

## PAPEL DO GENE ATIVADOR *KIR3DS1* NA COVID-19 EM INDIVÍDUOS PARANAENSES

Matheus Yugo Inoue (PIBIC/FA/UEM), Victor Hugo de Souza (Coorientador), Fernanda Pelisson massi, Quirino Alves de Lima Neto, Andrea Name Colado Simão, Jeane Eliete Laguila Visentainer (Orientador). E-mail: ra122229@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Análises Clínicas / Maringá, PR.

**Área e subárea do conhecimento: Imunologia e Imunogenética**

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

### RESUMO

A COVID-19 foi responsável por uma pandemia que causou grande prejuízo no mundo todo. A gravidade dessa doença tem uma relação com características particulares do hospedeiro, como, por exemplo, componentes de sua genética que terão influência em sua resposta imunológica. Dentre os componentes da resposta imune, as células assassinas naturais (NK) têm importante atuação antiviral, influenciando diretamente no desfecho da COVID-19. As células NK atuam conforme a sua interação com a célula-alvo, principalmente, pela ação de uma família de receptores conhecidos como *killer immunoglobulin-like receptor* (KIR), que podem ativar ou inibir a ação dessas células. Os genes destes receptores são polimórficos e herdados em blocos ou haplótipos. Portanto, esse estudo teve como objetivo avaliar a influência da presença do gene *KIR3DS1* na patogênese da COVID-19. Para isso, foi feito um estudo tipo caso-controle com indivíduos provenientes das regiões norte/noroeste do Paraná, Brasil. As amostras foram coletadas de sangue venoso dos pacientes e as extrações de DNA feitas por kit de extração. A tipificação do gene *KIR3DS1* foi realizada utilizando a metodologia PCR-SSP. As frequências do gene entre grupos foram comparadas via teste de regressão logística no software R versão 4.2.0, e as covariáveis foram avaliadas por teste de qui-quadrado com correção de Yates ou teste exato de Fisher, e teste t de Student, considerando  $P < 0,05$  como significativo para todos os testes. Nesta população, observamos que o gene ativador *KIR3DS1* não apresentou associação na imunopatogênese da COVID-19.

### INTRODUÇÃO

A doença causada pelo coronavírus (COVID-19) é caracterizada como uma síndrome respiratória aguda causada pelo vírus SARS-CoV-2 e esse vírus estabeleceu uma pandemia global, causando milhões de óbitos e causou prejuízo no mundo. De acordo com a Universidade John Hopkins, referência na divulgação de dados sobre a COVID-19, até abril de 2022 mais de 490 milhões de casos da

doença foram confirmados, com mais de 6,1 milhões de mortes no mundo (<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>). Os indivíduos afetados apresentavam desde sintomas mais brandos, até sintomas mais severos. Alguns parâmetros do hospedeiro como idade, sexo, presença de outras doenças, e doenças de bases como diabetes e doenças cardiovasculares, aparentam ser fatores de risco importantes que determinavam o seu desfecho.<sup>1</sup>

A resposta imune à infecção pelo SARS-CoV-2 é iniciada pela imunidade inata, como primeira tentativa de conter o vírus, seguida pela resposta imune adaptativa que é específica e que contribui para a diminuição da carga viral por meio da resposta de linfócitos T citotóxicos e pela liberação de anticorpos. Um dos componentes cruciais da resposta imune inata é a célula NK, que embora possua especificidade limitada, é essencial na morte de células infectadas e produção de interferon (IFN)- $\gamma$ .<sup>2</sup> A ação dessa célula é modificada pela interação com seus receptores, sendo os principais os receptores *immunoglobulin-like receptor* (KIR), que podem ser classificados de acordo com seus efeitos ativadores ou inibidores sobre essas células.<sup>3; 4</sup> O KIR3DS1, por exemplo, é um receptor ativador que foi associado a proteção à COVID-19 em um estudo em espanhóis.<sup>5</sup> Devido à variabilidade na resposta de células NK dada por KIR, é esperado que a variabilidade genética de seus genes possa ajudar a explicar a complexidade da resposta imune observada na COVID-19.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O modelo de estudo foi um estudo caso-controle, no qual selecionamos 91 pacientes atendidos em hospitais nas cidades de Maringá e Londrina, nas regiões norte/noroeste do Paraná, Brasil. O grupo de casos foi constituído pelos pacientes com sintomas moderados e graves de COVID-19, os quais estavam com internação hospitalar. Enquanto o grupo de controles foi constituído pelos pacientes com sintomas leves e assintomáticos, sem necessidade de internação hospitalar. As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas por punção de sangue venoso, em tubo contendo EDTA, o qual foi armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A extração de DNA das amostras foi feita por kit de extração para DNA sanguíneo QIAamp® (Qiagen, Valencia, CA), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. A qualidade e a concentração do DNA extraído foram analisadas por densidade óptica em um aparelho Thermo Scientific Nanodrop 2000 (Wilmington, EUA) com leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 260 nm e 280 nm. Após a extração e análise do DNA, amostras foram tipificadas para determinar a presença do gene *KIR3DS1* pela metodologia PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primer*), empregando-se primers específicos para alelos dessa sequência.

O DNA da amostra foi amplificado no termociclador (Veriti 96-Well Thermal Cycler) e visualizado após a eletroforese no gel de agarose à 2% para observar as bandas com seus respectivos pesos moleculares, utilizando um marcador de peso molecular 100 pares de bases (DNA Ladder, Thermo Fisher; Vilnius, Lithuania), como mais um controle para o tamanho das bandas. Posteriormente, foi analisado e fotografado no Quantum ST4 transilluminator (Vilber Lourmat; Collegien, France).

As frequências do gene entre grupos foram comparadas via teste de regressão logística no software R versão 4.2.0, considerando  $P < 0,05$  como significativo. Para verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as frequências de cada grupo das amostras de pacientes e controles e para comparar variáveis categóricas foram realizados o teste de qui-quadrado com correção de Yates ou teste exato de Fisher bicaudal, utilizando-se a tabela de contingência 2x2, com intervalo de confiança (IC) de 95%. A estimativa de risco foi feita pelo cálculo do *Odds Ratio* (OR), utilizando o programa *OpenEpi* versão 3.03a (<http://www.openepi.com/TwobyTwo/TwobyTwo.htm>). Para todos os testes foi considerado significativo o valor de  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo teve 91 participantes para analisar a associação entre a presença e ausência do gene *KIR3DS1* e o agravamento do quadro de COVID-19, sendo 61 participantes do grupo de pessoas com sintomas grave e moderado de COVID-19 e 30 participantes do grupo de pessoas com sintomas leve. Foi feita uma tabela descritiva com o perfil dos pacientes através dos dados obtidos do programa *OpenEpi* e software R.

O gene pesquisado por este estudo, *KIR3DS1*, não demonstrou diferença na frequência entre os grupos. Este receptor presente na superfície das células NK atua ativando ações de *killing* delas, sendo assim, possui uma associação protetora contra as infecções virais que já foi demonstrada em outros estudos. Essa discordância pode ter ocorrido por conta do baixo número de indivíduos em nosso estudo, o que significa um baixo poder estatístico de análise. Além disso, os receptores *KIR3DS1* realizam seu efeito ativador somente quando juntos de seu ligantes, sendo essencial a avaliação de *KIR* em conjunto com seu ligante *HLA* para avaliar se, teoricamente, a célula NK efetuará sua ação antiviral.

Na Tabela 1, analisando-se as covariáveis tabagismo e obesidade, observou-se uma não associação entre os grupos, com o valor de  $P > 0,05$ , não sendo condizente com as pesquisas feitas atualmente. No entanto, tabagismo e obesidade são fatores de risco nos quadros de COVID-19. Isso pode ser explicado pelo baixo número de indivíduos para formar uma amostra meramente representativa para a população.

Enquanto as outras covariáveis, como diabetes e doença cardiovascular, foram visualizadas as associações significativas entre os grupos, mostrando como fatores de risco para COVID-19, portando reforçando as pesquisas que existem atualmente. As pesquisas mostram que a glicoproteína *Spike* encontrada na superfície do coronavírus SARS-CoV-2 interage com o receptor ACE2 (enzima conversora de angiotensina 2), desempenhando papel importante para a entrada do vírus na célula. E este receptor atua na regulação da pressão arterial, sendo assim essa interação da glicoproteína com o receptor pode causar implicação na regulação do sistema cardiovascular.

Características	COVID-19 GRAVE E MODERADO (n=61)	COVID-19 LEVE (n=30)	Total (n = 91)	P
-----------------	----------------------------------	----------------------	----------------	---

<b>Sexo</b>	Masculino	15 (50%)	15 (50%)	45 (49,5%)	0,941
	Feminino	15 (50%)	15 (50%)	46 (50,5%)	
<b>Idade</b>	Média	56 anos	51 anos	58 anos	0,104
	Desvio padrão	±17,382	±12,946	±14,482	
<b>UTI</b>	Sim	12 (19,7%)	0 (0%)	12 (13,2%)	<b>0,015</b>
	Não	49 (79,3%)	30 (100%)	79 (86,8%)	
<b>Intubação</b>	Sim	8 (13,1%)	0 (0%)	8 (8,8%)	0,044
	Não	53 (86,9%)	30 (100%)	83 (91,2%)	
<b>Desfecho</b>	Sobrevivência	48 (78,7%)	30 (100%)	78 (85,7%)	<b>0,01</b>
	Morte	13 (21,3%)	0 (0%)	13 (14,3%)	
<b>Tabagismo</b>	Sim	10 (16,4%)	2 (6,7%)	12 (13,2%)	0,198
	Não	51 (83,6%)	28 (93,3%)	79 (86,8%)	
<b>CVD (Doença Cardiovascular)</b>	Sim	36 (59%)	7 (23,3%)	43 (47,3%)	<b>0,001</b>
	Não	25 (41%)	23 (76,7%)	48 (42,7%)	
<b>Diabetes</b>	Sim	19 (31,1%)	3 (10%)	22 (24,2%)	0,027
	Não	42 (68,9%)	27 (90%)	69 (75,8%)	
<b>Obesidade</b>	Sim	19 (31,1%)	12 (40%)	31 (34,1%)	0,402
	Não	42 (68,9%)	18 (60%)	60 (65,9%)	
<b>KIR3DS1*</b>	Sim	18 (29,5%)	15 (50%)	33 (36,3%)	0,3
	Não	43 (70,5%)	15 (50%)	58 (63,7%)	

**Tabela 1** - perfil dos pacientes analisados.

## CONCLUSÕES

Nesse estudo, observamos que o gene ativador *KIR3DS1* não apresentou associação com a imunopatogênese da COVID-19. No entanto, dada a quantidade de amostras, é recomendado um estudo com um número maior de participantes, para confirmar esses resultados.

## AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Imunogenética da Universidade estadual de Maringá (LIG-UEM) e às agências de fomento CNPq-FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA-UEM.

## REFERÊNCIAS

- 1 BRODIN, P. Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity. **Nature Medicine**, v. 27, n. 1, p. 28-33, 2021/01/01 2021. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01202-8> >.
- 2 HAJEER, A. et al. Association of KIR gene polymorphisms with COVID-19 disease. **Clinical Immunology**, v. 234, p. 108911, 2022/01/01/ 2022. ISSN 1521-6616. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521661621002485> >.
- 3 PAIRO-CASTINEIRA, E. et al. Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. **Nature**, v. 591, n. 7848, p. 92-98, 2021/03/01 2021. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03065-y> >.
- 4 VILCHES, C.; PARHAM, P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 217-51, 2002. ISSN 0732-0582 (Print) 0732-0582.

- 5 BERNAL, E. et al. Activating Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptors Are Associated With the Severity of Coronavirus Disease 2019. **The Journal of infectious diseases**, v. 224, n. 2, p. 229-240, 2021. ISSN 1537-6613 0022-1899. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33928374> >. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8135764/> >.