al. Albumin DNA was used as an endogenous reference. The value of HTLV-1-PVL was reported as the [(HTLV-1 average copy number)/(albumin average copy number)] x 2 x 10⁶ and expressed as the number of HTLV-1 copies per 106 PBMCs. All HTLV-1-PVL measurements were performed in duplicates. The analysis was repeated when there was a variation greater than 30% between duplicate values of HTLV-I or albumin DNA copy numbers.

FREQUENCY OF *KIR2DL2* AND *KIR2DL3* GENES

The presence of *KIR2DL2* and *KIR2DL3* genes was determined by real-time PCR with SYBR green incorporation method. The primers used for Vilches were used to amplify the genes *KIR2DL2* and *KIR2DL3* (VILCHES et al., 2007).

The PCR mix had a final volume of 25 uL containing 12.5 uL of 2X SYBR Green PCR Master Mix, 0.5 uL of each primer at a concentration of 10 uM, 2.5 uL of the DNA sample and 9 uL of RNase-free water. The cycling consisted of an initial denaturation step at 95 ° C for 10 minutes, followed by 45 cycles with a step of 94 ° C for 20 seconds and another step at 60 ° C for 40 seconds. After 45 cycles a melting curve was performed to verify the specificity of amplification **of the reaction. The amplification data** are analyzed using the ABI Prism 7700 Sequence Detector System (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

STATISTICAL ANALYSIS

The frequency of each gene was estimated by direct counting. The Fisher exact test was used to compare proportions of *KIR2DL2* and *KIR2DL3* genes among asymptomatic

groups and HAM/TSP-PS, -PB and -D. The median proviral load of the subgroups of patients with the gene KIR2DL2 and KIR2DL3 in the presence of HLA-C molecules of group 1 were compared using the Mann-Whitney test. A p value <0.05 was considered statistically significant. The SPSS Statistics 17.0 software was used to perform statistical calculations.

RESULTS

Table 1 display the main clinical characteristics of the study population. Overall, female were predominant in all clinical groups, with a frequency around 70%. The median age of ASS group (49 years) was statistically lower compared to HAM/TSP-Ps and -D groups. HTLV proviral load was statistically higher in the groups with HAM/TSP (Ps, PB and D) compared with ASS group.

Table 1. General characteristics of HTLV-1-infected individuals asymptomatic and with HAM/TSP diagnosis according to Belem criteria (Possible. Probable and Definite)(n=248).

	ASS n=161	HAM/TSP			P value
		Possible n=20	Probable n=24	Definite n=43	
Female n(%)	117(72.6)	14 (70.0)	15 (62.5)	30 (69.7)	0.777 ^a
Age (years)	49 (13 – 90)	61.5 (41 – 78)	54.5 (21 – 87)	57 (35 – 84)	< 0.001 ^b
Proviral load (% of infected cells)	1.1 (0.06 – 4.6)	3.4 (0.7 – 8.2)	8.8 (4.3 – 15.2)	11.6 (6.3 – 19.5)	< 0.001 ^b

Data represents median (range); a= Qui-quadrado; b= Kruskal-Wallis, Dunn post test

The frequencies of KIR2DL2 and 2DL3 in HTLV-1-infected individuals were 84.3% and 96.8%, respectively. Frequencies of KIR2DL2 and 2DL3 were similar between asymptomatic and HAM/TSP subgroups. No statistically significant associations were found between frequencies of KIR2DL2 and 2DL3 genes and the clinical status, when genes were presented alone or in association with HLA-C group 1 alleles ligands (Table 2).

Table 2. Frequencies of KIR2DL2 and 2DL3 genes alone or in association with HLA-C Group 1 alleles (n = 248)

	Total N (%)	ASS N (%)	HAM/TSP		
			PS N (%)	PB N (%)	D N (%)
2DL2	209 (84.3)	134 (83.2)	15 (75.0)	22 (91.7)	38 (88.4)
2DL3	240 (96.8)	157 (97.5)	20 (100.0)	22 (91.7)	41 (95.3)
2DL2+2DL3	202 (81.4)	131 (81.4)	15 (75.0)	20 (83.3)	36 (83.7)
2DL2+HLA-C1	156 (62.9)	103 (64.0)	12 (60.0)	16 (66.7)	25 (58.1)
2DL3+HLA-C1	181 (73.0)	119 (73.9)	16 (80.0)	17 (70.8)	29 (67.4)

ASS: Asymptomatic, PS: Possible, PB: Probable, D: Definite.

HLA-C group-1 alleles: Cw01, Cw03, Cw07, Cw08, Cw12, Cw13, Cw14 and Cw16.

Regarding the association between of KIR genes and proviral load (Table 3), a significant lower proviral load was found in HAM/TSP-Ps individuals with gene KIR2DL2 compared with patients without this gene.

Table 3. HTLV-1 proviral load HTLV-1-infected groups according the presence of KIR2DL2, and 2DL3 genes

	HAM/TSP				
	Total	ASS	PS	PB	D
2DL2	(n=248)	(n=161)	(n=20)	(n=24)	(n=43)
+	2.6 (0.2 – 10.0)	1.1 (0.08 – 3.7)	2.8* (0.3 – 4.3)	8.6 (4.2 – 12.7)	12.8 (6.2 – 20.3)
-	5.7 (0.1 – 11.0)	0.3 (0 – 6.7)	19.2* (8.6 – 30.0)	21.8 (20.9 – 22.7)	8.2 (7.4 – 11.6)
2DL3					
+	2.9 (0.2 – 10.2)	1.1 (0.06 – 4.8)	3.4 (0.7 – 8.2)	9.7 (4.4 – 15.8)	11.1 (6.2 – 19.5)
-	3.6 (0.2 – 8.9)	0.2 (0.07 – 1.9)	-	4.7 (3.5 – 5.9)	15.7 (11.8 – 19.5)
2DL2 e 2DL3					
+	2.5 (0.2 – 10.0)	1.1 (0.09 – 3.7)	2.8* (0.3 – 4.3)	8.8 (4.3 – 13.7)	12.4 (5.8 – 20.3)
-	5.6 (0.1 – 11.6)	0.2 (0 – 5.7)	19.2* (8.6 – 30.0)	13.3 (4.7 – 21.8)	11.6 (7.8 – 13.0)

Data on Proviral loads represent % of infected cells

ASS: Asymptomatic, PS: Possible, PB: Probable, D: Definite.

Mann-Whitney *p=0.001

HTLV-1-infected individuals who had gene KIR2DL2 in association with any of HLA-C alleles of group 1 had a significantly lower proviral load (2.1% of infected cells) when compared to individuals with only gene KIR2DL2 (5.0% infected cells) ($p = 0.013$) (Table 4). No statistically significant differences in proviral load was observed when the groups were stratified according to the clinical status.

Table 4. Effect of the association between KIR2DL2 and KIR2DL3 genes and HLA-C alleles group 1 on HTLV-1 proviral load.

	Total	ASS	HAM/TSP		
			Ps	Pb	D
2DL2 +	<i>(n=209)</i>	<i>(n=134)</i>	<i>(n=15)</i>	<i>(n=22)</i>	<i>(n=38)</i>
HLA-C1 +	2.1* (0.1 – 8.0)	0.7 (0.07 – 3.3)	2.9 (0.1 – 4.3)	7.9 (3.8 – 13.6)	11.0 (4.6 – 19.5)
HLA-C1 -	5.0* (0.9 – 13.7)	2.2 (0.2 – 7.9)	1.2 (1.1 – 2.4)	8.8 (5.9 – 12.7)	16.7 (8.5 – 20.3)
2DL2 +					
HLA-Cw07 +	2.2 (0.07 – 6.2)	0.2** (0 – 3.3)	1.8 (0.2 – 3.8)	4.2† (3.5 – 11.6)	12.3 (6.2 – 23.2)
HLA-Cw07 -	2.6 (0.3 – 11.0)	1.4** (0.2 – 4.7)	2.8 (0.5 – 3.9)	8.9† (7.3 – 15.7)	12.7 (6.9 – 19.3)
2DL3 +	<i>(n=240)</i>	<i>(n=157)</i>	<i>(n=20)</i>	<i>(n=22)</i>	<i>(n=41)</i>
HLA-C1 +	2.5 (0.1 – 9.8)	0.9 (0.05 – 4.1)	3.6 (0.3 – 11.9)	10.6 (4.2 – 20.9)	11.0 (6.2 – 19.0)
HLA-C1 -	4.5 (0.6 – 11.0)	2.1 (0.1 – 7.7)	2.4 (1.1 – 5.7)	8.9 (8.6 – 12.7)	15.1 (6.9 – 20.9)

Data on Proviral loads represent % of infected peripheral blood mononuclear cells

ASS: Asymptomatic. PS: Possible. PB: Probable. D: Definite.

HLA-C grupo-1: C*01. C*03. C*07. C*08. C*12. C*13. C*14 e C*16

Mann-Whitney *p=0.012; **p=0.03; †p=0.051

Both ASS carriers and HAM/TSP-Pb patients who expressed the gene KIR2DL2 in association with HLA-Cw07 allele had lower proviral load compared to individuals with KIR2DL2 gene isolated. Regarding KIR2DL3 genotype, similar proviral load was found whether the genotype was or not associated with evaluated HLA class I alleles.

DISCUSSION

The present study demonstrated for the first protective association between the presence of KIR2DL2 gene and some of HLA-C of group 1 alleles: lower proviral load of HTLV-1 was observed in patients who had this combination.. Moreover, reduction of proviral load was also observed in the group of asymptomatic individuals who had KIR2DL2 gene and

the HLA-C*07 allele. Individuals with HAM / TSP likely also had this combination had lower proviral load, but the difference was at the limit of statistical significance ($p = 0.051$).

The frequency of KIR2DL2 gene is highly heterogeneous in Brazil. It has been reported frequency of 75% in a population of Belém (PEDROZA et al., 2011), while in a study in Rondônia were observed frequency of 26.1% for KIR2DL2 (SINGLE et al., 2007). This difference illustrates the great genetic diversity present in the Brazilian population, due to the heterogeneous colonization and continued migration of the population. Regarding the KIR2DL3 gene, its worldwide distribution is more homogeneous and similar frequency to that found in this study have been reported in Rondônia (97.8%) and Amazon (93.8%) (SINGLE et al., 2007).

To check whether the observed association between KIR2DL2 and HLA-C genotypes in group 1 and the proviral load was only due to the effect of HLA-C * 07, the analysis was repeated excluding individuals with HLA-C * 07. Surprisingly, the same effect was observed carriers KIR2DL2 gene and any of the HLA-C allele 1 group had a lower proviral load carriers only KIR2DL2 ($p = 0.048$).

An interesting finding in this study was that the reduction of proviral load, in the association of the presence of KIR2DL2 gene and HLA-C*07 allele, was observed in asymptomatic individuals diagnosed with HAM/TSP-PB. Asymptomatic individuals are those who do not have the diseases associated with HTLV-1, although they may present rheumatologic, neurological disorders such as paresthesia, erectile dysfunction among others (CASKEY et al., 2007). The patients with HAM/TSP-PB are patients with monosymptomatic form of myelopathy, for example, a positive Babinsky signal or overactive bladder (DE CASTRO-COSTA et al., 2006). One may speculate that the association between KIR2DL2 receptors and their ligands (HLA class I alleles in group C), has a protective effect reducing the proviral load and protecting against the development of associated diseases. Individuals with HAM / TSP have higher proviral load compared to asymptomatic individuals (NAGAI et al., 1998). A cutoff of 5% infected cells was described as the best proviral load value to distinguish healthy individuals from patients with HAM/TSP (GRASSI et al., 2011). However, the cross-sectional design of this study does not evaluate this inference. Prospective studies should be conducted with the greatest number of individuals to assess the association between KIR2DL2 and its receptors is a protective factor for the development of associated disease.

Associations between KIR and HLA genes may influence the outcome of viral infections. In general, genotypes that predispose theoretically less inhibition, increased

activation may be beneficial against viral infections, whereas activation genotypes represent a risk for autoimmune diseases and malignancies that are associated with local inflammation, such as cervical cancer (BASHIROVA et al., 2006). In HIV infection, individuals who have combination of genotypes KIR3DS1 and HLA-B Bw4-80I had slower progression to AIDS, viral load and protection against opportunistic infections (MARTIN et al., 2002; QI et al., 2006). In accordance with the supposed protective effect of an activation KIR genotype in viral infections, KIR3DS1 gene in combination with HLA-alleles Bw4 demonstrated protective effect associated with the resolution of infection by hepatitis C virus (HCV) (KHAKOO et al., 2004).

Interestingly, studies have also demonstrated protective associations between KIR genes and their ligands in inhibiting viral infections. A study in the same cohort in which was demonstrated the association between HLA-KIR3DS1 and Bw4 showed that the KIR3DL1 allotypes which have a high expression, KIR3DL1**h*, together with its HLA-Bw4-80I ligands were associated with a lower load viral and slower progression to AIDS compared to individuals who had other genotypes KIR3DL1/HLA-B (MARTIN et al., 2007). The KIR2DL3 and HLA-C group 1 genes in homozygous also had a protective effect, being associated with resolution of HCV infection (KHAKOO et al., 2004). Basatena and colleagues found that the KIR2DL2 gene reinforced the effect of HLA genes in HTLV-1 and HCV. In individuals infected with HTLV-1, the presence of KIR2DL2 gene reinforced both the protective effect of HLA-C*08 as the detrimental effect of the HLA-B*54. Unlike our study, this work Basatena not observed association between the gene KIR2DL2 and HLA-C alleles in group 1 in general, the association was detected only with the HLA-C*08. In addition, the HLA-C subtype *08 more frequent in this study was in the Japanese population HLA-C*0801, which very weakly binds KIR2DL2. Because of this, among other factors, the authors propose that the observed effect is due to the KIR2DL2 gene expression in CD8⁺ T cells and not in NK cells. Our results demonstrate the association of KIR2DL2 genes with their HLA-C ligands of group 1, and so supports the possible effect of NK cells in controlling the proviral load.

Although the protective association between a KIR inhibitory receptor and its ligand in the context of a viral infection, it appears controversial, these data can be justified by the hierarchy of the force of interaction between the KIR2DL receptors and their HLA-C ligands, in which interaction between KIR2DL1-HLA-C group 2 is the strongest, whereas KIR2DL3-HLA-C group 1 is the weakest interaction (MAENAKA et al., 1999; VALES-GOMEZ; REYBURN; STROMINGER, 2000; WINTER et al., 1998). This could in part explain the

observed reduction of proviral load in individuals with KIR2DL2+HLA-C group 1 genes . This interaction can trigger weaker inhibition signal in relation to KIR2DL1 + HLA-C group 2 allowing the state inhibition of NK cell can be easily overcome by activation stimuli, thereby facilitating the destruction of infected cells. Another way by which inhibition of KIR receptors may contribute to the antiviral immunity is by KIR2DL2 expression on CD8 + T cells. The expression of KIR on a subset of CD8 + T cells with effector memory phenotype has been demonstrated in chronic infections such as HIV-1, HCV and EBV (ALTER et al., 2008; BONORINO et al., 2007; POON et al., 2005). Furthermore, this expression of KIR CD8 + T cells was associated with high levels of anti-apoptotic molecule Bcl-2 and low levels of cell death (YOUNG et al., 2001). Thus, KIR2DL2 expression in CD8 + T cells could contribute to reducing the death of these cells and contribute to the control of proviral load. NK cells also act in activated T cell destruction and the KIR2DL2 expression on NK cells may contribute to less destruction of T cells and promote infection control (SODERQUEST et al., 2011).

In conclusion, this study demonstrated that the association between the gene KIR2DL2/HLA-C group 1 contributes to the control of proviral load in individuals infected with HTLV-1. This result helps in understanding the mechanisms involved in the control of proviral load of HTLV-1. However, this protective association between KIR2DL2 and HLA-C group 1 genes needs to be confirmed by further studies and functional assays are needed to elucidate the mechanism by which this receptor may contribute to the control of HTLV-1.

REFERENCES

- ALTER, G. et al. Ligand-independent exhaustion of killer immunoglobulin-like receptor-positive CD8+ T cells in human immunodeficiency virus type 1 infection. **J Virol**, v. 82, n. 19, p. 9668-77, Oct 2008.
- BASHIROVA, A. A. et al. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 7, p. 277-300, 2006.
- BONORINO, P. et al. Features and distribution of CD8 T cells with human leukocyte antigen class I-specific receptor expression in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 46, n. 5, p. 1375-86, Nov 2007.
- CASKEY, M. F. et al. Clinical manifestations associated with HTLV type I infection: a cross-sectional study. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, n. 3, p. 365-71, Mar 2007.

COOK, M. et al. Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation. **Blood**, v. 107, n. 3, p. 1230-2, Feb 1 2006.

DE CASTRO-COSTA, C. M. et al. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 22, n. 10, p. 931-5, Oct 2006.

GRASSI, M. F. et al. Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load of HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients according to new diagnostic criteria of HAM/TSP. **J Med Virol**, v. 83, n. 7, p. 1269-74, Jul 2011.

JEFFERY, K. J. et al. The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection. **J Immunol**, v. 165, n. 12, p. 7278-84, Dec 15 2000.

JONCKER, N. T.; RAULET, D. H. Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells. **Immunol Rev**, v. 224, p. 85-97, Aug 2008.

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, Aug 6 2004.

MAENAKA, K. et al. Killer cell immunoglobulin receptors and T cell receptors bind peptide-major histocompatibility complex class I with distinct thermodynamic and kinetic properties. **J Biol Chem**, v. 274, n. 40, p. 28329-34, Oct 1 1999.

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, Aug 2002.

MARTIN, M. P. et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. **Nat Genet**, v. 39, n. 6, p. 733-40, Jun 2007.

MINGARI, M. C.; MORETTA, A.; MORETTA, L. Regulation of KIR expression in human T cells: a safety mechanism that may impair protective T-cell responses. **Immunol Today**, v. 19, n. 4, p. 153-7, Apr 1998.

NAGAI, M. et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. **J Neurovirol**, v. 4, n. 6, p. 586-93, Dec 1998.

PARHAM, P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 3, p. 201-14, Mar 2005.

PEDROZA, L. S. et al. Systemic lupus erythematosus: association with KIR and SLC11A1 polymorphisms, ethnic predisposition and influence in clinical manifestations at onset revealed by ancestry genetic markers in an urban Brazilian population. **Lupus**, v. 20, n. 3, p. 265-73, Mar 2011.

POON, K. et al. Expression of leukocyte immunoglobulin-like receptors and natural killer receptors on virus-specific CD8+ T cells during the evolution of Epstein-Barr virus-specific immune responses in vivo. **Viral Immunol**, v. 18, n. 3, p. 513-22, 2005.

QI, Y. et al. KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 8, p. e79, Aug 2006.

SABOURI, A. H. et al. Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals. **J Gen Virol**, v. 86, n. Pt 3, p. 773-81, Mar 2005.

SEICH AL BASATENA, N. K. et al. KIR2DL2 enhances protective and detrimental HLA class I-mediated immunity in chronic viral infection. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 10, p. e1002270, Oct 2011.

SINGLE, R. M. et al. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. **Nat Genet**, v. 39, n. 9, p. 1114-9, Sep 2007.

SODERQUEST, K. et al. Cutting edge: CD8+ T cell priming in the absence of NK cells leads to enhanced memory responses. **J Immunol**, v. 186, n. 6, p. 3304-8, Mar 15 2011.

TALLEDO, M. et al. Role of killer cell immunoglobulin-like receptor gene content and human leukocyte antigen-C group in susceptibility to human T-lymphotropic virus 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Peru. **Hum Immunol**, v. 71, n. 8, p. 804-8, Aug 2010.

VALES-GOMEZ, M.; REYBURN, H.; STROMINGER, J. Molecular analyses of the interactions between human NK receptors and their HLA ligands. **Hum Immunol**, v. 61, n. 1, p. 28-38, Jan 2000.

VILCHES, C. et al. Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. **Tissue Antigens**, v. 70, n. 5, p. 415-22, Nov 2007.

WINTER, C. C. et al. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. **J Immunol**, v. 161, n. 2, p. 571-7, Jul 15 1998.

YOUNG, N. T. et al. Differential expression of leukocyte receptor complex-encoded Ig-like receptors correlates with the transition from effector to memory CTL. **J Immunol**, v. 166, n. 6, p. 3933-41, Mar 15 2001.