

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO GENE *KIR2DL3* NO RISCO DE DESENVOLVIMENTO DE ESPONDILITE ANQUILOSANTE

Isadora Laguila Altoé (PIBIC/FA), Matheus Braga (Coorientador), Larissa Danielle Bahls Pinto (Orientador). E-mail: ldbpinto2@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR

Imunologia /Imunogenética

Palavras-chave: Receptores KIR; Espondilartrite; Polimorfismo Genético

RESUMO

A espondilite anquilosante (EA) é uma doença inflamatória crônica e autoimune que afeta principalmente o esqueleto axial. Sua patogênese relaciona-se à desregulação do sistema imune. As células NK desempenham papel crucial no sistema imune inato, expressando receptores de superfície, como receptores *KIR*, que regulam a atividade dessas células. A diversidade genética dos genes *KIR* nos indivíduos pode influenciar respostas imunes distintas e o risco de desenvolvimento de EA, especialmente pela sua ligação com a proteína HLA-B27. Este estudo objetivou aferir se o gene *KIR2DL3* influencia o risco de desenvolvimento de EA. Conduziram-se genotipagens pela reação em cadeia da polimerase com iniciadores específicos de sequência (PCR-SSP), analisando em eletroforese em gel. Não houve associação entre a presença do gene *KIR2DL3* e desenvolvimento de EA, todavia, novos estudos, com maior número de participantes e com análises de variantes alélicas do *KIR2DL3* são necessários.

INTRODUÇÃO

A espondilite anquilosante (EA) é uma doença inflamatória crônica e autoimune que afeta principalmente o esqueleto axial. É fortemente associada ao HLA-B27, encontrado em 80 a 90% da população que possui a doença, evidenciando o caráter genético. A patogênese centra-se na desregulação do sistema imune, com distúrbios no metabolismo ósseo por secreção alterada de citocinas (Braun & Sieper, 2007).

As células Natural Killers (NK) são capazes de lisar células alvo e liberar citocinas que regulam a resposta imune. Estas células, expressam receptores de superfície, incluindo os receptores KIR - Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors. Os receptores KIR regulam as células NK pela presença ou ausência das moléculas

HLA de classe I na superfície celular da célula alvo. Dependendo da expressão, pode-se gerar um sinal inibitório (prevenindo a lise celular) ou de ativação (tornando susceptível à citotoxicidade). Sabe-se que o *KIR2DL3* é um receptor do tipo inibitório, já que apresenta caudas longas (L ou long) (Middleton, 2002).

A diversidade dos genes KIR varia significativamente entre os indivíduos, definindo diferentes haplótipos. Além disso, existe um alto grau de polimorfismo em todos os genes *KIR*. Isso pode implicar em respostas imunes distintas entre os indivíduos, podendo influenciar no desenvolvimento da EA. É reconhecido que os genes *KIR* influenciam a regulação das células NK, desempenhando papel significativo na EA, especialmente em relação à sua ligação com o HLA-B27 (Kujipers *et al*, 2016). Desta forma, o objetivo deste estudo é analisar a influência do gene *KIR2DL3* no risco de desenvolvimento de espondilite anquilosante.

MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística

Este é um estudo de caso-controle, no qual foi incluído 86 pacientes não aparentados, com EA, diagnosticados pelos critérios ASAS 2009 e residentes da região Norte do Paraná. Os pacientes foram triados por clínica de reumatologia particular na cidade de Maringá/PR. O grupo controle foi constituído por 93 indivíduos sem a doença. Eles forneceram consentimento voluntário e informado com assinatura de um documento antes de participarem. O projeto foi executado conforme as normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Coleta das amostras e extração de DNA

Foram utilizadas amostras de sangue previamente coletadas em pesquisas anteriores e armazenadas no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Ciências Básicas da Saúde da UEM. O DNA foi extraído utilizando a metodologia de *salting-out* ou o kit BioPur Extração Mini Spin Plus (BioPur, BR). A concentração e a qualidade do DNA foram avaliadas medindo a densidade óptica em um espectrofotômetro a 260nm e 280nm (*NanoDrop 2000R*, Thermo Scientific).

Genotipagem do KIR e análise estatística

Os genótipos foram analisados pela reação em cadeia da polimerase utilizando iniciadores sequência-específicas (PCR-SSP). Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose com Syber Green (ThermoFisher®). Foi feita uma tabela no Excel com as informações e o cálculo da frequência e associação foi realizado com o Software R, para avaliar uma possível associação foi utilizado uma tabela 2x2 com o teste de Qui-quadrado e o T-teste.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características dos indivíduos constam na **Tabela 1**. Os grupos estavam pareados de acordo com o sexo, idade e etnia e não foram verificadas diferenças estatísticas significativas pelos testes T e Qui-quadrado ($p < 0,05$). Notou-se que a população de ambos os grupos tinha como maioria indivíduos do sexo feminino e de cor branca.

Tabela 1. Características de casos controles e pacientes com EA.

CARACTERÍSTICAS	CONTROLES N = 93	PACIENTES N = 86	p valor
SEXO (F/M)	50 / 43	58 / 28	$p > 0,05b$
IDADE	41,59 ± 12,20 ^a	44,38 ± 13,68a	$p > 0,05c$
ETNIA			
BRANCO	86	76	$p > 0,05b$
MULATO	4	5	$p > 0,05b$
NEGRO	2	3	$p > 0,05b$
ORIENTAL	0	2	$p > 0,05b$
PARDO	1	0	$p > 0,05b$

a - Média ± desvio padrão (todos esses valores), b - A análise estatística foi realizada pelo teste Qui-Quadrado, c- A análise estatística foi realizada pelo teste T para duas amostras independentes.
Abreviaturas: N, número total de indivíduos; F, sexo feminino; M, sexo masculino.

O estudo mostrou que não houve associação entre a presença do gene *KIR2DL3* e o desenvolvimento de espondilite anquilosante, conforme expõe a **Tabela 2**. Portanto, esse gene não se configura como fator de risco ou de proteção para EA.

Tabela 2. Presença do gene *KIR2DL3* em casos controles e pacientes com EA.

KIR	CONTROLES N= 93	PACIENTES N = 86	OR (95% IC)	p valor
<i>KIR2DL3</i>	n (f)	n (f)		
AUSÊNCIA	13 (0,14)	7 (0,08)	1.00	$p > 0,05b$

PRESENÇA	80 (0,86)	79 (0,92)	1,81 (0,53 - 1,71)
-----------------	-----------	-----------	--------------------

Abreviaturas: N, tamanho da população; n, número de indivíduos com o genótipo, f, frequência; OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; b - A análise estatística foi realizada pelo teste do Qui-Quadrado.

Apesar de não ter atingido significância estatística, a frequência do gene *KIR2DL3* foi maior em pacientes. Este resultado está de acordo com o reportado em um estudo iraniano que mostrou uma frequência maior do gene *KIR2DL3* em pacientes com EA do que em controles (Mahmoudi *et al*, 2016). Contudo, outro estudo realizado no Reino Unido (Harvey *et al*, 2009) não demonstrou associação significativa. Uma possível explicação é a diferença étnica entre as populações analisadas em cada estudo, já que além da possibilidade de ter ou não herdado este gene existe a variabilidade alélica que pode aumentar ou diminuir a capacidade de sinalização para as células NK, variabilidade esta não analisada pelo presente estudo.

Desta forma, são necessárias novas pesquisas envolvendo um maior número de pacientes, a fim de comprovar esses resultados. Além disso, a análise da frequência das variantes alélicas de *KIR2DL3* pode ser importante para melhor compreensão do papel destes receptores na EA.

CONCLUSÕES

Não foi encontrada associação entre o gene *KIR2DL3* e o desenvolvimento de espondilite anquilosante, uma vez que não houve uma diferença significativa entre pacientes com a doença e casos controles.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Araucária pelo financiamento do PIBIC para esta pesquisa.

REFERÊNCIAS

BRAUN, J.; SIEPER, J. Ankylosing spondylitis. **Lancet**, v. 369, n. 9570, p. 1379–1390, 2007.

HARVEY, D. et al. Analysis of killer immunoglobulin-like receptor genes in ankylosing spondylitis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 68, n. 4, p. 595–598, 2009.

KUIJPERS, T. W. et al. Killer immunoglobulin receptor genes in spondyloarthritis. **Current opinion in rheumatology**, v. 28, n. 4, p. 368–375, 2016.



MAHMOUDI, M. et al. Analysis of killer cell immunoglobulin-like receptor genes and their HLA ligands in Iranian patients with ankylosing spondylitis. **Iranian journal of allergy, asthma, and immunology**, p. 27–38, 2016.

MIDDLETON, D.; CURRAN, M.; MAXWELL, L. Natural killer cells and their receptors. **Transplant immunology**, v. 10, n. 2–3, p. 147–164, 2002.