

## PAPEL DO GENE ATIVADOR *KIR2DS2* NA SUSCETIBILIDADE À COVID-19 EM INDIVÍDUOS PARANAENSES

Amanda de Amorim Fernandes Toledo Martins<sup>1</sup> (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Victor Hugo de Souza<sup>2</sup>; Fernanda Pelisson Massi<sup>2</sup>; Jeane Eliete Laguilha Visentainer<sup>3</sup> (Orientadora), e-mail: jelvisentainer@uem.br

<sup>1</sup> Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá;

<sup>2</sup> Programa de pós-graduação em biociências e fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá;

<sup>3</sup> Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá;

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR

**Ciências biológicas – Imunologia (21100004) e Imunogenética (21103003)**

**Palavras-chave:** COVID-19, receptores KIR, reação em cadeia da polimerase.

### Resumo:

A COVID-19 é uma doença ocasionada pela infecção pelo SARS-CoV-2 e que ocasionou a morte de milhões de pessoas. Sabe-se que vários fatores influenciam a gravidade da doença, como a presença de comorbidades, mas também há reconhecida influência dos fatores genéticos dos indivíduos. Por ser uma doença recente, ainda não se conhece exatamente o papel dos fatores genéticos envolvidos. Este estudo comparativo foi realizado com 34 amostras de sangue (*Buffy-coat*), sendo 19 destas obtidas de pacientes com COVID-19 grave e as outras 15 de indivíduos com a forma moderada da doença. Todas foram obtidas de coleta de sangue periférico de pacientes do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná, na cidade de Londrina. A extração do DNA genômico foi realizada pelo kit Biopur®. A genotipagem foi feita por meio da técnica de PCR-SSP e revelada por eletroforese em gel de agarose 2%. A análise estatística foi feita utilizando o programa SNPStats, sendo considerado significativo  $P < 0,05$ . O resultado obtido mostrou que não houve associação significativa do gene *KIR2DS2* com a susceptibilidade à COVID-19, mas é necessário a realização de novos estudos para comprovar estes resultados.

### Introdução

O SARS-CoV-2 foi descoberto em dezembro de 2019, na China, pela investigação de diversos casos de pneumonia com causa desconhecida. O desenvolvimento de um quadro clínico ocasionado por este vírus é chamado de COVID-19, que pode ser assintomática ou sintomática. Um paciente sintomático pode apresentar sintomas respiratórios (como espirros, tosse), problemas gastrointestinais, entre outros.

De acordo com a Johns Hopkins University, até agosto de 2022, foram registrados 584 milhões de casos de COVID-19 no mundo e 6,4 milhões de mortes (<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>). O continente americano foi o segundo continente com maior quantidade de casos, com aproximadamente 157 milhões de casos, correspondendo a 30% dos casos mundiais. O intenso número de casos em um curto período de tempo ocasionou sobrecarga no sistema de saúde em todo mundo e, principalmente aqui no Brasil. O Estado e as instituições de saúde precisaram desenvolver estratégias para suprir a grande demanda dos pacientes necessitando de suporte hospitalar, e dentre estas, foi necessário a locação de leitos privados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), com objetivo de atender os pacientes na lista de espera por um leito público. (MASSUDA; TASCA; MALIK, 2020).

Observou-se que a COVID-19 é influenciada também por fatores genéticos, especialmente aqueles que interferem em algum aspecto da resposta imunológica do hospedeiro. Segundo Plasencia (2020), alterações no gene codificante da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2) pode facilitar a entrada do SARS-CoV-2 na célula do hospedeiro e, além disso, a ECA-2 está presente no trato gastrointestinal e no epitélio pulmonar (GUIHOT et al., 2020).

A resposta imune pode ser dividida em duas etapas: a humoral e celular. A resposta humoral envolve a liberação de anticorpos produzidos pelos linfócitos B, a celular compreende a resposta mediada por linfócitos T. No entanto, algumas variantes do SARS-CoV-2 possuem estruturas chamadas de *open Reading frames* (ORFs), como a proteína Orf6, que inibem a resposta humoral. As células *natural killer* (NK) são responsáveis pela detecção e destruição das células infectadas por vírus (HONG et al., 2011). Segundo Guilhot et al. (2020), pacientes com a COVID-19 possuem números reduzidos de células NK, o que pode ser justificado pela quantidade de receptores ativadores e inibidores expressos na superfície desta célula. No grupo dos inibidores, um que se destaca é o KIR2DS2, que em estudos preliminares apresentou efeito protetor no agravo da COVID-19, ou seja, a frequência deste KIR está relacionada com alterações na resposta imune da COVID-19 (LITTERA et al., 2021)

Este estudo teve como objetivo avaliar a influência do gene ativador *KIR2DS2* na imunopatogênese da COVID-19 em uma população do Paraná, Brasil.

## Materiais e Métodos

Para este estudo foram selecionadas 34 amostras de pacientes com quadros de COVID-19 classificadas como moderadas ou graves, conforme classificação da OMS, fornecidas pelo Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná, em Londrina, no estado do Paraná. Os pacientes foram separados em casos e controles, sendo os casos aqueles com sintomas graves (UTI) e os controles aqueles pacientes com sintomas moderados (enfermaria). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos e está sob: CAAE 38095420.5.0000.0104, nº 4.357.896 e 4.508.676.

As amostras foram coletadas por punção de sangue venoso, em tubo contendo EDTA, passaram pelo processo de centrifugação para seleção do *Buffy-coat* e foram armazenadas em *freezer* a -20°C. A extração do DNA genômico foi realizada a partir do *Buffy-coat*, utilizando o kit de extração para DNA sanguíneo

Biopur®, seguindo as instruções do fabricante. Após extraído, a pureza e concentração do DNA foram determinadas pelo NanoDrop® UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher; Wilmington, DE, USA), com a leitura de densidade óptica no comprimento de onda de 260 nm e 280 nm. A concentração utilizada estava no intervalo entre 10 e 25 ng/μL e as amostras que possuíam concentração superior à determinada foram diluídas. Posteriormente, todas foram armazenadas em freezer a -20°C.

A genotipagem foi feita pela reação em cadeia da polimerase com uma sequência específica de primers (PCR-SSP), de acordo com Zhuang et al. (2012) e as alterações estão descritas neste texto. O procedimento constituiu-se da preparação de um mix de reação com volume final de 20 μL. Foi utilizado os seguintes reagentes e suas concentrações finais: MgCl<sub>2</sub> 50 mM, PCR buffer 10x, dNTPs 10 mM, primers *forward* e *reverse* 10 mM, primer HGH 10 mM (controle interno de reação), Taq polimerase Invitrogen 5U/μL (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY). Depois foi realizada a amplificação em um termociclador (Veriti 96-Well Thermal Cycler), com 35 ciclos sendo: 3 minutos a 94°C, 30s em 94°C, um ciclo de 30s em 60°C, e depois outro de 1 min e 30s em 72°C, finalizando 5 minutos a 94°C.

O resultado da amplificação foi analisado em gel de agarose à 2%, junto com um marcador de peso molecular de tamanho de 100 pares de base. O gel foi colocado em eletroforese por 10 minutos, nas configurações de 150V, 300 mA, 150W, sendo analisado e fotografado depois em um transiluminador (Quantum ST4 transilluminator).

Para a análise estatística, foram feitos testes pareamento de covariáveis (idade, sexo, contagem dos alelos), feitas pelo teste t de Student e pelo teste do qui-quadrado, ambos realizados através do OpenEpi (disponível em: <http://www.openepi.com>). Teve-se o valor de  $P < 0,05$  como significância estatística

## Resultados e Discussão

A amostragem contou com 34 indivíduos: 15 com quadro clínico moderado e 19 com quadro grave. Analisando a covariável idade, tem-se que a média dos casos é de 66,7 anos e em controles é de 59,3 anos. Estatisticamente, não há diferença significativa entre os grupos, ou seja, uma maior média de idade não está relacionada com o desenvolvimento da doença grave ( $P = 0,2573$ ). Isso pode ser explicado pelo baixo número de indivíduos para formar uma amostra meramente representativa para a população, visto que em outros estudos o resultado obtido foi que a idade interfere sim na gravidade da COVID-19 (MØLHAVE; AGERGAARD; WEJSE, 2022).

O desfecho dos indivíduos teve diferença significativa ( $P = 0,0013$ ), ou seja, a gravidade do quadro clínico do paciente interferiu no resultado do tratamento, sendo com alta hospitalar ou morte, e 52,7% dos pacientes com COVID-19 grave foram a óbito. Sendo assim, os indivíduos que apresentam o quadro grave da COVID-19 têm mais chance de morrer do que os que apresentam apenas o moderado.

Já algumas características individuais como doenças cardiovasculares ( $P = 0,7903$ ), diabetes ( $P = 0,2180$ ), etnia ( $P = 0,7436$ ), uso de cigarros ( $P = 0,4361$ ), índice radiológico pulmonar ( $P = >0,9999$ ) e a saturação de oxigênio ( $P = 0,6030$ )

não foram associadas com a intensidade da doença neste estudo. Ainda, o gene *KIR2DS2* não foi significativo para o estado clínico do paciente.

A maioria dos sintomas não teve associação estatisticamente significativa com a gravidade da doença, apenas náuseas e vômitos ( $P = 0,0024$ ) e SARS ( $P = 0,0005$ ). Os pacientes com COVID-19 moderada apresentaram mais náuseas e vômitos do que os indivíduos com estado clínico grave.

### Conclusões

O gene ativador *KIR2DS2* não foi associado ao agravamento dos casos de COVID-19 nesse estudo na população paranaense. Novos estudos precisam ser realizados em cima deste assunto e com um número maior de pacientes.

### Agradecimentos

Primeiramente agradeço à minha família pelo suporte, confiança e carinho. Agradeço também ao Laboratório de Imunogenética da UEM, especialmente ao Victor Hugo de Souza, pela paciência e apoio. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária pela bolsa concedida.

### Referências

- GUIHOT, A. et al. Cell-Mediated Immune Responses to COVID-19 Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 3 jul. 2020.
- HONG, H. A. et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping and HLA killer-cell immunoglobulin-like receptor-ligand identification by real-time polymerase chain reaction. **Tissue Antigens**, v. 78, n. 3, p. 185–194, set. 2011.
- LITTERA, R. et al. Natural killer-cell immunoglobulin-like receptors trigger differences in immune response to SARS-CoV-2 infection. **PLOS ONE**, v. 16, n. 8, p. e0255608, 1 ago. 2021.
- MASSUDA, A.; TASCA, R.; MALIK, A. M. Uso de leitos hospitalares privados por sistemas públicos de saúde na resposta à Covid-19. **Saúde debate**, v. 44, p. 248–260, 2020.
- MØLHAVE, M.; AGERGAARD, J.; WEJSE, C. **Clinical Management of COVID-19 Patients – An Update. Seminars in Nuclear Medicine** W.B. Saunders, , 1 jan. 2022.
- PLASENCIA-URIZARRI, T. M.; AGUILERA-RODRÍGUEZ, R.; ALMAGUER-MEDEROS, L. E. **Comorbilidades y gravedad clínica de la COVID-19: revisión sistemática y meta-análisis Comorbidities and clinical severity of COVID-19: systematic review and meta-analysis**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/3389>>.
- ZHUANG, Y. L. et al. Association of *KIR2DS4* and its variant *KIR1D* with syphilis in a Chinese Han population. **International Journal of Immunogenetics**, v. 39, n. 2, p. 114–118, abr. 2012.