

AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO E DA FREQUÊNCIA DOS GENES *KIR* EM CONTROLES E PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE

Giovana de Rossi Palma (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Leticia Cristina de Almeida Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Victor Hugo de Souza (Pesquisador), Aléia Harumi Uchibaba Yamanaka (Coorientadora), Quirino Alves de Lima Neto (Orientador) E-mail: qalneto@uem.br.

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

Ciências biológicas / Imunologia

Palavras-chave: doenças autoimunes; espondilite anquilosante; receptores KIR.

RESUMO

A espondilite anquilosante (EA) é uma doença que acomete as grandes articulações, especialmente os membros inferiores, articulações sacroilíacas e coluna vertebral. Os receptores KIR, presentes nas células *natural killer* (NK), ligam moléculas HLA (antígeno leucocitário humano) para reconhecimento da célula alvo. Ainda assim, pouco se sabe sobre a relação entre a EA com os receptores KIR. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição e as frequências alélicas e genótípicas dos genes *KIR* em pacientes com EA e controles sem a doença, residentes do estado do Paraná. O estudo caso-controle foi realizado utilizando a técnica de PCR-SSP (reação em cadeia da polimerase com iniciadores sequência-específicos) e analisando os produtos da amplificação por meio de eletroforese em gel de agarose. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa R versão 4.2.0. O gene *KIR2DS4* apresentou alta frequência em ambos os grupos. Não foram evidenciadas diferenças significativas na distribuição das frequências dos genes *KIR2DL2*, *KIR2DS1*, *KIR2DS4* e *KIR3DS1* entre pacientes com EA e controles, sendo necessário novos estudos para melhor entendimento da doença e sua associação com os receptores KIR.

INTRODUÇÃO

As espondiloartrites abrangem diversas doenças caracterizadas por causar inflamação reumática, entre elas encontra-se a espondilite anquilosante (EA), condição que afeta especialmente as articulações sacroilíacas e coluna vertebral levando ao comprometimento estrutural ou funcional das articulações afetadas (Garg, 2014).

As células *natural killer* (NK), cumprem uma função essencial no sistema imunológico. A ativação e inibição das células NK é regulada pelos receptores KIR (receptores similares a imunoglobulinas), os quais podem apresentar cauda citoplasmática curta (S) ou longa (L), com dois ou três domínios (2D ou 3D), que

ligam ao HLA (antígeno leucocitário humano) reconhecendo a célula-alvo (Carrillo-Bustamante, 2006; Díaz-Peña, 2009; Trowsdale, 2001).

Os genes dos receptores *KIR* são expressos pelo complexo LRC (complexo de receptores leucocitários) no cromossomo 19q13.4. Até o presente momento, 17 genes *KIR* foram identificados em humanos, sendo seis receptores ativadores: *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1*, nove receptores inibidores: *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* e *KIR3DL3*, e dois pseudogenes *KIR2DP1* e *KIR3DP1* (Trowsdale, 2001).

Assim, o intuito deste estudo foi analisar as distribuições e frequências dos genes *KIR* em pacientes com EA e controles sem a doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo caso-controle foi conduzido com 96 pacientes com EA, sem parentesco, classificados pelos critérios ASAS e residentes do Norte/Nordeste do Paraná. O grupo controle foi estabelecido por 96 indivíduos sem a doença.

O DNA foi extraído pelo BioPur® Kit Extração Mini Spin Plus (Biometrix, Curitiba, Paraná, Brasil), partindo do sangue total, seguindo orientações do fabricante. A concentração e pureza do DNA foram medidas em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm (NanoDrop 2000R, Thermo Scientific).

Os genes *KIR2DL2*, *KIR2DS1*, *KIR2DS4* e *KIR3DS1* foram determinados por PCR-SSP (reação em cadeia da polimerase com iniciadores sequência-específicos), usando *hGH* com controle interno da reação. A sequência dos *primers* estão agrupados na tabela 1.

Tabela 1. Sequência de primers utilizados para a caracterização dos genes *KIR* pelas reações de PCR-SSP.

Genes	Sequência do Primer (5'-3')	Pares de base
<i>KIR2DL2</i>	F: AGGGGGAGGCCCATGAAT	153
	R: CACTCGAGTTTGACCACTCGTAT	
<i>KIR2DS1</i>	F: GTAGGCTCCCTGCAGGGA	148
	R: ACAAGCAGTGGGTCACTTGAC	
<i>KIR2DS4</i>	F: CTGGCCCTCCCAGGTCA	204
	R: TCTGTAGTTTCTGCAAGGACAG	
<i>KIR3DS1</i>	F: TCCATCGTTCCATGATGCG	111
	R: GACCACGATGTCCAGGGGA	
<i>hGH</i>	F: TGCCTTCCAACCATTCCTTA	434
	R: CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC	

F: *primer forward*; R: *primer reverse*

As reações de PCR-SSP foram realizadas sob as seguintes condições: volume final de 20µL, sendo tampão 1X, 1,5µM de MgCl₂ para os genes *KIR2DS1*, *KIR2DS4* e *KIR3DS1* e 1,2µM para o gene *KIR2DL2*, 0,2mM de dNTP, 0,3µM para *primers forward* e *reverse* para *KIR2DL2*, *KIR2DS4* e *KIR3DS1* e 0,4µM para

KIR2DS1, 0,08µM *primers hGH forward* e *reverse*, 1U de *Taq* DNA polimerase e 50ng/µL de DNA. Amostras com genótipos previamente conhecidos foram utilizadas como controles positivo e negativo em cada reação. A metodologia foi validada por PCR-SSOR (Reação em Cadeia da Polimerase utilizando Oligonucleotídeos Sequência-Específicos).

As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, anelamento a 62°C para os *primers* dos genes *KIR2DL2*, *KIR2DS4* e *KIR3DS1* e 58°C para o gene *KIR2DS1* por 30 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos, e extensão final a 94°C por 5 minutos.

As amostras amplificadas passaram por eletroforese em gel de agarose 2% corado com SYBR Safe™ e comparado com marcador de peso molecular de 100pb. As análises estatísticas foram elaboradas em R versão 4.2.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média de idade, em anos, para os pacientes foi de 44,69 ± 13,09, e para o grupo controle foi de 41,80 ± 12,80. Além disso, os grupos de pacientes e controles foram constituídos, respectivamente, 62,50% e 56,25% por indivíduos do sexo feminino. Os indivíduos foram pareados para idade, sexo e etnia ($P > 0,05$) a fim de eliminar estes interferentes.

Os testes para validação da metodologia de caracterização dos genes *KIR*, por meio da PCR-SSOR, demonstraram taxa de congruência de 100% dos resultados.

Conforme disposto na tabela 2, o gene *KIR2DL2* estava presente em 52,08% dos indivíduos do grupo controle e em 50% dos pacientes com EA. O *KIR2DS1* foi observado em 53,12% de indivíduos controles e 46,88% dos pacientes com EA. O *KIR2DS4* expressou alta frequência em ambos os grupos estudados, sendo 93,75% no grupo controle e 97,92% nos pacientes, e o *KIR3DS1* foi observado em 43,75% do grupo controle e 38,54% dos pacientes com EA.

Tabela 2: Distribuição das frequências dos genes *KIR* em pacientes com espondilite anquilosante e controles.

<i>KIR</i>	Pacientes N= 96 n (%)	Controles N= 96 n (%)
<i>KIR2DL2</i>	48 (50)	50 (52,08)
<i>KIR2DS1</i>	45 (46,88)	51 (53,12)
<i>KIR2DS4</i>	94 (97,92)	90 (93,75)
<i>KIR3DS1</i>	37 (38,54)	42 (43,75)

N= número total da população, n = número de indivíduos.

Não houve diferenças estatísticas na distribuição das frequências dos genes *KIR2DL2*, *KIR2DS1*, *KIR2DS4* e *KIR3DS1* entre pacientes e controles. Apesar disso, outros estudos realizados na Espanha mostram que os genes *KIR2DS1* e *KIR3DS1* apresentaram frequência significativamente maior em pacientes (52,8% e 57,7% respectivamente) que em controles (38,2% e 37,5%), sugerindo uma possível associação de risco com a patogênese da EA (Díaz-Peña, 2015). As diferenças dos

resultados podem ser explicadas pela miscigenação da população brasileira. Outro fator a ser considerado é o menor poder estatístico, quando comparado com o estudo espanhol, fatores que podem influenciar nos resultados obtidos.

CONCLUSÕES

Através das análises estatísticas, não foram encontradas diferenças significativas na distribuição das frequências dos genes *KIR2DL2*, *KIR2DS1*, *KIR2DS4* e *KIR3DS1* em pacientes e controles, sugerindo não haver uma associação entre os genes *KIR* com a patogênese da EA. Sendo assim, novos estudos com outros genes podem contribuir para o melhor entendimento da doença e elucidar a associação dos genes com a EA.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Quirino Alves de Lima Neto pela orientação durante este projeto.
À Ma. Aléia Harumi Uchibaba Yamanaka pela coorientação, paciência e solicitude.
Ao Laboratório de Imunogenética (LIG-UEM), por prover desenvolvimento profissional e todos os voluntários do projeto, que contribuíram para seu desenvolvimento.
Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação Araucária e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por fomentar este projeto.

REFERÊNCIAS

CARRILLO-BUSTAMANTE, P.; KEŞMIR, C.; DE BOER, R.J. The evolution of natural killer cell receptors. **Immunogenetics**. v. 68, p. 3-18, setembro de 2016.

DÍAZ-PEÑA, R.; BLANCO-GELAZ, M.A.; LÓPEZ-LARREA, C. KIR genes and their role in spondyloarthropathies. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. V. 649: 286-299, Springer, NY. 2009.

DÍAZ-PEÑA, R.; VIDAL-CASTIÑEIRA, J.R.; MULERO, J.; SÁNCHEZ, A.; QUEIRO, R.; LÓPEZ-LARREA, C. Activating killer immunoglobulin-like receptors genes are associated with increased susceptibility to ankylosing spondylitis. **Clinical and Experimental Immunology**. v. 180, p. 201–206. Maio de 2015.

GARG, N.; VAN DEN BOSCH, F.; DEODHAR, A. The concept of spondyloarthritis: where are we now? **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**. v. 28, p. 663-672, outubro de 2014.

TROWSDALE, J.; BARTEN, R.; HAUDE, A.; STEWART, C.A.; BECK, S.; WILSON, M.J. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. **Immunological Reviews**. v. 181, p. 20-38, janeiro de 2001.

32º Encontro Anual de Iniciação Científica
12º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



23 e 24 de Novembro de 2023