

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO RECEPTOR *KIR2DL3* NA GRAVIDADE DA COVID-19 EM PACIENTES DO PARANÁ.

Emanuelle Rocha Moreira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Sergio Grava (aluno Doutorado), Matheus Braga (Coorientador), Jeane Eliete Laguila Visentainer (Orientador). E-mail: ra129159@uem.br.

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

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

Palavras-chave: Genes de resposta imune; Covid-19

RESUMO

Este estudo investigou a associação do gene *KIR2DL3* com a gravidade da COVID-19 em pacientes internados, classificados como não severos e severos/críticos. Foram coletadas amostras de sangue para extração de DNA e genotipagem do gene por PCR-SSP. Dados clínicos, idade, sexo e comorbidades foram analisados utilizando testes estatísticos. Observou-se que a idade foi significativamente maior nos pacientes severos/críticos, enquanto as comorbidades, embora mais frequentes nesse grupo, não apresentaram significância estatística. A presença do *KIR* (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors*) foi mais comum em pacientes não severos, sem associação significativa com a gravidade da doença. O estudo ainda está em andamento, e novas amostras serão analisadas contribuindo para compreender melhor a influência do gene na evolução clínica da doença.

INTRODUÇÃO

A COVID-19 é uma doença infecciosa grave que se originou do vírus SARS-CoV-2, o seu primeiro caso foi em Wuhan (província de Hubei, China), transmitida principalmente por via respiratória e com alto índice de mortalidade, que se espalhou rapidamente pelo mundo em maio de 2020, sendo declarado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma pandemia (Ciotti; et al. 2020).

As células *Natural Killers* (NK) são elementos cruciais do sistema imunológico inato contra infecções virais, mas dependem da expressão de alguns receptores de superfície inibitórios e ativadores para definir quais células-alvo serão atacadas ou toleradas, regulando assim, a resposta imune. Os receptores *KIR* (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors*) são os receptores mais importantes presentes nas células NK, regulando sua função através da associação aos ligantes das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (HLA, do inglês *Human Leukocyte Antigen*) de classe I na superfície celular das células-alvo (Littera; et al. 2021). As células NK recebem dos receptores inibitórios *KIR* (iKIRs) e dos receptores ativadores *KIR* (aKIRs) diversos sinais capazes de inibir ou ativar sua função,

detectando moléculas HLA-I e inibindo a lise celular através dos *iKIRs* ou ativando a citotoxicidade das células NK e lisando as células infectadas a partir da ligação dos *aKIRs* aos ligantes alterados devido ao estresse celular (Teshnizi; et al. 2024).

Os genes *KIR* são nomeados a partir do número de seus domínios (2D ou 3D) e comprimento das suas caudas intracelulares, podendo ser longas (L) ou curtas (S). A diversidade dos genes *KIR* varia consideravelmente entre os indivíduos, tanto em termos do número quanto da natureza desses genes, o que define diferentes haplótipos que são classificados em dois grupos. Diversos estudos investigaram associações entre os genes *KIR* e a COVID-19, desempenhando um papel importante na regulação da resposta imune das células NK contra o vírus SARS-CoV-2. A diversidade genética dos *KIRs* pode influenciar o desenvolvimento de respostas imunes distintas entre os indivíduos, podendo impactar na susceptibilidade à COVID-19 (Teshnizi; et al. 2024); (Maniangou; et al. 2017); (Littera; et al. 2021). Com este intuito, o objetivo desse estudo é investigar a influência do receptor inibitório *KIR2DL3* com o grau de gravidade de diferentes pacientes diagnosticados com COVID-19.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes e controles

Este estudo foi realizado com amostras de pacientes internados no Hospital Universitário Regional de Maringá (HUM) e no Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) diagnosticados com Covid-19. Foram considerados os casos confirmados e os pacientes acompanhados até sua recuperação ou óbito, por meio dos resultados laboratoriais e boletins clínicos hospitalares. Foram selecionados 50 pacientes que evoluíram para casos graves ou críticos e 50 pacientes que manifestaram quadros leves da doença. O projeto foi conduzido de acordo com as normas preconizadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (CAAE: 38095420.5.0000.0104) e de Londrina (CAAE: 31656420.0.0000.5231).

Extração de DNA e genotipagem do KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors)

O DNA genômico foi extraído de células do sangue total, já coletadas em tubos contendo anticoagulante EDTA no momento de internamento do paciente, com o Kit de extração DNA BIOPUR® (Biometrix, Curitiba, Paraná, Brasil), de acordo com o fabricante, e a concentração do material obtido foi avaliada por densidade óptica em equipamento Nanodrop 2000® (Wilmington, USA). Os genótipos dos pacientes foram analisados pela metodologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores sequência-específicas, do inglês *Polymerase Chain Reaction Sequence-Specific Primers* (PCR-SSP). Os produtos de amplificação obtidos foram submetidos a análise por meio de eletroforese em gel de agarose corado com Sybr Safe (ThermoFisher®).

Análise estatística

Foi montada uma tabela no Excel com as informações dos pacientes incluindo a distribuição do gene *KIR2DL3*, o cálculo da frequência e de associação foram realizados através do Software R, para avaliar uma possível associação, foi utilizado uma tabela 2x2 com o teste de Qui-quadrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características dos pacientes estudados estão apresentadas na tabela 1. Foram notadas diferenças estatisticamente significativas na distribuição da idade dos indivíduos não severos e severos/críticos com Covid-19 ($p < 0,05$). Quanto às comorbidades, as que foram mais consideradas são a diabetes e obesidade, se apresentando mais frequentes nos pacientes severos/críticos. No entanto, a diabetes não mostrou diferenças significativas entre os casos não severos e severos/críticos dos pacientes, sugerindo que não é um fator de risco relevante para a gravidade da infecção.

Tabela 1: Características de pacientes não severos e severos/críticos com Covid-19

Características	Não severos N= 37	Severos/Críticos N= 30	p-valor
Sexo (F/M)	23/14	13/17	0,197 ^b
Idade	46,24 ± 14,59 ^a	59,87 ± 14,51 ^a	0,0003^c
Comorbidades	n (f)	n (f)	
Diabetes	1 (0,01)	6 (0,06)	0,057 ^b
Obesidade	14 (0,14)	19 (0,19)	0,067 ^b

a) Média ± desvio padrão (todos esses valores), b) Análise estatística realizada pelo OpenEpi tabela 2x2 χ^2 - teste, c) Análise estatística realizada pelo teste T para duas amostras independentes. Abreviaturas: N, número total de indivíduos; F, sexo feminino; M, sexo masculino: p, probabilidade

Associando a COVID-19 com o gene *KIR2DL3* em pacientes não severos e severos/críticos (Tabela 2), observou-se que a frequência do gene foi maior em pacientes não severos em relação aos severos/críticos. Ainda que essa diferença não apresente um risco para a gravidade da Covid-19, com OR = 1,79, IC 95% (0,48-6,66) e $p = 0,379$. Esses dados sugerem uma possível tendência de maior prevalência do gene em indivíduos com quadros menos graves. Em comparação, outros estudos publicados apresentaram achados sobre o *KIR2DL3* e a severidade da COVID-19. Uma meta-análise demonstrou que o gene pode estar associado a um maior risco de infecção (OR = 1,48, IC 95% = 1,17–1,88, $p < 0,001$) (Teshnizi, et al. 2024).

Tabela 2: Associação do gene *KIR2DL3* pacientes não-severos e severos/críticos com Covid-19.

<i>KIR2DL3</i>	Não severos N=37 n (f)	Severos/Críticos N=30 n (f)	OR (95% IC)	p-valor
Ausente	8 (0,21)	4 (0,13)		
Presente	29 (0,78)	26 (0,86)	1,79 (0,48-6,66)	0,379 ^a

a) Análise estatística realizada pelo OpenEpi tabela 2x2 χ^2 - teste. Abreviaturas: N, número total de pacientes; n, número de genes; OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; p, probabilidade

CONCLUSÕES

Os dados obtidos até o momento indicam que a idade foi associada à gravidade da COVID-19, enquanto comorbidades como diabetes e obesidade mostraram uma tendência de associação. A frequência do gene *KIR2DL3* foi maior em pacientes não severos, mas sem associação significativa com a gravidade da doença. Ressalta-se que o estudo ainda está em andamento e novas amostras serão analisadas para confirmar todas essas observações.

AGRADECIMENTOS

CNPq, CAPES e Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS

CIOTTI, M.; CICCIOZZI, M.; TERRINONI, A.; JIANG, W. C.; WANG, C. B.; BERNARDINI, S. The COVID-19 pandemic. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 57, p. 365-388, 2020.

LITTERA, R.; CHESSA, L.; DEIDDA, S.; ANGIONI, G.; CAMPAGNA, M.; 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, 2021.

MANIANGOU, B.; LEGRAND, N.; ALIZADEH, M.; GUYET, U.; WILLEM, C.; DAVID, G.; et al. Killer immunoglobulin-like receptor allele determination using next-generation sequencing technology. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 547, p. 1-13, 2017.

TESHNIZI, S. H.; MIRZAZADEH, S.; MASHHADI, N.; MERI, S.; KABELITZ, D.; KALANTAR, K. Association study between killer immunoglobulin-like receptor polymorphisms and susceptibility to COVID-19 disease: a systematic review and meta-analysis. **Immunologic Research**, v. 72, p. 175-184, 2024.