

DETECÇÃO E INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DOS GENES *KIR2DS2* E *KIR2DS4* EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM COVID-19.

Louise Fernanda Rosa Frühauf (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Amanda de Amorim Fernandes Toledo Martins (Co-autor), Fernanda Pelisson Massi, Jeane Eliete Laguila Visentainer, Quirino Alves de Lima Neto, Bruna Karina Banin Hirata (Orientadora). E-mail: ra127492@uem.br.

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências biológicas, Imunologia, Imunogenética.

Palavras-chave: reação em cadeia polimerase; receptores KIR; prognóstico.

RESUMO

A COVID-19 é uma síndrome aguda respiratória desencadeada pela infecção pelo SARS-CoV-2, possui alta taxa de transmissão e se disseminou mundialmente, causando a morte de milhões de pessoas. Ainda são desconhecidos os aspectos intrínsecos à doença que fazem exibir diferentes prognósticos de indivíduo para indivíduo. As Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR), são moléculas presentes na superfície de células natural killer (NK), capazes de regular a liberação de citocinas imunorreguladoras nas antivirais das NK. Este estudo foi realizado com 202 amostras de sangue periférico, sendo 15 destas obtidas de pacientes com COVID-19 leve, 68 de indivíduos com a forma moderada da doença e as outras 118 de pacientes com a forma grave da doença. As amostras moderadas e graves foram obtidas no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná, na cidade de Londrina e as amostras leves foram obtidas no Hospital Paraná de Maringá. A genotipagem de *KIR2DS2* e *KIR2DS4* foi realizada através da técnica de PCR-SSP. Foi realizada análise de correlação entre os genes estudados com os parâmetros clínicos da doença através do teste Tau-b de Kendall. O resultado obtido mostrou que houve associação significativa do gene *KIR2DS2* e a presença de tosse, febre, coriza, dispneia e disgeusia; já no caso do gene *KIR2DS4* a COVID-19 tende a ser mais grave, houve associação significativa com a transferência para a Unidade de Terapia Intensiva (UTI), intubação e dispneia.

INTRODUÇÃO

A COVID-19 foi descoberta em dezembro de 2019, na província de Wuhan, na China, ao investigarem centenas de casos de, até então, pneumonia. A explicação para essa hipótese se dá ao fato de que a COVID-19 é responsável por causar, principalmente, sintomas respiratórios. Para tanto, estudos mostraram influência genética na sintomatologia e resposta imunológica dos pacientes. Como

escreveu Plasencia (2020), as alterações existentes no gene da enzima conversora de angiotensina II podem facilitar a entrada do vírus na célula do hospedeiro, e esse peptídeo está presente no epitélio pulmonar humano.

As células assassinas naturais (do inglês, *Natural Killer* ou NK) são um grupo de células com origem linfóide que desempenham um papel importante na resposta imune inata e podem exercer um papel importante no desfecho da COVID-19. Estas células possuem receptores denominados Receptores de Células Assassinas Naturais (do inglês, *Natural Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors* - KIR) responsáveis pela ativação ou inibição da célula NK por meio da interação com seus ligantes (CARRINGTON; NORMAN, 2003).

Os receptores KIR e seus ligantes HLAs de classe 1 foram associados com a susceptibilidade ou resistência do hospedeiro frente à diversas doenças infecciosas e não-infecciosas (CARRINGTON; NORMAN, 2003).. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar uma possível associação entre a presença dos genes de receptores ativadores *KIR2DS2* e *KIR2DS4* com os parâmetros clínicos da COVID-19.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CAAE 38095420.5.0000.0104, números 4.357.896 e 4.508.676). Para este estudo, foram selecionadas 202 amostras de pacientes com quadros de COVID-19 classificados como leve, moderado ou grave (conforme a classificação da Organização Mundial de Saúde).

As amostras de sangue venoso foram coletadas em tubo contendo EDTA, no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná, de Londrina – PR e Hospital Paraná, de Maringá - PR. Destas amostras foram separados o Buffy-coat que foi armazenado em freezer a -20°C.

A extração do DNA genômico foi realizada com o kit Biopur® (Biometrix Diagnostica, Curitiba, Brazil). A pureza e concentração de DNA foram determinados através do NanoDrop® UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher; Wilmington, DE, USA), utilizando os comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

Para a genotipagem, foi realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase com uma sequência específica de primers (PCR-SSP), de acordo com Zhuang et al. (2012). As condições da PCR foram: $MgCl_2$ 50 mM, buffer 10x, dNTP 10 mM, primer *forward* 10 mM, primer *reverse* 10 mM, primer HGH 10 mM, Taq polymerase Invitrogen™ 5U/ μ L (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY), com um volume final de 20 μ L.

As amostras foram amplificadas em termociclador (Veriti 96-Well Thermal Cycler), e o protocolo de ciclos incluiu: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C, 1,5 minuto a 72°C, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Os resultados das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, juntamente com marcador de peso molecular de 100 pares de base.

Foi realizado o teste Tau-b de Kendall, utilizando o software estatístico SPSS versão 22.0 (SPSS Inc., Chicago, USA), e o nível de significância adotado foi de 5%.
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os pacientes estudados, 92 eram do sexo feminino (45,5%) e 110 do sexo masculino (54,5%), e a média de idade dos pacientes foi de 65,2 anos ($\pm 16,8$ anos). De acordo com os padrões da Organização Mundial de Saúde, 15 pacientes apresentaram quadro clínico leve, 68 quadros clínico moderado e 118 quadro clínico grave.

Nenhum dos dois genes mostraram associações significativas com o desfecho clínico da doença (óbito ou alta hospitalar), ocorrência de aneurismas, histórico de doença cardíaca, presença de dores musculares, fadiga, cefaléia, hiposmia, sintomas gastrointestinais e neurológicos.

Como mostra a Tabela 1, o gene *KIR2DS2* mostrou associações significativas com a presença de todos os sintomas da COVID-19, enquanto o *KIR2DS4* foi associado significativamente apenas à presença de dispneia.

Tabela 1. Análise de correlação entre a presença de *KIR2DS2* e *KIR2DS4* com os parâmetros clínicos de pacientes com COVID-19.

Parâmetro clínico		KIR2DS2 n (%)		KIR2DS4 n (%)	
		Ausência	Presença	Ausência	Presença
Coriza	ausente	61 (93,9%)	70 (86,4%)	12 (100%)	119 (90,2%)
	presente	4 (6,1%)	11 (13,6%)	0 (0,0%)	13 (9,8%)
		$p = 0,010^*$; $\square = 0,191$		$p = 0,169$; $\square = 0,098$	
Febre	ausente	33 (50,8%)	27 (33,3%)	4 (33,3%)	57 (43,2%)
	presente	32 (49,2%)	54 (66,4%)	8 (66,7%)	75 (56,8%)
		$p = 0,003^*$; $\square = 0,220$		$p = 0,770$; $\square = 0,022$	
Tosse	ausente	21 (32,3%)	18 (22,2%)	4 (33,3%)	40 (30,3%)
	presente	44 (67,7%)	63 (77,8%)	8 (66,7%)	92 (69,7%)
		$p = 0,018^*$; $\square = 0,177$		$p = 0,408$; $\square = 0,062$	
Dispneia	ausente	24 (36,9%)	23 (28,4%)	8 (66,7%)	40 (30,3%)
	presente	41 (63,1%)	58 (71,6%)	4 (33,3%)	92 (69,7%)
		$p = 0,033^*$; $\square = 0,159$		$p = 0,023^*$; $\square = 0,162$	
Disgeusia	ausente	59 (90,8%)	70 (86,4%)	10 (83,3%)	115 (87,1%)

	presente	6 (9,2%)	11 (13,6%)	2 (16,7%)	17 (12,9%)
		$p = 0,036^*$; $\chi^2 = 0,157$		$p = 0,565$; $\chi^2 = 0,047$	

* valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

O gene *KIR2DS2* não foi associado com a severidade da COVID-19 ($p = 0,784$). Por outro lado, o gene *KIR2DS4* foi associado ao quadro mais grave da doença. Este resultado está de acordo com o estudo de Bernal et al. (2021). Ao contrário de *KIR2DS2*, o *KIR2DS4* também foi associado à transferência do paciente para Unidade de Terapia Intensiva ($p = 0,004$) e necessidade de intubação traqueal ($p < 0,05$), demonstrando uma associação deste gene com o pior prognóstico da COVID-19.

CONCLUSÕES

O receptor de superfície *KIR2DS2* foi associado significativamente a sintomas clínicos da COVID-19, entre eles tosse, febre, coriza, dispneia e disgeusia. Já o receptor de superfície *KIR2DS4* foi associado ao quadro mais grave da COVID-19, incluindo a transferência para a Unidade de Terapia Intensiva (UTI), a intubação e a dispneia do paciente. Estes resultados indicam que as células NK desempenham um papel importante no prognóstico da COVID-19 e que os receptores KIR são potenciais marcadores da doença.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao CNPq, pela concessão da bolsa, agradeço também ao Laboratório de Imunogenética (LIG-UEM), que permitiu a realização do projeto.

REFERÊNCIAS

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, 30 abr. 2021.

CARRINGTON, M. NORMAN, P. The KIR Gene Cluster [Internet]. Bethesda (MD): **National Center for Biotechnology Information** (US), 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10135/>>.

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.