



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Danton Magri

**Associação de polimorfismos em genes de receptores *toll-like* com desfechos clínicos de
pacientes hospitalizados por COVID-19**

Florianópolis
2024

Danton Magri

Associação de polimorfismos em genes de receptores *toll-like* com desfechos clínicos de pacientes hospitalizados por COVID-19

Trabalho de conclusão de curso submetido ao curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Juliana Dal-Ri Lindenau, Dr^ª.
Co-orientadora: Giovana Bozelo, M^ª.

Florianópolis

2024

Magri, Danton

Associação de polimorfismos em genes de receptores toll-like com desfechos clínicos de pacientes hospitalizados por COVID-19 / Danton Magri ; orientadora, Juliana Dal-Ri Lindenau, coorientadora, Giovana Bozelo, 2024.

52 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Imunogenética. 3. Prognóstico. 4. Estudo de Associação. 5. Imunidade Inata. I. Lindenau, Juliana Dal-Ri. II. Bozelo, Giovana. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Danton Magri

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Ciências Biológicas.

Florianópolis, 10 de julho de 2024.



Documento assinado digitalmente

Daniela Cristina de Toni

Data: 11/07/2024 08:55:51-0300

CPF: ***.080.129-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Coordenação do Curso

Banca examinadora



Documento assinado digitalmente

Juliana Dal Ri Lindenau

Data: 15/07/2024 20:03:47-0300

CPF: ***.731.560-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof^ª Juliana Dal-Ri Lindenau, Dr^ª.

Orientadora



Documento assinado digitalmente

LEILI DAIANE HAUSMANN

Data: 16/07/2024 07:28:08-0300

CPF: ***.785.819-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Leili Daiane Hausmann, Dr^ª.

UFSC



Documento assinado digitalmente

MARIA LUIZA GUIMARAES DE OLIVEIRA

Data: 15/07/2024 20:50:00-0300

CPF: ***.903.599-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Maria Luiza Guimarães Oliveira, Dr^ª.

UFSC

Florianópolis, 2024

A todas as vozes que a pandemia de COVID-19 silenciou para sempre.

AGRADECIMENTOS

A ciência é uma empreitada absolutamente coletiva. Esse trabalho foi feito a muitas mãos e tenho tanto orgulho de cada uma delas quanto dele próprio. Deixo registrado por escrito, portanto, meus mais sinceros agradecimentos:

A todos os pacientes envolvidos nessa pesquisa e a seus familiares que deixaram seu consentimento na maioria dos casos. É fácil esquecer que estamos trabalhando com vidas humanas depois que as amostras viram códigos em microtubos de DNA extraído;

Ao CNPq pela concessão das bolsas de iniciação científica;

À equipe do Laboratório Multiusuário em Estudos de Biologia, o LAMEB, por sempre me receber e ajudar de maneira cordial e prestativa;

Ao prof. Ricardo e à equipe do LACERT por permitirem que eu utilizasse o termociclador de qPCR nas minhas genotipagens, em especial à Nathali pela gentileza, disponibilidade e parceria;

À Manuela e à Maria Luiza pela ajuda – e por vezes salvação – nas análises estatísticas. Com vocês o SPSS e o Plink ficaram menos assustadores (mas continuam);

Aos meus colegas de LAPOGE, em especial à Giovana, minha coorientadora, por todos os conselhos, sugestões, conversas, cafés e almoços no RU. Foi um prazer dividir meu caderno de laboratório contigo;

A todos os amigos que eu fiz nesses seis anos e meio de graduação. Amira, Bianca, Luma, Duda, Masha, Jhonathan... A UFSC e a UniDeb me deram vocês de presente e apesar de espalhados pelo mundo eu sinto vocês comigo todos os dias;

Aos meus pais que me permitiram viver tudo o que eu vivi nesses anos todos, espero que esse seja só um dos frutos do investimento de vocês;

Às professoras do LAPOGE, em especial à prof. Yara, por ter me apresentado ao mundo da genética e me fígado desde o primeiro *slide*. Por me permitir atuar como extensionista em tantos outubros rosa e me ensinar todos os dias a não ser mirim;

E por fim, claro, à minha orientadora, professora Juliana. Por ter me aturado desde 2019 em quatro ciclos do PIBIC, perdoado tantos erros em bancos de dados, me ensinado tanto sobre biologia molecular, estatística e escrita científica. Por estar sempre disponível, até de madrugada, durante uma pandemia ou tornando-se mãe da Érica. Obrigado, sobretudo, por confiar em mim. Foi um prazer ser teu orientando por todos esses anos e fazer ciência contigo.

Com cada célula do meu coração, obrigado.

“que tu vivas em tempos interessantes”

~maldição chinesa

RESUMO

A COVID-19 é uma infecção viral altamente transmissível causada por um coronavírus zoonótico, nomeado *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2). Cerca de 1/5 dos pacientes são acometidos pela síndrome da angústia respiratória aguda, caracterizada pela infecção das células alveolares e instauração de processos inflamatórios, o que pode culminar em hospitalização. Os receptores *toll-like* (TLRs) são receptores de reconhecimento de padrões, componentes essenciais da imunidade inata responsáveis por reconhecer os chamados PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*). O acoplamento dos TLRs a seus ligantes induz uma cascata de sinalização que culmina na promoção da inflamação, ajudando a combater o patógeno exógeno. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) *rs3775291*, *rs179008* e *rs3764880* ocorrem nos genes *TLR3*, *TLR7* e *TLR8* respectivamente e são variações não-sinônimas que levam a modificação na estrutura proteica. O SNP *rs352140* está localizado no gene *TLR9* e é considerado uma variação sinônima com potencial de interferir na ligação de fatores de transcrição, afetar expressão, *splicing*, estabilidade do RNAm e dobramento proteico. Neste contexto, marcadores nestes genes seriam promissores alvos para entender a fisiopatologia da COVID-19. O objetivo desse estudo foi avaliar se há associação entre os SNPs mencionados e desfechos clínicos de pacientes brasileiros hospitalizados por COVID-19. Foram incluídos seis desfechos: óbito por COVID-19, alterações neurológicas, ventilação mecânica, sepse, comprometimento pulmonar e tromboembolismo. A amostra é composta por 127 pacientes diagnosticados com a doença e admitidos ao Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC). Dados acerca dos desfechos clínicos foram coletados dos prontuários médicos. DNA genômico foi obtido a partir de amostras de sangue periférico utilizando o método de extração *salting-out*. A genotipagem dos polimorfismos foi executada utilizando a reação em cadeia da polimerase em tempo real, por meio de ensaios TaqMan®. A avaliação da associação com os desfechos foi realizada por meio de regressão de Poisson utilizando o *software* SPSS versão 25. Este estudo recebeu a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC), sob o parecer número 4.164.291. A amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os *loci* analisados e os dois SNPs localizados no cromossomo X não estavam em desequilíbrio de ligação. A amostra é majoritariamente composta por indivíduos nascidos do sexo masculino (60,9%), corroborando algo amplamente reportado na literatura científica. 72,7% dos pacientes também apresentavam pelo menos uma comorbidade, sendo as mais prevalentes hipertensão, cardiopatias e sobrepeso. Os resultados obtidos apontam para ausência de associação dos desfechos clínicos avaliados com os SNPs estudados, sugerindo que esses não seriam bons biomarcadores para o prognóstico da COVID-19 na população brasileira. Apenas a associação negativa dos SNPs *rs377529* e *rs179008* com a COVID-19 já foi relatada, em outras populações e na brasileira. Não foram encontrados estudos de associação com *rs3764880* e *rs352140*, sugerindo originalidade dos resultados aqui descritos. Os resultados encontrados podem ser úteis na formulação de diretrizes clínicas visando otimizar a assistência terapêutica em pacientes brasileiros acometidos pela COVID-19.

Palavras-chave: Imunogenética, Estudo de Associação, Prognóstico, Imunidade Inata.

ABSTRACT

COVID-19 is a highly transmissible viral infection caused by a zoonotic coronavirus, namely severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Around 1/5 of patients experience acute respiratory distress syndrome, characterized by the infection of alveolar cells and instauration of inflammatory processes which may lead to hospitalization. Toll-like receptors (TLRs) are pattern-recognizer receptors, essential components of the innate immunity, responsible for recognizing the so-called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). When TLRs attach to their ligands a signalling chain takes place, culminating in the promotion of inflammation, which helps fighting the exogenous pathogen. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) *rs3775291*, *rs179008* and *rs3764880* occur in the *TLR3*, *TLR7* and *TLR8* genes respectively and are synonymous variations, leading to modifications in protein structure. The SNP *rs352140* is in the *TLR9* gene and is considered a synonymous variation with potential of interfering on the attachment of transcription factors, affect expression, splicing, mRNA stability and protein folding. Given that, markers on these genes would be promising targets to understand COVID-19 pathophysiology. The aim of this study was to access whether there is an association between the mentioned SNPs and clinical outcomes of Brazilian patients hospitalized with COVID-19. Six outcomes were included: death by COVID-19, neurological alterations, mechanical ventilation, sepsis, lung impairment and thromboembolism. The sample is composed of 127 patients diagnosed with the disease and admitted to the University Hospital Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC). Data regarding the clinical outcomes were collected from the patients' medical records. Genomic DNA was obtained from blood samples using the salting-out extraction method. SNP genotyping was performed by real-time polymerase chain reaction, using TaqMan® assays. Assessment of the association with the clinical outcomes was performed via Poisson regression using the SPSS software version 25. This study has received approval on the ethics committee of Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC) under the trial number 4.164.291. The sample was in Hardy-Weinberg equilibrium for the assessed loci and the two SNPs located on the X chromosome were not in linkage disequilibrium. The sample comprised mainly male individuals (60,9%), confirming something that is vastly reported in the scientific literature. 72,7% of patients also had at least one comorbidity and the main ones were: hypertension, cardiopathies and overweight. Obtained results point to a lack of association of the assessed SNPs with the studied clinical outcomes, suggesting that these would not be good biomarkers for COVID-19 prognosis in the Brazilian population. Just a negative association of the SNPs *rs3775291* and *rs179008* with COVID-19 was reported, including in the Brazilian population. Regarding *rs3764880* and *rs352140*, no studies were found linking their association with COVID-19, suggesting that our findings are original. These results can be useful when formulating clinical guidelines aiming to optimize therapeutical assistance in Brazilian patients with COVID-19.

Keywords: Immunogenetics; Association Study; Prognostics; Innate Immunity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O alvéolo normal (esquerda) e o alvéolo lesionado na fase inicial da lesão pulmonar aguda e da SARA.	22
Figura 2 - Em (A) a estrutura do TLR-3 humano. Em (B) estrutura cristalina do domínio luminal do receptor.....	26
Figura 3 - Respostas antiviral e inflamatória mediadas por TLRs durante infecção por SARS-CoV-2.....	28
Figura 4: TLRs endossomais e seus principais ligantes	29
Figura 5: Esquematização de um sistema de qPCR com sonda de hidrólise	36
Figura 6: Curva de amplificação de uma das amostras utilizadas no trabalho.....	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos TLRs humanos e murinos e seus ligantes naturais.....	27
Quadro 2: Códigos <i>reference</i> SNP e sequências nucleotídicas das sondas de hidrólise utilizadas nas reações de genotipagem	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Componentes utilizados no mix de trabalho e seus respectivos volumes.....	36
Tabela 2: Informações da amostra estudada	40
Tabela 3: Comorbidades frequentemente associadas à progressão ruim da COVID-19 observadas na amostra	42
Tabela 4: Frequências genótípicas dos SNPs estudados na amostra	44
Tabela 5: Frequências genótípicas dos SNPs na amostra estudada agrupadas pelo alelo alternativo e estratificadas por desfecho clínico.....	45
Tabela 6: Associações entre os SNPs de interesse e os desfechos clínicos estudados	45
Tabela 7: Associação dos SNPs localizados no cromossomo X com os desfechos clínicos estudados estratificada pelo sexo ao nascimento.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*A	Adenosina
*C	Citosina
*G	Guanina
*T	Timina
ACE-2	Enzima Conversora da Angiotensina 2, do inglês <i>angiotensin converting enzyme 2</i>
API	Associação Panamericana de Infectologia
AVC	Acidente vascular cerebral
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
CpG	Citosina-fosfato-guanina
CXCL-10	Quimiocina 10 ligante ao motivo C-X-C, do inglês <i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i>
DAMPs	Padrões moleculares associados ao perigo/dano, do inglês <i>damage/danger-associated molecular patterns</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
dsRNA	Ácido ribonucleico de fita dupla, do inglês <i>double-stranded ribonucleic acid</i>
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>Human immunodeficiency virus</i>
HU-UFSC	Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago
IC	Intervalo de confiança
IFN- β	Interferon β
IFN- λ	Interferon λ
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8

IMC	Índice de massa corporal
LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos
LRR	Ectodomínio rico em repetições de leucina, do inglês <i>leucine-rich repeats-containing domain</i>
MCP	Proteína quimiotática de monócito, do inglês <i>monocyte chemoattractant protein</i>
min	Minutos
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófago 1 α , do inglês <i>macophage inflammatory protein α</i>
Myd88	Fator de diferenciação mielóide 88, do inglês <i>myeloid differentiation protein 88</i>
n	Tamanho amostral
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>p</i>	Probabilidade de significância
PAF	Fator de ativação plaquetária, do inglês <i>platelet activating factor</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos, do inglês <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões, do inglês <i>pattern-recognizing receptor</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real, do inglês <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RP	Razão de prevalência
s	Segundos
SARA	Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SBI	Sociedade Brasileira de Infectologia
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês <i>single nucleotide polymorphism</i>
ssRNA	Ácido ribonucleico de fita simples, do inglês <i>single-stranded ribonucleic acid</i>
TLR	Receptor <i>toll-like</i> , do inglês <i>toll-like receptor</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral α , do inglês <i>tumor necrosis factor α</i>
TIR	Toll/receptor de IL-1, do inglês <i>toll/IL-1 receptor</i>

TRIF	Adaptador indutor de Interferon- β contendo domínio TIR, do inglês <i>TIR domain-containing adaptor-inducing interferon</i>
vs	<i>Versus</i>
ΔRn	Magnitude do sinal de fluorescência normalizado, relativo à fluorescência basal, gerado pelo fluoróforo repórter a cada ciclo da PCR
μL	Microlitros
$^{\circ}C$	Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. A COVID-19	19
1.1.1. Origem e epidemiologia	19
1.1.2. Sintomatologia e tratamentos	20
1.1.3. Contágio e progressão da infecção	21
1.1.4. Impactos do estado inflamatório.....	22
1.2. A IMUNIDADE INATA	23
1.2.1. Princípios gerais	23
1.2.2. Receptores <i>toll-like</i> (TLRs)	25
1.2.3. TLRs intracelulares.....	29
1.3. POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPs).....	30
1.3.1. Características gerais	30
1.3.2. <i>rs3775291</i>	31
1.3.3. <i>rs179008</i>	31
1.3.4. <i>rs3764880</i>	31
1.3.5. <i>rs352140</i>	32
1.4. OBJETIVOS.....	32
1.4.1. Objetivo geral	32
1.4.2. Objetivos específicos.....	32
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1. COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA	34
2.2. OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	34
2.3. GENOTIPAGEM POR qPCR	35
2.3. COLETA DE DADOS.....	38
2.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	40
3.2. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ASSOCIAÇÕES GENÉTICAS.....	43
3.2.1. Associação com o polimorfismo <i>rs3775291</i>	44
3.2.2. Associação com o polimorfismo <i>rs179008</i>	47
3.2.3. Associação com o polimorfismo <i>rs3764880</i>	49
3.2.4. Associação com o polimorfismo <i>rs352140</i>	50
3.2.5. Ausência de associação com os SNPs estudados.....	51
4. CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXO A – TCLE utilizado na pesquisa.....	62

1. INTRODUÇÃO

1.1. A COVID-19

1.1.1. Origem e epidemiologia

A humanidade enfrentou três pandemias letais ao longo do século XXI associadas a novos coronavírus: SARS (*severe acute respiratory syndrome*), MERS (*Middle East respiratory syndrome*) e COVID-19 (*coronavirus disease 2019*). Todos esses vírus, os quais são responsáveis por causar infecções agudas no trato respiratório, são altamente contagiosos na natureza e/ou têm ocasionado mortalidade elevada. A recente doença COVID-19 é uma infecção viral altamente transmissível causada por outro novo coronavírus zoonótico, nomeado *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) (Khan *et al.*, 2021).

A emergência do SARS-CoV-2 foi primeiramente observada quando casos de uma pneumonia não explicada foram notados na cidade de Wuhan, China. Durante as primeiras semanas da epidemia em Wuhan, uma associação foi notada entre os primeiros casos e o Mercado Atacadista de Frutos do Mar de Huanan; os casos foram majoritariamente reportados em vendedores e funcionários. As autoridades fecharam o mercado no dia 1 de janeiro de 2020 para sanitização e desinfecção do ambiente. O mercado, que vendia predominantemente produtos aquáticos, frutos do mar e derivados de animais selvagens, foi inicialmente suspeitado como o epicentro da epidemia, sugerindo um evento de interface humano-animal. Investigações retrospectivas identificaram casos adicionais com início da doença em dezembro de 2019 e nem todos os primeiros casos reportaram associação com o mercado Huanan. [...] O papel dos pangolins como hospedeiros intermediários foi proposto, mas estudos epidemiológicos e epizoonóticos subsequentes não favoreceram a contribuição desses animais na transmissão para humanos. O possível hospedeiro intermediário do SARS-CoV-2 permanece desconhecido. [...] O vírus causador da COVID-19 foi rapidamente isolado de pacientes e sequenciado, sendo os resultados da China subsequentemente compartilhados e publicados em janeiro de 2020. Os resultados mostraram que o agente etiológico era um vírus de RNA de fita simples senso positivo, pertencente à família Coronaviridae, sendo um beta coronavírus de subgrupo B e novo para humanos (Organização Mundial da Saúde (OMS), 2021).

Globalmente, até o dia 09/06/2024 foram reportados 775.615.736 casos confirmados de COVID-19 e 7.051.323 mortes. Até 31/12/2023 foram administradas 5.47 bilhões de doses de vacina contra a doença (OMS, 2024). No Brasil, de 27/03/2020 a 25/05/2024 foram reportados 38.815.115 casos e computados 712.258 óbitos (Ministério da Saúde, 2024).

1.1.2. Sintomatologia e tratamentos

A sintomatologia da COVID-19 é bastante variada. Os sintomas costumam iniciar de cinco a seis dias após a exposição ao vírus e duram de um a 14 dias. São considerados os sintomas mais comuns: febre, calafrios e dor de garganta, enquanto os sintomas reportados com menos frequência são: mialgia (dor muscular), fadiga severa ou cansaço, congestão nasal, espirros, cefaleia (dor de cabeça), dor ocular, tontura, tosse persistente, angina (dor no peito), dispneia (falta de ar), disfonia (alteração da voz), dormência ou formigamento, perda de apetite, náusea, êmese (vômito), dor abdominal, diarreia, anosmia (perda de olfato), ageusia (perda de paladar), alterações no olfato e no paladar e dificuldade para dormir (OMS, 2024).

Pacientes com os seguintes sintomas devem procurar atenção médica imediata: dificuldade para respirar - principalmente em repouso - e para proferir frases, confusão mental, letargia ou perda de consciência, angina persistente, pele tornando-se fria ou úmida, com coloração azulada ou pálida e incapacidade para falar ou movimentar-se (OMS, 2024).

Pacientes com problemas de saúde pré-existentes têm riscos maiores quando contraem COVID-19. Incluem-se nessa categoria usuários de medicação imunossupressora, pacientes portadores de HIV (vírus da imunodeficiência humana), pessoas com doenças crônicas cardíacas, pulmonares, hepáticas ou reumatológicas e diagnosticados com diabetes, hipertensão, câncer, obesidade ou demência (OMS, 2024).

As consequências da COVID-19 severa incluem óbito, insuficiência respiratória, sepse, tromboembolismo e falência de múltiplos órgãos, incluindo danos ao coração, fígado ou rins. Em situações raras crianças podem desenvolver uma síndrome inflamatória grave poucas semanas após a infecção (OMS, 2024).

Algumas pessoas que tiveram COVID-19, independentemente de terem sido hospitalizadas, continuam a manifestar sintomas. Tais efeitos a longo prazo são chamados COVID longa (ou condição pós-COVID). Os sintomas mais comuns associados a COVID longa são fadiga, falta de ar e disfunção cognitiva (como, por exemplo, confusão, esquecimento ou falta de foco e clareza) (OMS, 2024).

A OMS recomenda com alto grau de confiabilidade certas terapias medicamentosas para pacientes hospitalizados com COVID-19, tais como nirmatrelvir e ritonavir para pacientes não-severos (ratificação da Sociedade Brasileira de Infectologia (SBI) e da Associação Panamericana de Infectologia (API)) e corticosteroides, bloqueadores de receptor de IL-6 e baricitnibe para pacientes severos e críticos. SBI e API consideram ainda molnupiravir e

rendesevir benéficos, mas sem evidências fortes de efetividade e, no caso de a doença progredir para grave ou crítica, recomendam rendesevir, baracitinibe e tocilizumabe. No cenário brasileiro a revisão sistemática mais recente (Falavigna *et al.* (2022) faz recomendações fortes para o uso de corticosteroides em pacientes em uso de oxigênio suplementar, para o uso de anticoagulantes em doses de profilaxia para tromboembolismo.

1.1.3. Contágio e progressão da infecção

O principal modo pelo qual a infecção pelo SARS-CoV-2 ocorre é através da exposição a fluidos respiratórios que carregam partículas virais infecciosas. Essa exposição acontece principalmente em três ocasiões: (1) inalação de gotículas respiratórias muito pequenas ou aerossóis, (2) deposição de gotículas respiratórias e partículas em mucosas da boca, nariz ou olho por *sprays* ou (3) toque nas mucosas com mãos contaminadas previamente por partículas virais provenientes de fluidos respiratórios ou por encostar em superfícies que continham partículas virais (*Centers for disease control and prevention (CDC)*, 2021).

O SARS-CoV-2 inicia a infecção em uma fase assintomática, ligando-se a células epiteliais nasais no trato respiratório superior. O receptor celular principal que permite a entrada do vírus no ambiente intracelular é o ACE-2 (*angiotensin-converting enzyme 2*), cuja expressão é sabidamente aumentada nas células do epitélio nasal de adultos. O vírus passa por replicação e propagação locais, além de infectar conjuntamente as células ciliadas das vias aéreas condutoras. Esse estágio dura alguns dias e a resposta imune gerada nessa fase é mais limitada (Parasher, 2021).

A segunda fase de infecção compreende a saída do epitélio nasal e invasão do trato respiratório superior. Sintomas de febre, mal-estar e tosse seca começam a ser manifestados. Há uma resposta imunológica maior durante essa etapa, envolvendo a liberação de citocinas como a quimiocina CXCL-10, interferon- β (IFN- β) e interferon- λ (IFN- λ) pelas células infectadas. A maioria dos pacientes não progride além dessa fase, uma vez que a resposta imune orquestrada é suficiente para conter o avanço da infecção (Parasher, 2021).

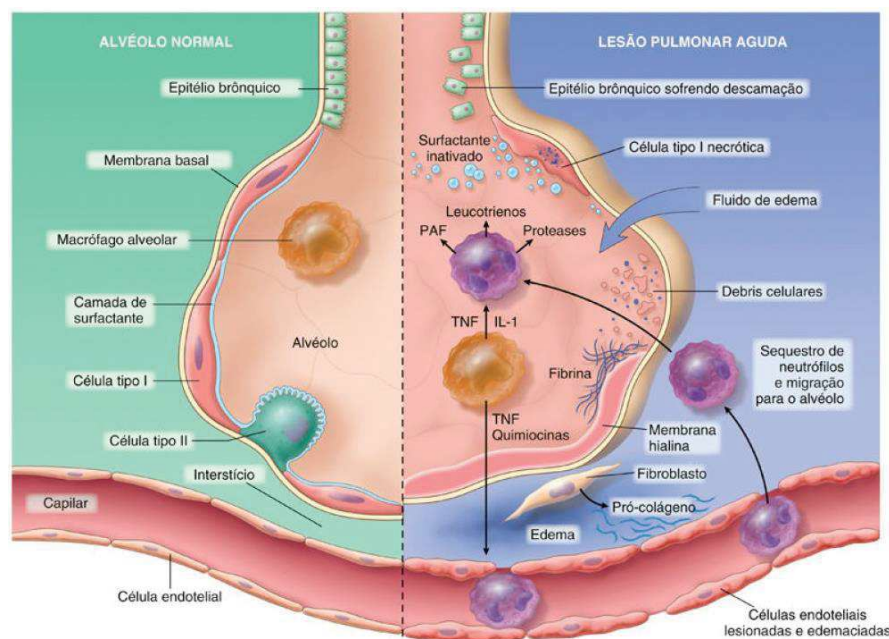
Caso as defesas do organismo não consigam deter a atividade do vírus, a infecção se encaminha para um estágio de envolvimento do trato respiratório inferior e evolui para síndrome da angústia respiratória aguda (SARA). Cerca de 1/5 dos pacientes infectados por SARS-CoV-2 apresentam sintomas condizentes com SARA. Nesse estágio o vírus penetra nas células epiteliais alveolares do tipo 2 via ACE-2 e começa sua replicação. Esses pneumócitos

infectados iniciam a liberação de citocinas diferentes e marcadores inflamatórios, como interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12), fator de necrose tumoral α (TNF- α), IFN- β e IFN- λ , quimiocina CXCL-10, proteína quimiotática de monócito (MCP-1) e proteína inflamatória de macrófago-1 α (MIP-1 α) (Parasher, 2021). Esse processo é também conhecido como tempestade de citocinas.

1.1.4. Impactos do estado inflamatório

A tempestade de citocinas atua como um fator quimioatrativo para neutrófilos, linfócitos T CD4+ (auxiliadores) e linfócitos T CD8+ (citotóxicos), que passam a habitar o tecido pulmonar. Essas células são responsáveis por combater o vírus, mas durante esse processo acabam promovendo um estágio inflamatório e dano ao pulmão. A célula infectada eventualmente sofre apoptose, liberando novas partículas virais, que infectarão células pulmonares adjacentes da mesma maneira. Devido às injúrias persistentes causadas pelo processo inflamatório, tanto pneumócitos do tipo 1 quanto do tipo 2 são perdidos, levando a dano alveolar difuso que eventualmente culmina em SARA (Parasher, 2021). A Figura 1 esquematiza os principais danos ao pulmão que seguem a instauração da inflamação no tecido.

Figura 1 - O alvéolo normal (esquerda) e o alvéolo lesionado na fase inicial da lesão pulmonar aguda e da SARA.



Fonte: Kumar, Abbas e Aster, 2021

Sob influência de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-8 e IL-1 e o TNF (liberados por macrófagos), neutrófilos saem da microvascularização pulmonar e ingressam no espaço alveolar, onde são ativados. Os neutrófilos ativados liberam produtos como leucotrienos, oxidantes, proteases, espécies reativas de oxigênio (EROs) e fator de ativação plaquetária (PAF), que causam danos ao epitélio e endotélio alveolares. Esses danos geram aumento da permeabilidade vascular, perda de surfactante e perda da capacidade de expansão do alvéolo (Kumar, Abbas e Aster, 2021).

Além disso, ocorre acúmulo de fluido de edema, inativação de surfactante e formação de membrana hialina. Essas membranas consistem em edema e fluido rico em fibrina, em meio a remanescentes de células epiteliais necróticas. Em seguida, a liberação de citocinas fibrogênicas derivadas de macrófagos, como fator transformador de crescimento- β (TGF- β) e fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) estimulam o crescimento de fibroblastos e a deposição de colágeno, associados à fase de cicatrização da lesão (Kumar, Abbas e Aster, 2021).

O poder de destruição desencadeado pelos neutrófilos pode ser combatido com uma gama de antiproteases e antioxidantes endógenos, cuja produção é estimulada pelas citocinas pró-inflamatórias. Portanto, é o equilíbrio entre as forças destrutivas e protetoras que irá determinar o grau de lesões teciduais e a gravidade clínica da SARA (Kumar, Abbas e Aster, 2021).

1.2. A IMUNIDADE INATA

1.2.1. Princípios gerais

A resposta imune inata é o primeiro mecanismo para a defesa do hospedeiro encontrado em todos os organismos multicelulares. O sistema imune inato é mais antigo do que o adaptativo, tendo evoluído para proteger o hospedeiro do ambiente em que está inserido, no qual se encontram toxinas e agentes infecciosos (Aristizábal e González, 2013). Respostas imunes inatas são reações defensivas generalistas que podem envolver quase qualquer tipo celular em um organismo. As respostas imunes adaptativas, por sua vez, são altamente específicas ao patógeno que as iniciou e necessitam de leucócitos chamados linfócitos (Alberts *et al.*, 2017).

Existem duas grandes classes de linfócitos que compõem a resposta imune adaptativa: linfócitos-B, secretores de anticorpos que se ligam especificamente ao patógeno e linfócitos-T, que podem tanto matar diretamente as células infectadas ou produzir proteínas (secretadas e de membrana) que estimulam outras células a ajudar a eliminar o agente (Alberts *et al.*, 2017).

Ambas as imunidades evoluíram mecanismos de percepção que as permitem reconhecer invasores e distingui-los das próprias células e moléculas e de agentes exógenos que não oferecem perigo. O sistema imune inato possui proteínas sensoriais que reconhecem tipos de padrões particulares em moléculas que são comuns a patógenos, porém ausentes ou retirados no hospedeiro. O sistema imune adaptativo usa mecanismos genéticos únicos para produzir uma diversidade virtualmente ilimitada de proteínas efetoras - receptores de linfócitos-T e anticorpos, capazes de ligarem-se a qualquer molécula exógena (Alberts *et al.*, 2017).

Todos os vertebrados dependem de seu sistema imune inato para defenderem-se de infecções durante as primeiras horas e dias de exposição a um novo patógeno. Isso porque as respostas adaptativas são lentas, demorando até dias para serem efetivas. A primeira barreira inata encontrada por um patógeno é o epitélio, que forma a pele e reveste os tratos respiratório, digestivo, urinário e reprodutivo. Juntas coesas entre as células epiteliais evitam a entrada entre as células e uma variedade de substâncias secretadas pelas células desencoraja o acoplamento e entrada de patógenos. Tais agentes ocasionalmente rompem essas barricadas epiteliais e em tais casos células não-epiteliais do sistema imune inato fornecem a próxima linha de defesa (Alberts *et al.*, 2017).

Essas células detectam a presença dos patógenos principalmente por meio de proteína receptoras que reconhecem as moléculas associadas aos micróbios que não estão presentes ou são sequestradas no organismo hospedeiro. Como essas moléculas microbianas frequentemente ocorrem em padrões repetitivos, elas são denominadas padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs, do inglês: *pathogen associated molecular patterns*), mesmo que eles não sejam específicos para os micróbios que causam a doença. Os PAMPs estão presentes em várias moléculas microbianas, incluindo os ácidos nucleicos, lipídeos, polissacarídeos e proteínas (Alberts *et al.*, 2017).

Em 1994, a pesquisadora Polly Matzinger inicia uma revisão no conceito de PAMPs ao propor que, na realidade, a função primária do sistema imunológico seria detectar e proteger o corpo contra o perigo, independentemente da origem. Ela propõe a introdução do conceito de padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs, do inglês *danger associated molecular patterns*. Considera-se também *damage associated molecular patterns* como significado para a sigla). Assim, reconhece-se que os padrões moleculares que iniciam a resposta imune não necessariamente estão associados a um patógeno (Matzinger, 1994).

As proteínas receptoras que reconhecem os PAMPs são os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*). Há PRRs transmembrana, presentes na superfície de muitos tipos de células responsáveis por reconhecerem patógenos extracelulares. Em células fagocíticas como macrófagos e neutrófilos os PRRs podem mediar a captura dos patógenos em fagossomos que se fundirão com lisossomos, efetuando a destruição do agente. Existem ainda PRRs intracelulares, responsáveis por detectar patógenos internalizados pela célula, como vírus. Esses PRRs estão livres no citosol ou associados à membrana do sistema endolisossômico. Por fim, há PRRs que são secretados e ligam-se à superfície de patógenos extracelulares, marcando-os para destruição por fagócitos ou por proteínas do sistema complemento (Alberts *et al.*, 2017).

1.2.2. Receptores *toll-like* (TLRs)

“Toll!” é uma exclamação de admiração que, em uma tradução direta do alemão, significa algo como “uau!”. A origem dos receptores *toll-like* na imunidade pode ser apontada em pesquisas sobre desenvolvimento em *Drosophila melanogaster*. No fenótipo conferido por *Toll*, a larva de *Drosophila* apresenta um padrão de bandeamento apenas na região ventral. *Toll* é um membro do “grupo dorsal”, nomeado em função do gene *dorsal*, previamente descoberto e cujo fenótipo caracteriza a larva por ter bandeamento apenas no dorso (Nüsslein-Volhard, 2022). A pesquisadora afirma que o nome surgiu após verificarem um incrível padrão de dominância nas larvas com fenótipo *Toll*.

A descoberta do gene *Toll* por Christiane Nüsslein-Volhard e Eric Wieschaus lhes rendeu um prêmio Nobel em 1995. Em 2011 outro Nobel foi concedido, dessa vez a Bruce Beutler (pela descoberta de que *Toll* também estava envolvido na imunidade das moscas, sendo necessário para a produção de peptídeos antimicrobianos que as protegem de infecções fúngicas) e a Jules Hoffmann (por descrever a presença de *Toll* em mamíferos).

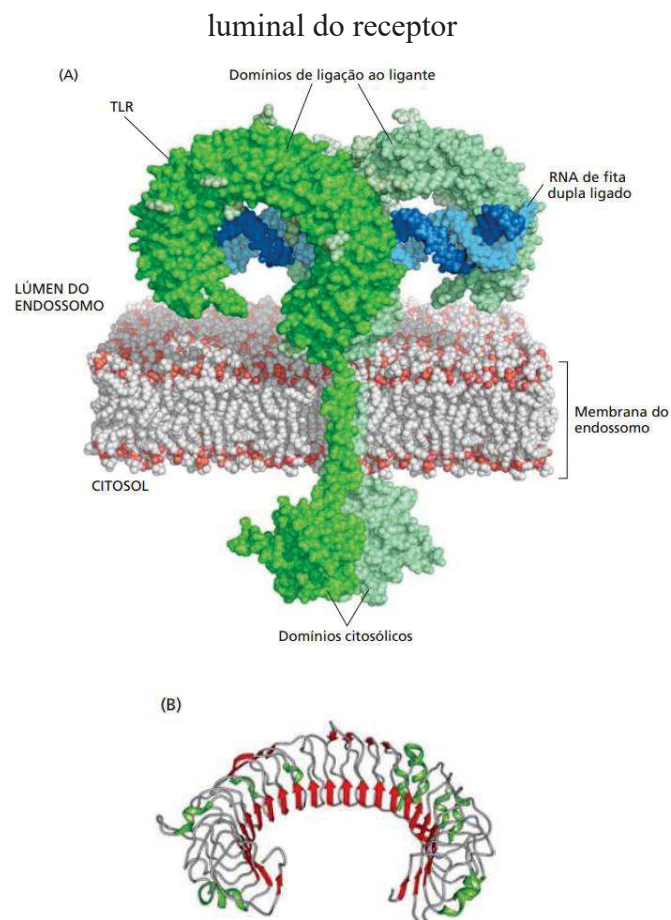
O receptor Toll é uma glicoproteína transmembrana com um grande domínio extracelular que contém uma série de repetições ricas em leucina. Logo foi descoberto que ambos, plantas e animais, possuem uma variedade de receptores semelhantes ao Toll (TLRs; do inglês, *Toll-like receptors*) que atuam como PRRs nas respostas imunes inatas contra vários patógenos (Alberts *et al.*, 2017).

A estrutura conservada dos TLRs, além do ectodomínio rico em repetições de leucina (*leucine-rich repeat domain* - LRR), é composta também por um segmento transmembrana e um citosólico chamado Toll/receptor de IL-1 (TIR). Os PAMPs interagem com os LRRs,

fazendo com que os TLRs sofram homo ou heterodimerização, iniciando sua ativação (Fekonja, Avbelj e Kerala, 2012). A maioria dos TLRs forma homodímeros, com algumas exceções como o TLR-2 que forma heterodímeros com TLR-1 ou TLR-6, permitindo o reconhecimento diferencial de lipopeptídeos (Lee, Avalos e Ploegh, 2012).

A Figura 2 mostra em (A) a estrutura do TLR-3 humano (verde), com uma molécula de RNA de fita dupla (dsRNA, azul) ligada. O receptor é um homodímero da membrana dos endossomos. A ligação da dsRNA aos dois domínios em forma de ferradura no lado luminal do endossomo aproxima os dois domínios citosólicos, permitindo que as proteínas adaptadoras do citosol se reúnam em um grande complexo de sinalização (não apresentado). Em (B) Estrutura cristalina do domínio luminal do receptor que contém 23 repetições ricas em leucina convencionais, cada uma contribuindo para uma fita b da folha b (vermelho) contínua que reveste a superfície côncava da estrutura (Alberts *et al.*, 2017).

Figura 2 - Em (A) a estrutura do TLR-3 humano. Em (B) estrutura cristalina do domínio



Fonte: Alberts *et al.*, 2017

A classificação e expressão dos TLRs difere entre espécies. Ao todo 13 receptores foram descritos em camundongos e 10 em humanos, sendo na sua maioria homólogos. O Quadro 1 resume os ligantes conhecidos de cada TLR.

Quadro 1 - Classificação dos TLRs humanos e murinos e seus ligantes naturais

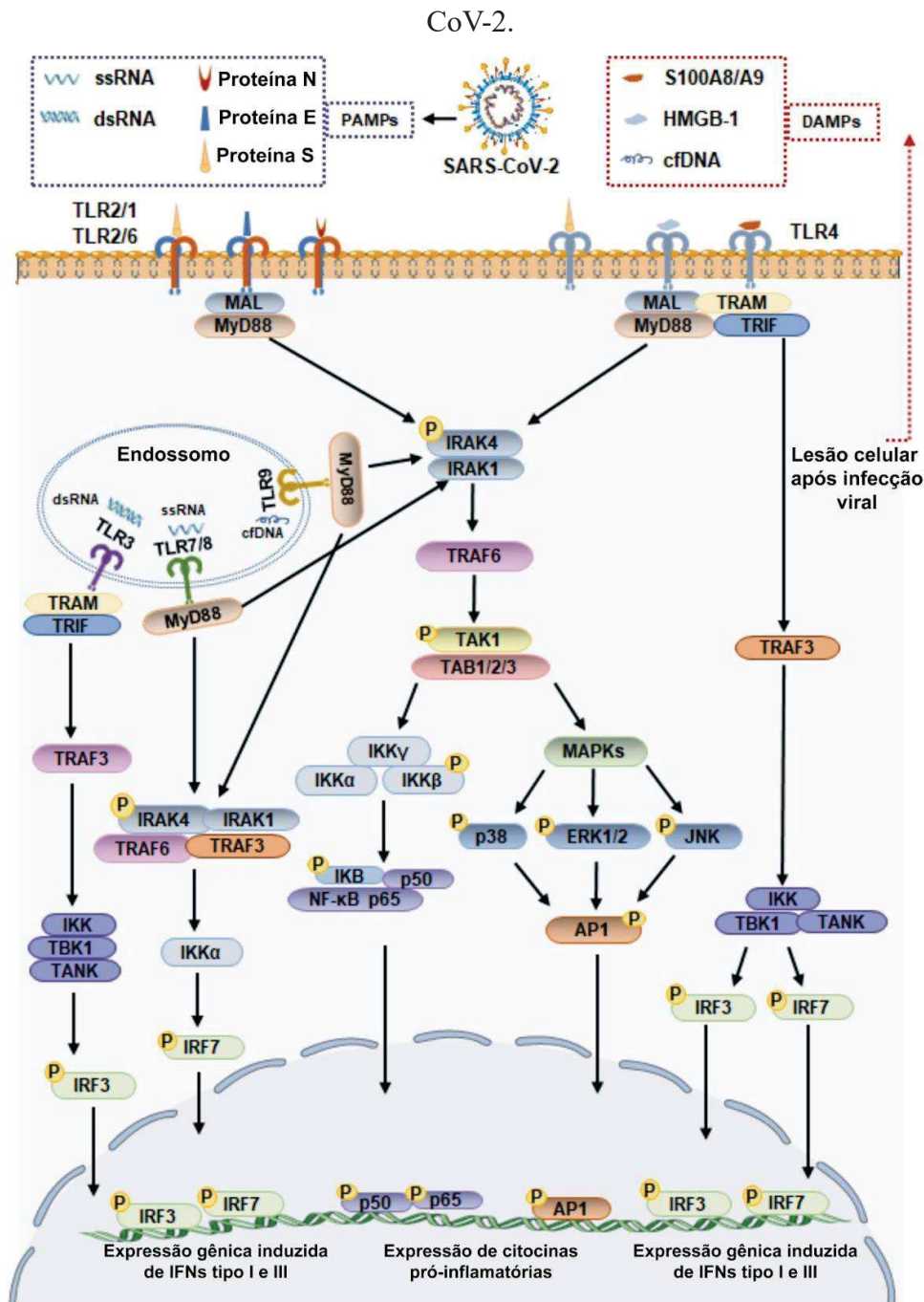
Classificação	Nome do TLR	Localização do gene	Ligantes	Referência
TLRs de superfície celular	TLR-1	5C3.1 (camundongo)/4p14 (humano)	Lipopeptídeos triacetilados, lipoarabinomana	Yu e Feng, 2018; Su <i>et al.</i> , 2019
	TLR-2	3E3 (camundongo)/4q31.3 (humano)	Zymosan, peptideoglicano, ácido lipoteóico, HSPs endógenas, HMGB1, gp96	Patidar <i>et al.</i> , 2018; Yu e Feng, 2018
	TLR-4	4C1 (camundongo)/9q33.1 (humano)	LPS, HSPs endógenas, HMGB1, β -defensina-2	Vaure e Liu, 2014; Patidar <i>et al.</i> , 2018
	TLR-5	1H5 (camundongo)/1q41 (humano)	Flagelina	Yang e Yan, 2017
	TLR-6	5C3.1 (camundongo)/4p14 (humano)	Lipopeptídeos diacetilados, zymosan, ácido lipoteóico	Yu e Feng, 2018
	TLR-10	4p14 (humanos)	Desconhecido	Kawasaki e Kawai, 2014
TLRs intracelulares	TLR-3	8B1.1 (camundongo)/4q35.1 (humano)	dsRNA	Turton <i>et al.</i> , 2020
	TLR-7	XF5 (camundongo)/Xp22.2 (humano)	ssRNA	Tanji <i>et al.</i> , 2013
	TLR-8	XF5 (camundongo)/Xp22.2 (humano)	ssRNA	Tanji <i>et al.</i> , 2013
	TLR-9	9F1 (camundongo)/3p21.2 (humano)	DNA CpG não-metilado, DNA 5'-xCx	Ohto <i>et al.</i> , 2018
	TLR-11	11C1 (camundongo)	Profilina de <i>Toxoplasma gondii</i>	Lester e Li, 2014
	TLR-12	4D2.2 (camundongo)	Profilina de <i>Toxoplasma gondii</i>	Lester e Li, 2014
	TLR-13	XD (camundongo)	RNA ribossomal 23S bacteriano	Oldenburg <i>et al.</i> , 2012

Fonte: Dai *et al.*, 2022. Traduzido pelo autor.

O acoplamento dos TLRs a seus ligantes induz uma cascata de sinalização por duas vias distintas. A primeira é dependente do fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88, do inglês *myeloid differentiation primary response 88*) e a segunda é a via dependente da molécula adaptador indutor de Interferon- β contendo domínio TIR - TRIF (do inglês *TIR domain-*

containing adapter inducing interferon- β). Ambas induzem a síntese de citocinas pró-inflamatórias e a transcrição de genes estimulados por IFN (Takeda e Akira, 2005 *apud* Kim *et al.*, 2018). Enquanto MyD88 é utilizada por TLR-2, TLR-5, TLR-7, TLR-8 e TLR-9, TRIF é utilizada por TLR-3. TLR-4 usa tanto MyD88 quanto TRIF (Ahmed *et al.*, 2013 *apud* Kim *et al.*, 2018). A Figura 3 apresenta as vias iniciadas pela ativação dos TLRs em um contexto de infecção celular por SARS-CoV-2.

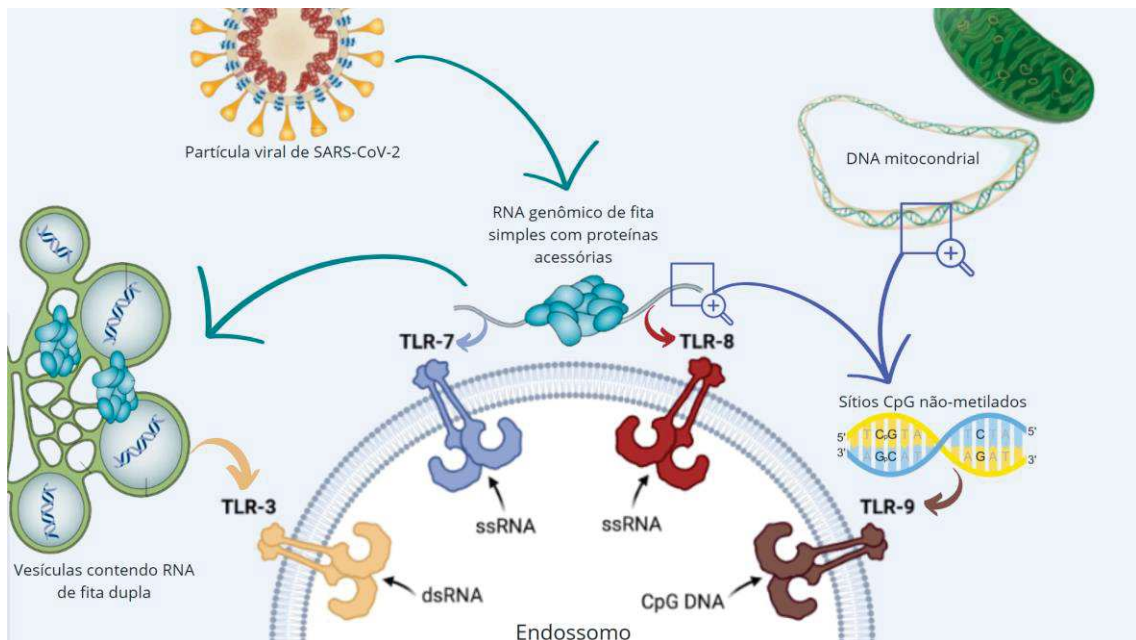
Figura 3 - Respostas antiviral e inflamatória mediadas por TLRs durante infecção por SARS-CoV-2.



1.2.3. TLRs intracelulares

Essa classe de TLRs é capaz de reconhecer ácidos nucleicos derivados de patógenos exógenos e próprios (no contexto de algumas doenças autoimunes). TLRs endossomais evoluíram sob forte seleção purificadora na espécie humana, fazendo com que suas sequências de DNA não acumulassem mutações deletérias ao longo das gerações. Isso ocorre em grande parte graças a seu papel não-redundante na preservação da adaptabilidade dos indivíduos (Barreiro *et al.*, 2009). A Figura 4 é uma esquematização do que cada um dos TLRs endossomais reconhece no contexto de uma infecção por SARS-CoV-2.

Figura 4: TLRs endossomais e seus principais ligantes



Fonte: Elaborado pelo autor

O TLR-3 é amplamente distribuído em várias células epiteliais, fibroblastos, neurônios e células imunológicas. Ele reconhece principalmente RNA de fita dupla viral, RNAs próprios derivados de células danificadas e RNAs de fita simples - intermediários da replicação de vírus RNA fita simples ou vírus DNA (Turton *et al.*, 2020 *apud* Dai *et al.*, 2022).

O TLR-7 está localizado nos endossomos e é majoritariamente expresso por linfócitos-B, monócitos e células dendríticas plasmocitoides, enquanto a expressão do TLR-8 está associada a células dendríticas convencionais. Tanto TLR-7 quanto TLR-8 reconhecem RNA de fita simples e ativam as vias dependentes de MyD88, levando à produção subsequente de

Interferons tipo 1 e citocinas inflamatórias (Kawai e Akira, 2011; Jung e Lee, 2021 *apud* Dai *et al.*, 2022).

O TLR-9 reconhece sítios CpG de DNA não metilados, frequentemente presentes em DNA viral e bacteriano. Além disso, o TLR-9 também se liga a sequências de DNA que contêm uma citosina na segunda posição a partir de 5' (DNA 5' xCx), o que cooperativamente promove a dimerização e ativação de TLR-9 na presença de DNA CpG (Ohto *et al.*, 2018 *apud* Dai *et al.*, 2022).

1.3. POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPs)

1.3.1. Características gerais

A conclusão do Projeto Genoma Humano gerou grande entusiasmo e oportunidades nas ciências da saúde, trazendo as ferramentas necessárias para entender a base genética da diversidade entre indivíduos, os traços familiares mais comuns, processos evolutivos, doenças comuns e complexas, bem como para desenvolver medicamentos baseados no genoma. Cientistas costumam afirmar que ao comparar os genomas de duas pessoas selecionadas aleatoriamente seria encontrada uma variação de 0,1%, que surgem justamente em decorrência de mutações (Emilien *et al.*, 2001).

SNPs são posições individuais de nucleotídeos no genoma que variam em níveis polimórficos nas populações humanas. A maioria dos SNPs é bialélica, isto é, a posição do SNP pode ser ocupada por quaisquer duas bases nitrogenadas, e a base menos comum deve ter uma frequência de pelo menos 1%, ou deixará de ser considerada um polimorfismo e será considerada uma mutação rara. Os SNPs representam a forma mais abundante de variação genética em humanos, responsáveis por mais de 90% das diferenças entre pessoas não aparentadas, mas podem também estar relacionados à suscetibilidade a doenças, como também podem alterar a resposta do organismo a medicamentos e outros xenobióticos (Twyman, 2009).

Assim, estima-se que SNPs ocorram a uma frequência de um (1) em 1000 pares de base através do genoma, sendo 50% deles em regiões não codificadoras, 25% levam a mutações com alteração do aminoácido e 25% correspondem a mutações silenciosas (Halushka *et al.*, 1999).

Apesar de vários deles afetarem a função de genes, muitos não são deletérios aos organismos e devem ter escapado à pressão seletiva. A fim de identificar SNPs, diversas

organizações públicas e privadas vêm investindo esforços para desenvolver métodos de genotipagem com alto índice de resultados nos últimos 20 anos. Como resultado, uma ampla coleção de SNPs do Projeto Genoma Humano está disponível no site do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). (Shastry, 2007). Nos genes que codificam TLRs são encontrados diversos SNPs, incluindo os descritos a seguir.

1.3.2. *rs3775291*

Esse polimorfismo ocorre na região codificadora do gene *TLR3* e é citado no banco de dados do NCBI com três alelos possíveis: **C>*G* e **C>*T*. O gene está localizado no cromossomo 4 (posição 4q35.1). O Projeto ALFA cita o alelo **C* como de referência, tendo frequência mundial de 0,716539, enquanto o alelo **T* tem frequência mundial de 0,283461. É considerado uma variação não-sinônima (ou *missense*). A troca de **C* para **G* na sequência nucleotídica modifica o códon de CTC para GTC, fazendo com que a proteína sintetizada na tradução contenha uma leucina no lugar de valina. A troca de **C* para **T* muda o códon de CTC para TTC, resultando na incorporação de uma fenilalanina à proteína.

1.3.3. *rs179008*

Esse SNP está localizado na região codificadora do gene *TLR7*. Tal gene está localizado no cromossomo X (posição Xp22.2). O NCBI considera três alelos possíveis: **A>*C* e **A>*T*. O Projeto ALFA caracteriza o alelo **A* como de referência, com frequência mundial de 0,80022 e o alelo **T* com frequência mundial de 0,19978. É uma variação não-sinônima, já que a troca de **A* para **C* modifica o códon de CAA para CCA, ocasionando a incorporação de uma prolina no lugar de uma glutamina na proteína final. A troca de **A* para **T* modifica o códon de CAA para CTA, fazendo com que uma leucina seja incorporada à proteína.

1.3.4. *rs3764880*

Esse polimorfismo é encontrado na região codificadora do gene *TLR8*. Esse gene também se encontra no cromossomo X (posição Xp22.2). O NCBI aponta três alelos possíveis: **A>*G* e **A>*T*. O Projeto ALFA considera o alelo *A* como de referência, sendo sua frequência mundial 0,706278, enquanto o alelo *G* ocorre mundialmente a uma frequência de 0,293722.

Esse SNP é uma variação não sinônima em códon de iniciação: a troca de **A* para **G* transforma o códon de iniciação ATG em GTG ou em TTG, modificando o ponto de início da tradução na síntese proteica.

1.3.5. *rs352140*

Esse SNP ocorre na região codificadora do gene *TLR9*, sendo reportados quatro alelos no NCBI: **C>*A*, **C>*G* e **C>*T*. O gene é encontrado no cromossomo 3 (posição 3p21.2). O Projeto ALFA tem o alelo **C* como de referência, sendo sua frequência mundial 0.480083 e as frequências mundiais dos alelos **A* 0.000007 e **T* 0.519910. Esse polimorfismo é uma variação sinônima: os códons CCG, CCT, CCA e CCC codificam para prolina.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo geral

Avaliar a associação de alelos específicos dos polimorfismos *rs3775291*, *rs179008*, *rs3764880* e *rs352140* – localizados nos genes *TLR3*, *TLR7*, *TLR8* e *TLR9*, respectivamente - com desfechos clínicos observados em pacientes brasileiros hospitalizados por COVID-19.

1.4.2. Objetivos específicos

Processar as amostras de sangue dos pacientes, armazenando-as corretamente no biobanco do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE);

Otimizar o protocolo de extração de DNA genômico de leucócitos;

Construir um banco de dados com as informações clínicas, epidemiológicas e demográficas dos pacientes envolvidos no estudo a partir de seus respectivos prontuários médicos;

Conhecer a composição alélica e genotípica dos quatro SNPs em uma amostra da população brasileira;

Avaliar se os *loci* estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e determinar o desequilíbrio de ligação dos polimorfismos localizados no cromossomo X (*rs179008* e *rs3764880*);

Investigar a associação dos SNPs com os seguintes desfechos clínicos: óbito por COVID-19, alterações neurológicas, ventilação mecânica, sepse, comprometimento pulmonar e tromboembolismo, discutindo os resultados encontrados com base na literatura científica.

1.5. JUSTIFICATIVA

Os efeitos da COVID-19 diferem substancialmente não apenas entre pacientes, mas também entre populações de diferentes ancestralidades. Para identificar a infecção viral, o sistema imune inato emprega uma variedade de PRRs enquanto macrófagos alveolares defendem o lúmen do trato respiratório, servindo como primeira linha de defesa (Srivastava e Hollenbach, 2023). Os TLRs intracelulares desempenham um papel chave no combate a infecções e controle imune e polimorfismos que ocorrem em seus genes codificadores têm papel direto em suas conformações e expressões. Antes da pandemia de COVID-19 diversos estudos se debruçaram sobre a influência exercida por polimorfismos em TLRs em doenças que acometem os pulmões como gripe, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e pneumonia, algo que só ganhou força quando as infecções por SARS-CoV-2 chegaram a níveis pandêmicos.

Dessa maneira, a realização de um trabalho investigando SNPs em tais genes na população brasileira é de grande relevância, já que pode auxiliar na melhor compreensão da fisiopatologia da doença, potencialmente contribuindo para melhorar o prognóstico de pacientes acometidos pela COVID-19.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA

O banco de amostras utilizado incluiu 127 pacientes admitidos ao Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC) por COVID-19 de setembro de 2020 a outubro de 2021. Todos foram submetidos a testagem para SARS-CoV-2 apresentando resultado positivo e sofreram complicações em decorrência da infecção, o que culminou em hospitalização e na sua categorização como pacientes de COVID-19 severa.

Foram incluídos na amostra indivíduos que apresentaram pelo menos um dos seguintes critérios: taxa respiratória ≥ 30 /min; saturação em ar ambiente $< 93\%$; $P_{A_{O_2}}/F_{i_{O_2}} < 300$ mmHg; progressão da doença nos pulmões $> 50\%$, demonstrada em tomografia computadorizada; insuficiência respiratória e necessidade de ventilação mecânica; choque; falência de outros órgãos que não o pulmão e requerimento de terapia intensiva. Foram excluídos indivíduos de nacionalidades diferentes da brasileira.

A anuência em participar da pesquisa foi obtida de familiares dos pacientes devido à dificuldade de obtenção direta, tendo em vista a internação da maioria em unidade de terapia intensiva (UTI) e a rotina atribulada do hospital nos momentos da pandemia. Uma cópia do modelo de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) utilizado está disponível no Anexo A. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina sob parecer número 4.164.291.

2.2. OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO

Amostras biológicas de tecido sanguíneo foram coletadas pela equipe de enfermagem do HU-UFSC de 2020 a 2022. O sangue foi temporariamente armazenado em tubos para coleta de sangue à vácuo jateados com EDTA K2 (ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico), um anticoagulante conhecido por remover o cálcio do sangue por complexação, mantendo a morfologia celular. Os tubos foram transportados até o LAPOGE, onde foram centrifugados a fim de separar a camada de células brancas (*buffy-coat* ou anel leucocitário) do sangue total.

A extração de DNA genômico foi realizada seguindo o método salting-out, descrito por Miller et al. (1988) modificado por Lahiri e Nurnberger (1991). O DNA extraído foi

quantificado e teve seus parâmetros de pureza avaliados em NanoDrop, passando a integrar o banco do LAPOGE.

2.3. GENOTIPAGEM POR qPCR

As amostras de DNA foram genotipadas para os SNPs de interesse utilizando a técnica de qPCR. Novais e Pires-Alves (2004) explicam que a maior vantagem desse método é a possibilidade de quantificação do DNA junto com a amplificação. A qPCR realiza a quantificação dos ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, já que determina valores durante a fase exponencial da reação.

O protocolo seguido nesse trabalho foi o de marcação por sondas de hidrólise TaqMan®, cujas sequências e fluoróforos estão no Quadro 2, abaixo. As sondas de hidrólise apresentam em uma extremidade um fluoróforo e na outra um *quencher* (molécula que captura energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Inicialmente, a sonda não emite nenhuma fluorescência detectável, pois o *quencher* não permite. Durante a amplificação, a Taq DNA Polimerase encontra a sonda hibridizada à fita de DNA e a cliva, separando o fluoróforo do *quencher* e permitindo que ele emita fluorescência detectável.

Quadro 2: Códigos reference SNP e sequências nucleotídicas das sondas de hidrólise utilizadas nas reações de genotipagem

SNP	Sequência [VIC®/ FAM™]
<i>rs3775291</i>	5'-ACTTGCTCATTCTCCCTTACACATA[T/C]TCAACCTAACCAAGAATAAAAATCTC-3'
<i>rs179008</i>	5'-TTTCCAATGTGGACACTGAAGAGAC[A/T]AATTCTTATCCTTTTTAACATAATC-3'
<i>rs3764880</i>	5'-AATGAAAAATTAGAACAACAGAAAC[A/G]TGGTAAGCCACTTCTATTTCTTTAG-3'
<i>rs352140</i>	5'-AGCTGAGGTCCAGGGCCTCCAGTCG[C/T]GGTAGCTCCGTGAATGAGTGCTCGT-3'

Fonte: elaborado pelo autor com informações do *site* da fabricante

VIC® emite seu máximo de fluorescência no comprimento de onda 554nm, enquanto FAM™ o faz em 518nm (ATDBIO, 2021). É a captação de fluorescência em dois comprimentos de onda diferentes que permite ao sistema detectar o alelo da amostra, uma vez que as sondas de hidrólise são altamente específicas e só emitem fluorescência caso encontrem sua sequência complementar. Isso acontecerá somente na fita antisenso (3'→5'), já que as sondas são

sintetizadas como 5'→3'. Dessa maneira, o alelo da amostra é correspondente à base incorporada à sonda. A Figura 4 ilustra a organização do sistema.

Figura 5: Esquematização de um sistema de qPCR com sonda de hidrólise



Fonte: Leal *et al.*, 2019

A sequência de trabalho compreendeu a preparação de um mix de trabalho, contendo os reagentes e quantidades especificados na Tabela 1, que foi distribuído em microplaca com 96 poços. Após a distribuição desse mix, uma alíquota de DNA foi adicionada aos poços. Os ensaios foram realizados no sistema de qPCR QuantStudio™ 3 da *Thermo Fisher Scientific* e analisadas no *software* QuantStudio Design & Analysis v.1.5.2, de propriedade da mesma empresa. O programa de amplificação foi o seguinte:

1 ciclo: 60°C por 30min;

1 ciclo: 95°C por 10min;

50 ciclos: 92°C por 15min, 60°C por 1min30s

1 ciclo: 60°C por 30min.

Tabela 1: Componentes utilizados no mix de trabalho e seus respectivos volumes

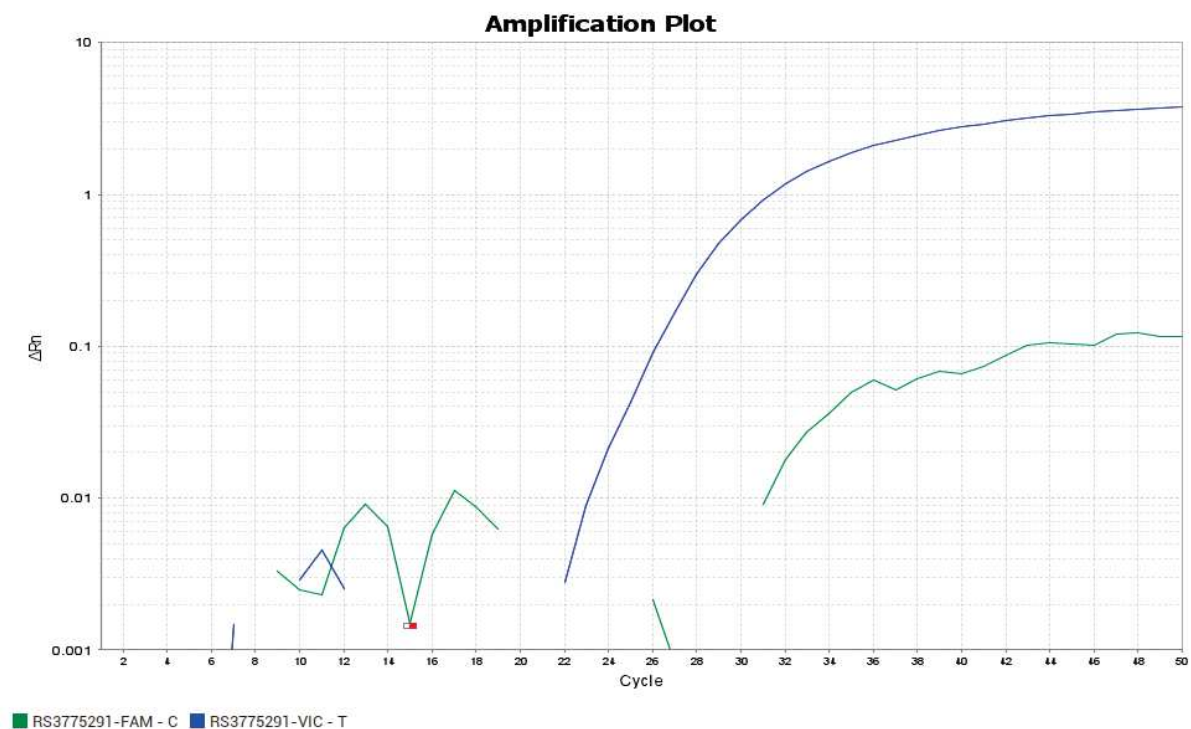
Reagente	Volume (1x)
TaqMan® Genotyping Master Mix	2,5 µL
Sonda TaqMan® C__1839697_20	0,125 µL
Água ultrapura estéril	2,375 µL
DNA	1 µL
Volume final	6 µL

µL: Microlitros; DNA: Ácido desoxirribonucleico. Fonte: elaborada pelo autor

O Master Mix utilizado nesse protocolo contém DNA Polimerase AmpliTaq Gold®, desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), corante de referência passiva ROX™ e uma solução tampão composta para otimização da fluorescência final, discriminação alélica reprodutível e estabilidade do produto. O corante ROX™ é uma referência interna utilizada pelos sistemas de detecção da *Applied Biosystems* para normalizar a fluorescência da sonda de hidrólise. Esse processo é necessário para corrigir flutuações na fluorescência causadas por mudanças na concentração ou volume (APPLIED BIOSYSTEMS, 2007).

A Figura 5 foi obtida do *software* de análise dos resultados, compreendendo um dos gráficos gerados pelo programa. No eixo X está o número de ciclos e no eixo Y o ΔRn , magnitude do sinal de fluorescência normalizado, relativo à fluorescência basal, gerado pelo fluoróforo repórter a cada ciclo da amplificação. Cada uma das sondas utilizadas nos ensaios possuía um padrão de curva distinto - na imagem é possível observar uma amostra *TT para o SNP *rs3775291*, sendo significativa apenas a curva gerada pela fluorescência de VIC®.

Figura 6: Curva de amplificação de uma das amostras utilizadas no trabalho



Fonte: elaborada pelo autor

2.3. COLETA DE DADOS

A coleta das informações clínicas, epidemiológicas e demográficas dos pacientes envolvidos no estudo ocorreu ao longo de 2021 a 2023. Foram consultados os prontuários médicos de cada paciente, mantidos no arquivo do HU-UFSC e construído um banco de dados que reuniu informações referentes a exames e avaliações feitas pela equipe de saúde aos quais os pacientes eram submetidos durante a internação. Em foco nesse trabalho estão os desfechos clínicos, eventos que acometeram os pacientes em alta frequência. Com base em estudos prévios e nas informações observadas nos prontuários, foram determinados seis desfechos mais relevantes.

- Óbito por COVID-19: pacientes cuja causa da morte confirmada no atestado de óbito foi a infecção por COVID-19 e as complicações trazidas por essa;
- Alterações neurológicas: pacientes que apresentaram transtornos neurológicos graves, como déficit neurológico focal, acidente vascular cerebral arterial ou venoso, encefalite ou mielite aguda. Não foram considerados sintomas neurológicos brandos, como disgeusia, anosmia e cefaleia.
- Ventilação mecânica: pacientes que necessitaram de aporte de oxigênio via intubação;
- Sepses: pacientes que foram acometidos por infecção generalizada durante a internação;
- Comprometimento pulmonar: pacientes cujos pulmões tiveram pelo menos 50% de área comprometida, atestada por tomografia computadorizada;
- Tromboembolismo pulmonar: pacientes nos quais foram observados coágulos bloqueando vasos pulmonares e prejudicando a respiração.

2.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas por contagem direta. Os desvios das frequências observadas em relação às esperadas foi observado para cálculo do EHW. Os alelos dos SNPs *rs179008* e *rs3764880* foram submetidos à verificação de desequilíbrio de ligação. Essas análises foram realizadas no *software* Plink v.1.9. As associações dos desfechos clínicos com os SNPs de interesse foram avaliadas por regressão de Poisson, sendo cada um transformado em uma variável categórica. Nessa análise os desfechos são as variáveis de

resposta e os alelos dos SNPs as variáveis preditoras. O modelo assume que o logaritmo do valor esperado da variável de resposta segue uma relação linear com as variáveis preditoras. As determinações de frequências genóticas e as análises de associação genética foram realizadas no *software* SPSS v.25.

Após a realização das análises de associação com cada genótipo dos quatro SNPs, esses foram agrupados por alelo para aumentar o poder estatístico, sendo apresentados nesse trabalho apenas os resultados referentes a essas análises. O agrupamento de *rs3775291*, *rs179008* e *rs3764480*, foi feito agregando os genótipos que continham o alelo responsável por modificar a proteína, confrontando com o genótipo contendo o alelo que não modifica. Por exemplo, se os dois alelos do SNP são **T* e **C*, sendo **T* o que modifica a proteína, o agrupamento ficou **T_ vs *CC*. Nesses três SNPs o alelo agrupado também era o de menor frequência na população. No caso de *rs352140*, por ocasionar uma variação sinônima, o agrupamento foi feito com base no trabalho de Ding *et al.* (2024), unindo pacientes **T_* e confrontando com **CC*.

Nas análises de regressão de Poisson foram obtidos valores de *p*, razão de prevalência (RP) e seus respectivos intervalos de confiança com 95% de confiabilidade (IC). Em todas as análises foram considerados significativos valores de *p* menores que 0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A Tabela 2 resume os dados mais relevantes observados na amostra que compõe esse estudo. A composição majoritariamente masculina pode ser explicada pelo risco elevado de complicações em indivíduos do sexo masculino, amplamente citada na literatura científica e primeiro observada por Xie *et al.* (2020). Chama atenção também a alta prevalência de indivíduos com pelo menos uma comorbidade, fato reportado pelos mesmos autores citados anteriormente. A idade média dos pacientes estudados é 54 anos e de acordo com a média de índices de massa corporal (IMCs), ao levar em conta o desvio padrão, as categorias de peso predominantes são sobrepeso e obesidade classe I.

Tabela 2: Informações da amostra estudada

Variáveis		n (%)	Média (desvio padrão)	Valor mínimo	Valor máximo
Sexo ao nascimento	Feminino	50 (39,1)			
	Masculino	78 (60,9)			
Hábito tabagista	Ausente	60 (57,1)			
	Presente	45 (42,9)			
Hábito etilista	Ausente	54 (62,8)			
	Presente	32 (37,2)			
Comorbidades	Sem	35 (27,3)			
	Com	93 (72,7)			
Idade			54 (15)	20	90
IMC			30.56 (6,44)	18,30	58,30

n: Tamanho amostral; IMC: Índice de massa corporal. Fonte: elaborada pelo autor

A alta taxa de casos graves de COVID-19 em indivíduos do sexo masculino pode ser explicada por vários fatores, biológicos e sociais. Um deles diz respeito à imunidade inata: o TLR-7 é mais expresso em indivíduos do sexo feminino, uma vez que o gene que o codifica escapa da inativação do cromossomo X e dá a esses indivíduos duas cópias, contrastando com apenas uma em indivíduos do sexo masculino (Pisitkun *et al.*, 2006 *apud* Fabião *et al.*, 2022). A resposta iniciada pelo TLR-7 também é diferente em indivíduos do sexo feminino: a produção de IFN- α é maior e os níveis basais do fator regulatório de IFN 5 (IRF5) são maiores nas células dendríticas plasmocitoides (Griesbeck *et al.* 2015 *apud* Fabião *et al.*, 2022).

Diversos estudos já observaram que a regulação de ACE-2 é sexualmente dimórfica. Trabalhos como o de Viveiros e colaboradores (2022) revelam que a expressão do principal receptor responsável pela entrada do SARS-CoV-2 no organismo é maior em indivíduos do sexo masculino. São conhecidas também diferenças ligadas ao sexo nos genes dos antígenos leucocitários humanos (HLAs) e nos genes dos receptores de IL-4, IL-10 e IL-12, sendo associadas à resposta diferencial a vacinas. Nesses casos o envolvimento hormonal está potencialmente implicado (Klein e Flanagan, 2016 *apud* Fabião *et al.*, 2022).

Os efeitos hormonais *per se*, entretanto, parecem não ser significativos para explicar a gravidade da doença em indivíduos do sexo masculino. Se maiores níveis de testosterona fossem o único fator responsável pelas diferenças sexuais nos desfechos da COVID-19, uma diminuição na magnitude da associação seria esperada conforme os pacientes envelhecem, já que a produção de testosterona diminui com a idade. Além disso, se o estrogênio fosse protetivo, a diferença entre os sexos diminuiria com a idade, o que não acontece (Fabião *et al.*, 2022).

Em homens mais jovens a testosterona pode ter implicações na severidade da doença, enquanto em homens mais velhos outros fatores como maior prevalência de obesidade, diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares sobrepõem a possível proteção conferida pela menor produção de testosterona. Em segundo lugar e, mais provavelmente, outras teorias em adição ao efeito da testosterona explicam os desfechos piores em homens: homens são mais propensos a fumar e beber do que mulheres; hipertensão e doenças cardiovasculares são mais prevalentes em homens; mulheres tendem a ter atitudes mais responsáveis em relação à COVID-19 do que homens (Fabião *et al.*, 2022).

Outra característica da amostra foi a maior prevalência de indivíduos portadores de comorbidades. Desde o começo da pandemia a comunidade científica se debruça sobre os efeitos de comorbidades na severidade da COVID-19 e a revisão sistemática mais recente sobre o assunto, feita por Russel, Lone e Baillie (2023) explica esses efeitos em cada fase da doença. A Tabela 3 mostra algumas comorbidades que foram observadas na amostra, sendo possível observar altas incidências de hipertensão, diabetes e cardiopatias.

No momento inicial da infecção são citadas como comorbidades de especial importância a imunossupressão e doenças cardiovasculares. A primeira por ter relação direta com a entrada do SARS-CoV-2 – indivíduos com sistema imune enfraquecido têm mais dificuldade em evitar a entrada do patógeno no organismo. A segunda pode ser dividida em hipertensão e doença arterial coronariana (DAC) (Russel, Leonel e Baillie, 2023).

Tabela 3: Comorbidades frequentemente associadas à progressão ruim da COVID-19 observadas na amostra

Condição		n (%)
Cardiopatia	Ausente	62 (48,8)
	Presente	65 (51,2)
Doença autoimune	Ausente	118 (92,9)
	Presente	9 (7,1)
Obesidade	Ausente	81 (63,8)
	Presente	46 (36,2)
Diabetes	Ausente	92 (72,4)
	Presente	35 (27,6)
Colesterol elevado	Ausente	117 (92,1)
	Presente	10 (7,9)
AVC ou aneurisma	Ausente	121 (95,3)
	Presente	6 (4,7)
Coagulopatia	Ausente	124 (97,6)
	Presente	3 (2,4)
Hipertensão	Ausente	67 (52,8)
	Presente	60 (47,2)

n: Tamanho amostral. Fonte: elaborada pelo autor

A hipertensão está relacionada à disfunção endotelial e dano vascular, que são exacerbados pelo vírus e levam à formação de coágulos e dificuldade no transporte de oxigênio, por exemplo. Pacientes com DAC já apresentam as artérias coronárias obstruídas, e como o SARS-CoV-2 infecta células musculares cardíacas a combinação dos dois é extremamente danosa (Russel, Lone e Baillie, 2023).

Na fase inflamatória da COVID-19 é de especial interesse a DPOC, cujos pacientes já apresentam função pulmonar comprometida graças a danos e inflamação crônicos, fazendo com que presença do SARS-CoV-2 exacerbe esse cenário. A diabetes também é citada nessa fase, já que a hiperglicemia afeta a resposta imune e promove inflamação, além de piorar danos ao pulmão. A obesidade também está envolvida nessa etapa da doença, já que o tecido adiposo produz moléculas inflamatórias (Russel, Lone e Baillie, 2023).

Na fase pós-inflamatória são consideradas comorbidades doenças neurológicas, como demência ou acidente vascular cerebral (AVC). Essas condições podem levar a danos cognitivos e sintomas neurológicos persistentes mesmo após a infecção viral, já que o SARS-CoV-2 afeta diretamente células do sistema nervoso. Além disso pacientes de doenças autoimunes podem

ter sintomas prolongados e sequelas específicas, já que seus sistemas imunes já estavam desregulados mesmo antes da infecção (Russel, Lone e Baillie, 2023).

A terceira característica observada na amostra foi a maior prevalência de indivíduos com IMCs maiores do que 30, comumente considerados obesos ou com sobrepeso. Possíveis explicações para isso incluem, além do já citado estado inflamatório promovido pelos adipócitos, o prejuízo na expansão diafragmática, que ocasiona aumento do chamado espaço morto anatômico. A expansão prejudicada do diafragma faz com que mais ar seja retido nas vias aéreas, impedindo-o de participar das trocas gasosas e complicando a ventilação. Ademais, adipócitos expressam mais receptores ACE-2, o que potencialmente contribui para aumento da carga viral em indivíduos obesos (Ho *et al.*, 2020).

A utilização do IMC como critério para diagnóstico de obesidade e sobrepeso, entretanto, é questionada. Essa métrica, idealizada por Adolphe Quetelet em 1830 levando em conta a população belga, não reflete veridicamente o status de saúde de um paciente. IMCs altos podem refletir a alta massa de tecido muscular em lutadores, por exemplo (Humphreys, 2010).

3.2. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ASSOCIAÇÕES GENÉTICAS

A amostra cumpre os requisitos do EHW para os quatro *loci* estudados. Os valores de p dos SNPs *rs3775291*, *rs179008*, *rs3764880* e *rs352140* foram, respectivamente 0,57; 0,99; 0,16 e 0,63. Os dois SNPs localizados no cromossomo X (*rs179008* e *rs3764880*) não estão em desequilíbrio de ligação ($D'=0,3$). A Tabela 4 reúne as frequências genotípicas de cada um dos genótipos dos quatro SNPs estudados na amostra de 127 pacientes estudada.

A Tabela 5 compila as frequências genotípicas de acordo com o agrupamento de alelos feito para as análises estatísticas e estratifica-as por desfecho clínico. A Tabela 6 mostra os resultados das análises de regressão de Poisson associando os SNPs aos desfechos clínicos analisados. A Tabela 7 também apresenta resultados de regressão de Poisson, porém apenas para os polimorfismos localizados no cromossomo X, estratificando os resultados por sexo ao nascimento dos indivíduos que compõem a amostra.

Tabela 4: Frequências genotípicas dos SNPs estudados na amostra

SNP	Genótipo	Frequência (n)	Frequência (%)
<i>rs3775291</i>	*CC	66	51,6
	*TC	50	39,1
	*TT	12	9,4
<i>rs179008</i>	*AA	95	74,2
	*AT	20	15,6
	*TT	13	10,2
<i>rs3764880</i>	*AA	65	50,8
	*AG	17	13,3
	*GG	46	35,9
<i>rs352140</i>	*CC	29	22,7
	*TC	61	47,7
	*TT	38	29,7

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; n: Tamanho amostral. Fonte: elaborada pelo autor

3.2.1. Associação com o polimorfismo *rs3775291*

O TLR-3 é capaz de induzir respostas imunes antivirais contra vírus de RNA e DNA. Na verdade, acredita-se que dentre os TLRs esse receptor seja o mais significativo clinicamente ao considerar sua reação com coronavírus (Vercammen *et al.*, 2008; Totura *et al.*, 2015). A mudança de leucina para fenilalanina (L412F) ocasionada pelo alelo *T no *rs3775291* faz com que esse receptor fique menos ativo no corpo humano, apesar de não modificar a quantidade de transcrito do gene *TLR3*. O que muda é a habilidade do receptor de se ligar a RNA dupla-fita, levando a menor atividade sinalizadora (Habibabidi *et al.*, 2020; Barkhash *et al.*, 2013).

Não foi observada associação significativa do *rs3775291* com nenhum dos desfechos clínicos analisados. Esse resultado vai ao encontro do reportado pelo trabalho de Silva e colaboradores, que avaliou a associação desse SNP com severidade e mortalidade da COVID-19 em pacientes brasileiros de Belém/PA e não encontrou resultados significativos (Silva *et al.*, 2023). A ausência de associação desse SNP com a susceptibilidade a COVID-19 também foi reportada em um estudo caso-controle com a população iraniana (Parsania *et al.*, 2024).

Tabela 5: Frequências genotípicas dos SNPs na amostra estudada agrupadas pelo alelo alternativo e estratificadas por desfecho clínico

SNP		Óbito por COVID-19 (n (%))		Alterações neurológicas (n (%))		Ventilação Mecânica (n (%))		Sepse (n (%))		Comprometimento pulmonar (n (%))		Tromboembolismo (n (%))	
		Não ocorreu	Ocorreu	Ausentes	Presentes	Não necessitou	Necessitou	Não ocorreu	Ocorreu	Ausente	Presente	Ausente	Presente
rs3775291	*CC	49 (75,4)	16 (24,2)	47 (72,3)	18 (27,7)	21 (32,3)	44 (67,7)	47 (72,3)	18 (27,7)	9 (19,1)	38 (80,9)	62 (95,4)	3 (4,5)
	*T ₋	51 (82,3)	11 (17,7)	42 (68,9)	19 (31,1)	20 (34,5)	38 (65,5)	53 (85,5)	9 (14,5)	6 (13,6)	38 (86,4)	56 (90,3)	6 (9,7)
rs179008	*AA	74 (77,9)	21 (22,1)	65 (69,1)	29 (30,9)	29 (31,5)	63 (68,5)	74 (77,9)	21 (22,1)	13 (19,4)	54 (80,6)	89 (93,7)	6 (6,3)
	*T ₋	26 (81,3)	6 (18,8)	24 (75,0)	8 (25)	12 (38,7)	19 (61,3)	26 (81,3)	6 (18,8)	2 (8,3)	22 (91,7)	29 (90,6)	3 (9,4)
rs3764880	*AA	53 (81,5)	12 (18,5)	45 (70,3)	19 (29,7)	24 (38,1)	39 (61,9)	49 (75,4)	16 (24,6)	8 (16,7)	40 (83,3)	58 (89,2)	7 (10,8)
	*G ₋	47 (75,8)	15 (24,2)	44 (71)	18 (29)	17 (28,3)	43 (71,7)	51 (82,3)	11 (17,7)	7 (16,3)	36 (83,7)	60 (96,8)	2 (3,2)
rs352140	*CC	23 (79,3)	6 (20,7)	19 (67,9)	9 (32,1)	8 (28,6)	20 (71,4)	23 (79,3)	6 (20,7)	3 (13,6)	19 (86,4)	28 (96,6)	1 (3,4)
	*T ₋	77 (78,6)	21 (21,4)	70 (71,4)	28 (28,6)	33 (34,7)	62 (65,3)	77 (78,6)	21 (21,4)	12 (17,4)	57 (82,6)	90 (91,8)	8 (8,2)

*A: Adenina; *C: Citosina; *T: Timina; *G: Guanina; COVID-19: *Coronavirus disease 2019*; n: Tamanho amostral; SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único. Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 6: Associações entre os SNPs de interesse e os desfechos clínicos estudados

SNP	Óbito por COVID-19			Alterações neurológicas			Ventilação mecânica			Sepse			Comprometimento pulmonar			Tromboembolismo		
	p	RP	IC	p	RP	IC	p	RP	IC	p	RP	IC	p	RP	IC	p	RP	IC
rs3775291 *T ₋ vs *CC	0,373	0,799	0,487- 1,309	0,665	1,088	0,741- 1,596	0,797	0,950	0,642- 1,404	0,107	0,629	0,357- 1,106	0,507	1,250	0,646- 2,417	0,182	1,405	0,852- 2,315
rs179008 *T ₋ vs *AA	0,693	0,855	0,392- 1,863	0,538	0,802	0,397- 1,618	0,459	0,792	0,426- 1,469	0,693	0,855	0,392- 1,863	0,256	2,171	0,569- 8,270	0,541	1,356	0,510- 3,601
rs3764880 *G ₋ vs *AA	0,408	1,182	0,795- 1,757	0,936	0,984	0,664- 1,456	0,271	1,265	0,832- 1,921	0,373	0,799	0,487- 1,309	0,960	1,015	0,562- 1,832	0,189	0,437	0,127- 1,503
rs352140 *T ₋ vs *CC	0,931	1,010	0,803- 1,269	0,722	0,962	0,778- 1,190	0,529	0,939	0,773- 1,141	0,931	1,010	0,803- 1,269	0,656	0,938	0,705- 1,246	0,234	1,165	0,905- 1,499

*A: Adenina; *C: Citosina; *T: Timina; *G: Guanina; COVID-19: *Coronavirus disease 2019*; n: Tamanho amostral; SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único. p: significância estatística; RP: Razão de prevalências; IC: Intervalo de confiança. Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 7: Associação dos SNPs localizados no cromossomo X com os desfechos clínicos estudados estratificada pelo sexo ao nascimento

SNP	Óbito por COVID-19			Alterações neurológicas			Ventilação mecânica			Sepse			Comprometimento pulmonar			Tromboembolismo		
	<i>p</i>	RP	IC	<i>p</i>	RP	IC	<i>p</i>	RP	IC	<i>p</i>	RP	IC	<i>p</i>	RP	IC	<i>p</i>	RP	IC
<i>rs179008</i> *T ₋ vs *AA (M)	0,493	0,500	0,068- 3,633	0,588	0,667	0,153- 2,888	0,309	0,551	0,174- 1,735	-	-	-	0,964	1,034	0,243- 4,384	0,964	1,034	0,243- 4,384
<i>rs179008</i> *T ₋ vs *AA (F)	0,651	0,837	0,387- 1,810	0,487	0,773	0,375- 1,596	0,624	0,848	0,439- 1,638	0,920	0,964	0,475- 1,955	-	-	-	-	-	-
<i>rs3764880</i> *G ₋ vs *AA (M)	0,654	1,125	0,672- 1,882	0,963	1,011	0,626- 1,634	0,392	1,240	0,758- 2,027	0,879	1,044	0,598- 1,822	0,803	0,929	0,518- 1,664	-	-	-
<i>rs3764880</i> *G ₋ vs *AA (F)	0,382	1,328	0,702- 2,511	0,911	0,963	0,492- 1,880	0,446	1,358	0,618- 2,979	0,218	0,571	0,234- 1,392	-	-	-	0,854	0,900	0,293- 2,764

*A: Adenina; *C: Citosina; *T: Timina; *G: Guanina; COVID-19: *Coronavirus disease 2019*; n: Tamanho amostral; SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único. Fonte: elaborada pelo autor (M): indivíduos nascidos com o sexo masculino; (F): indivíduos nascidos com o sexo feminino; *p*: significância estatística; RP: Razão de prevalências; IC: Intervalo de confiança. Parâmetros marcados com “-“ não foram avaliados pelo programa devido a baixo número de amostras com um dos genótipos.

Fonte: elaborada pelo autor

O trabalho mais abrangente acerca dessa temática foi o realizado por Dhangadamajhi e Rout, que conduziram uma revisão da literatura em 2021 e apontam uma associação do alelo **T* com susceptibilidade e mortalidade por COVID-19, sem observar associação com a porcentagem de recuperação dos pacientes. Esse estudo não foi publicado formalmente em um periódico, estando disponível como uma carta ao editor da revista *Human Cell*.

No mesmo ano, entretanto, Pati e colaboradores publicam uma carta-resposta na mesma revista questionando a metodologia dos autores citados anteriormente. De acordo com esse grupo, o primeiro estudo não levou em conta todos os trabalhos disponíveis e passíveis de serem utilizados, o que culminou na falta de representatividade de ancestralidades. Além disso a análise estatística empregada para testar a associação não teria sido a mais apropriada (Dhangadamajhi e Rout, 2021; Pati *et al.*, 2021).

Levando isso em consideração, foram incluídos mais trabalhos, excluídos alguns que não deveriam ter sido incluídos (como aqueles cujas amostras não estavam em EHW para o *locus* analisado). Após corrigirem o banco e empregarem uma nova metodologia estatística, os autores concluem que não foi observada associação significativa do *rs3775291* com COVID-19 (Pati *et al.*, 2021).

Em contraponto, os resultados publicados por Braga e colaboradores (2023) demonstram associação positiva do alelo **T* com a severidade da COVID-19. Os autores compararam pacientes da região sudeste do Brasil categorizados como graves e não-graves e reportaram que o genótipo **TT* conferiu proteção de 58% para o agravamento da doença.

3.2.2. Associação com o polimorfismo *rs179008*

Esse SNP é um dos localizados no cromossomo X, portanto as análises de associação foram estratificadas entre indivíduos nascidos do sexo masculino e feminino, uma vez que indivíduos do sexo masculino herdam um cromossomo X da mãe, sendo hemizigóticos para genes localizados nesse cromossomo. Essas pessoas, então, podem possuir apenas um dos alelos do SNP e foram identificadas como “homozigotos” nas curvas de amplificação resultantes da qPCR.

A estratificação feita na regressão de Poisson, **T_ vs *AA* compreende a hemizigidade desses casos, pois o agrupamento separa indivíduos do sexo masculino com alelo **T* e alelo **A*. Com relação a indivíduos do sexo feminino, a inativação do cromossomo

X não se demonstrou um problema, uma vez que os genes estudados escapam esse processo (Liu *et al.*, 2020; Benton, 2015 *apud* Youness *et al.*, 2023).

Os genes TLR7 e TLR8 estão localizados a um intervalo de 56 kb no braço curto do cromossomo X. Esses genes são parálogos, tendo se originado de um ancestral autossômico que se duplicou na linhagem dos vertebrados antes da divergência de tetrápodes para peixes, há ~400 milhões de anos. Em mamíferos Eutheria, um dos dois cromossomos X das células de fêmeas é inativado randomicamente durante o começo do desenvolvimento embrionário para equalizar a dosagem da expressão gênica entre os sexos. Cerca de 15 a 23% dos genes ligados ao cromossomo X escapam a inativação em um certo grau (Liu *et al.*, 2020; Benton, 2015 *apud* Youness *et al.*, 2023).

Os trabalhos conduzidos por Souyris e colaboradores (2018) e por Youness e colaboradores (2023) demonstraram que tanto *TLR7* quanto *TLR8* são expressos em ambos os cromossomos X de células imunes precursoras, como linfócitos B primários, monócitos e células dendríticas de indivíduos do sexo feminino. Os grupos avaliaram também indivíduos do sexo masculino portadores da síndrome de Klinefelter, carreadores de dois cromossomos X e um Y e observaram os mesmos resultados. Ambos analisaram adicionalmente a expressão dos genes comparando indivíduos do sexo feminino e portadores da síndrome de Klinefelter com indivíduos do sexo masculino e constataram diferenças que chegavam à magnitude de sete vezes.

A modificação de glicina para leucina (p.Gln11Leu) provocada pelo *rs179008* acontece em um *locus* adjacente à porção N-terminal da cadeia polipeptídica que se tornará o TLR-7, impactando diretamente o peptídeo sinal. A degeneração do peptídeo sinal modula modificações pós-traducionais no receptor, além de localização, quantidade e funcionalidade da proteína afetada (Bernstein 2006 *apud* Askar, Ramadori e Mihm, 2010).

Não foi constatada associação entre esse SNP e os desfechos clínicos avaliados nesse estudo. Na análise estratificada por sexo constatou-se o mesmo. Resultado semelhante foi obtido por Martínez-Gómez e colaboradores, que relataram ausência de associação entre o alelo **T* ou o genótipo **TT* com a severidade da COVID-19 em uma amostra de ancestralidade mexicana (Martínez-Gómez *et al.*, 2023).

Al-Tamimi e colaboradores (2022) relatam associação do genótipo **AA* com severidade da COVID-19 em uma população iraquiana. Esses autores, entretanto, realizaram as análises estatísticas confrontando pacientes com COVID-19 agrupados em casos leves, moderados e severos e seus resultados apenas demonstraram associação quando comparados casos moderados com leves. Como a amostra estudada nesse trabalho é composta por casos graves, o

resultado desse artigo mais comparável com o aqui descrito seria o obtido comparando casos leves com severos, sendo relatada para essa análise ausência de associação.

Em contraponto direto aos resultados aqui apresentados, Minashkin e colaboradores (2022) relatam associação do alelo **T* com severidade da COVID-19, mas não com a susceptibilidade a essa em um estudo feito com a população russa. Parsania e colaboradores (2024) também relatam associação do alelo **T* e do genótipo heterozigoto com a susceptibilidade a COVID-19 em uma amostra iraniana.

Por fim, um dos estudos que avaliou o *rs179008* com a COVID-19 teve a pretensão de testar a susceptibilidade, mas ao coletar amostras do grupo controle o único critério levado em consideração foi a ausência de pneumonia por COVID-19, sendo definidos apenas como indivíduos saudáveis. Não foram realizados testes diagnósticos para infecção por SARS-CoV-2 ou acompanhamentos a longo prazo para monitorar possíveis infecções futuras. Os autores relatam uma associação do alelo **T* e genótipo **TT* com a susceptibilidade à COVID-19 na população egípcia (Aloseudy *et al.*, 2022), mas as inconsistências metodológicas observadas devem ser levadas em consideração na interpretação desse resultado.

3.2.3. Associação com o polimorfismo *rs3764880*

A nível genômico, o *locus* do gene *TLR8* sofre *splicing* alternativo, codificando para duas variantes de transcrito, com sítios de início de tradução alternativos. A contribuição funcional de cada variante iniciar a tradução em um sítio é desconhecida. Ambas compartilham a mesma sequência, com exceção de 19 aminoácidos adicionais na extremidade N-terminal da variante 1 (Chuang e Ulevitch, 2000; Du *et al.*, 2000 *apud* Gantier *et al.*, 2010).

Esse SNP está localizado na região que codifica para a extremidade N-terminal do receptor. Ele modifica o sítio de início da tradução ao trocar o alelo **A* para **G*, consequentemente truncando a proteína. A introdução do alelo **G* aumenta a expressão da variante 1 do *TLR8* e diminui a da variante 2, porém análises *in vitro* dessas variantes demonstraram que não há impacto significativo da extremidade N-terminal do TLR-8 em sua função de ativar NF-κB. Portanto, a introdução do alelo **G*, apesar de ser capaz de modular a expressão das variantes 1 e 2, não impacta diretamente na função bioquímica do receptor (Gantier *et al.*, 2010).

Não foram observadas associações entre o *rs3764880* e os desfechos clínicos da COVID-19 na amostra estudada, mesmo considerando o sexo ao nascimento dos indivíduos

separadamente. Não foram encontrados estudos relevantes na literatura científica que reportassem o mesmo resultado. Alguns grupos estudaram esse SNP e relataram associação positiva, entretanto os resultados devem ser vistos com cautela. Bageci e colaboradores (2023) escrevem que, em indivíduos do sexo feminino, o genótipo *AG e o alelo *G tiveram frequências maiores em pacientes turcos com COVID-19 internados em UTI quando comparados a pacientes não internados. Não foram realizadas análises de associação por regressão, mas sim um teste de qui-quadrado utilizando as frequências.

Camacho-Rea e colaboradores (2024) observaram associação do haplótipo *GGG incluindo os alelos de *rs3764879*, *rs3764880* e *rs3761624* com a severidade da COVID-19 em pacientes mexicanos. Como os SNPs estudados por esse grupo estavam em desequilíbrio de ligação todas as análises foram feitas considerando o efeito dos três polimorfismos em conjunto, não sendo possível afirmar que *rs3764880* tenha associação com a doença isoladamente.

3.2.4. Associação com o polimorfismo *rs352140*

Esse polimorfismo é classificado como uma mutação sinônima, nenhum dos seus alelos modifica a proteína codificada pelo gene *TLR9*. O papel desse SNP na função biológica do TLR-9 ainda não foi elucidado, mas alguns autores hipotetizam sua influência na expressão gênica (Ding *et al.*, 2024). SNPs sinônimos podem afetar o *splicing* do RNA mensageiro (RNAm), sua estabilidade e estrutura e o dobramento da proteína. Tais polimorfismos podem alterar a velocidade da tradução o que impactaria nas estruturas proteicas secundária e terciária (Hunt *et al.*, 2009).

Nesse estudo não foram identificadas associações do *rs352140* com nenhum dos desfechos clínicos analisados. Até o momento não foram publicados artigos avaliando o papel desse polimorfismo na COVID-19, o que torna o resultado aqui descrito original. A ausência de evidências científicas relevantes poderia ser explicada pela falta de interesse nesse SNP específico ou pelo caráter recente da pandemia de COVID-19, ambas sugerindo que esse é um problema que seria solucionado com o tempo.

Para ambas, todavia, há contrapontos: as bases de dados somam mais de 90 estudos associando o *rs352140* com diversas doenças, incluindo infectocontagiosas e pulmonares e, como já escrito anteriormente, resultados com outros SNPs em TLRs intracelulares foram sim publicados. Tais resultados, majoritariamente reportando associação positiva, inclusive

corroboram uma explicação proposta aqui para a ausência de artigos que embasem a discussão: um viés de publicação.

Estudos que avaliaram viés de publicação têm notado que artigos com resultados significativos positivos são mais fáceis de serem encontrados do que os que reportam resultados negativos ou não significativos. Como consequência, a super-representação de estudos positivos em revisões sistemáticas pode significar um enviesamento inclinado a resultados positivos. O viés de publicação é apenas um em um grupo de vieses relacionados, todos potencialmente levando a super-representação de resultados significativos ou positivos em revisões sistemáticas. Outros tipos de viés incluem: viés de tempo (estudos positivos tendem a ser publicados mais rapidamente); viés de publicação múltipla (estudos positivos tendem a ser publicados mais de uma vez); viés de citação (estudos positivos tendem a ser citados mais) e viés de língua (estudos positivos tendem a ser publicados em inglês) (PLoS Med., 2005).

3.2.5. Ausência de associação com os SNPs estudados

Os resultados aqui descritos sugerem ausência de associação dos desfechos clínicos óbito por COVID-19, alterações neurológicas, ventilação mecânica, sepse, comprometimento pulmonar e tromboembolismo com os SNPs *rs3775291*, *rs179008*, *rs3764880* e *rs352140*. Além das já propostas explicações para tais resultados, devem ser consideradas adicionalmente o tamanho amostral, a ancestralidade dos indivíduos envolvidos e a organização dos dados.

A amostra aqui estudada compreendeu 127 pacientes, um tamanho amostral relativamente baixo em estudos de associação genética. A inclusão de mais indivíduos aumentaria o poder estatístico das análises, sendo mais representativa da população-alvo do estudo. Apesar de poder ser considerado pequeno, o biobanco de COVID-19 do LAPOGE foi formado durante os meses em que a pandemia não mostrava sinais de arrefecimento e ainda não havia vacinas disponíveis, além de envolver um pequeno grupo de pesquisadores na coleta e processamento das amostras.

Populações diferem geneticamente umas das outras por diversos fatores evolutivos, como deriva gênica e/ou seleção e, como consequência essas populações terão fenótipos genéticos diferentes. Uma vez que populações modernas são uma mistura das antigas, SNPs causais para um traço estão por si próprios correlacionados com a ancestralidade (Lawson *et al.*, 2019). Assim, estudos de associação genética devem levar em conta a ancestralidade da amostra estudada, não sendo aconselhada a exportação de resultados encontrados em uma

população específica para outra de ancestralidade diferente. Tomando como base esse preceito, as ausências de associação relatadas nesse estudo são aplicáveis à população brasileira, podendo-se argumentar inclusive que seriam aplicáveis apenas à população do sul do Brasil, graças às altas taxas de miscigenação do país.

Por fim, a forma como o banco de dados relativo às informações clínicas foi organizado refletiu nos resultados encontrados. Variáveis que poderiam ser consideradas contínuas como comprometimento pulmonar, alterações neurológicas, complicações da sepse e tromboembolismo foram classificadas como categóricas. Dessa maneira, a presença ou ausência dessas características foi avaliada em relação aos SNPs, sem revelar possíveis efeitos relativos dos polimorfismos, como grau de comprometimento pulmonar, por exemplo.

4. CONCLUSÃO

Estudos prévios realizados com polimorfismos dos genes *TLR3*, *TLR7*, *TLR8* e *TLR9* associados a COVID-19 apresentaram resultados discrepantes, o que é comum em avaliações genéticas de doenças complexas. Várias possíveis explicações para tal foram apontadas na literatura, tais como heterogeneidade clínica, diferenças étnicas e tamanhos amostrais pequenos. Nesse sentido, pesquisas como a realizada ao longo desse trabalho de conclusão de curso contribuem para melhorar o entendimento sobre influências genéticas ligadas à COVID-19, permitindo que revisões sistemáticas, por exemplo, utilizem de tais dados para montar painéis de risco, diagnóstico ou até mesmo tratamento.

A investigação de variantes genéticas do sistema imune humano associadas a doenças infectocontagiosas é lenta e trabalhosa. Além disso, nota-se um baixo número de trabalhos publicados que avaliem genes do sistema imune inato, mantendo um “foco científico” no sistema imune adaptativo. Os resultados aqui descritos sugerem ausência de associação entre os SNPs investigados e os desfechos clínicos da COVID-19, sendo imperativa a consideração da ancestralidade brasileira da amostra na interpretação desses.

Como perspectivas, pretende-se expandir o tamanho amostral dos pacientes graves, incluindo amostras de fora do HU-UFSC, além de otimizar o protocolo de genotipagem das amostras de pacientes categorizados como casos leves ou assintomáticos. Tais indivíduos foram incluídos no biobanco do LAPOGE mas até o momento não foram estudados pela equipe do laboratório. A obtenção dos genótipos desses pacientes para os SNPs de interesse nesse estudo permitirá a avaliação da associação dos polimorfismos com a severidade da COVID-19, através do agrupamento casos leves e assintomáticos *vs* casos graves.

Esse trabalho de conclusão de curso é fruto de um projeto em curso há quatro anos que surgiu da necessidade de se produzir conhecimento acerca de uma nova doença que alcançou níveis epidemiológicos pandêmicos e vitimou milhões de pessoas. Foi definitivamente um privilégio poder acompanhar o desenvolvimento desse projeto desde seu nascimento, participar em todas as suas etapas de execução ao lado de pesquisadores de excelência e adquirir conhecimentos que não poderiam ser mensurados. Todos os objetivos propostos foram cumpridos e as descobertas feitas levaram à formulação de novos questionamentos – assim como é de praxe na ciência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; MORGAN, David; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WALTER, Peter; WILSON, John; HUNT, Tim. **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ALSEOUDY, Mahmoud M.; ELGAMAL, Mohamed; ABDELGHANY, Dalia A.; BORG, Asmaa M.; EL-MESERY, Ahmed; ELZEINY, Dina; HAMMAD, Maha O. Prognostic impact of toll-like receptors gene polymorphism on outcome of COVID-19 pneumonia: A case-control study. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, United States, v. 235, p. 108929, 2022. DOI: [10.1016/j.clim.2022.108929](https://doi.org/10.1016/j.clim.2022.108929).

AL-TAMIMI, Zainab H. D.; ALTA'EE, Abdulsamie H.; JASIM, Ahmed H. Effect of Toll-Like Receptor 7 Gene Polymorphism and ABO Blood Groups on the Severity of COVID-19 Patients. **Acta informatica medica : AIM : journal of the Society for Medical Informatics of Bosnia & Herzegovina : casopis Društva za medicinsku informatiku BiH**, Bosnia and Herzegovina, v. 30, n. 3, p. 191–195, 2022. DOI: [10.5455/aim.2022.30.191-195](https://doi.org/10.5455/aim.2022.30.191-195).

Aristizábal B, González Á. Innate immune system. In: Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, et al., editors. Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]. Bogota (Colombia): El Rosario University Press; 2013 Jul 18. Chapter 2. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459455/>. Acesso em 12/03/2024

ASKAR, Eva; RAMADORI, Giuliano; MIHM, Sabine. Toll-like receptor 7 rs179008/Gln11Leu gene variants in chronic hepatitis C virus infection. **Journal of Medical Virology**, [S. l.], v. 82, n. 11, p. 1859–1868, 2010. DOI: [10.1002/jmv.21893](https://doi.org/10.1002/jmv.21893).

BAGCI, Gokhan; GUNDOGDU, Oguz; PEKTAS, Ayse Nur; BAGCI, Binnur; AVCI, Onur; GURSOY, Sinan; KAYGUSUZ, Kenan; ELALDI, Nazif. The investigation of host genetic variants of toll-like receptor 7 and 8 in COVID-19. **Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids**, [S. l.], v. 42, n. 8, p. 586–602, 2023. DOI: [10.1080/15257770.2023.2176515](https://doi.org/10.1080/15257770.2023.2176515).

BARKHASH, Andrey V.; VOEVODA, Mikhail I.; ROMASCHENKO, Aida G.. Association of single nucleotide polymorphism rs3775291 in the coding region of the TLR3 gene with predisposition to tick-borne encephalitis in a Russian population. **Antiviral Research**, [S.L.], v. 99, n. 2, p. 136-138, ago. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.05.008>.

BARREIRO, Luis B.; BEN-ALI, Meriem; QUACH, Hélène; LAVAL, Guillaume; PATIN, Etienne; PICKRELL, Joseph K.; BOUCHIER, Christiane; TICHIT, Magali; NEYROLLES, Olivier; GICQUEL, Brigitte. Evolutionary Dynamics of Human Toll-Like Receptors and Their Different Contributions to Host Defense. **Plos Genetics**, [S.L.], v. 5, n. 7, p. 1000562-0, 17 jul. 2009. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000562>.

Bias in Reporting of Genetic Association Studies. (2005). *PLoS Medicine*, 2(12), e419. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020419>

BRAGA, Matheus; SHIGA, Mariana Akemi Sonoda; SILVA, Pedro Emanuel Santiago; YAMANAKA, Aléia Harumi Uchibaba; SOUZA, Victor Hugo; GRAVA, Sergio; SIMÃO, Andréa Name Colado; NEVES, Janisleya Silva Ferreira; LIMA NETO, Quirino Alves de; ZACARIAS, Joana Maira Valentini. Association between polymorphisms in TLR3 , TICAM1 and IFNA1 genes and covid-19 severity in Southern Brazil. **Expert Review Of Molecular Diagnostics**, [S.L.], S.I. p. 1-7, 17 jun. 2024. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14737159.2024.2367466>.

COVID-19 Data Explorer: Global Humanitarian Operations. Quarterly Highlights, Q2 2022. Disponível em: <https://data.humdata.org/visualization/covid19-humanitarian-operations/>. Acesso em: 27 jul. 2024.

DAI, Jiayu; WANG, Yibo; WANG, Hongrui; GAO, Ziyuan; WANG, Ying; FANG, Mingli; SHI, Shuyou; ZHANG, Peng; WANG, Hua; SU, Yingying. Toll-Like Receptor Signaling in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Induced Innate Immune Responses and the Potential Application Value of Toll-Like Receptor Immunomodulators in Patients With Coronavirus Disease 2019. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 13, n. 10, p. 1-20, 27 jun. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.948770>.

DEL CARMEN CAMACHO-REA, María et al. Association of TLR8 Variants in Sex-Based Clinical Differences in Patients with COVID-19. **Biochemical Genetics**, [S. l.], 2024. DOI: 10.1007/s10528-024-10839-w. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10528-024-10839-w>.

DHANGADAMAJHI, Gunanidhi; ROUT, Ronnaly. Association of TLR3 functional variant (rs3775291) with COVID-19 susceptibility and death: a population-scale study. **Human Cell**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 1025-1027, 22 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13577-021-00510-6>.

DING, X.; LIN, Q.; ZHAO, J.; FU, Y.; ZHENG, Y.; MO, R.; ZHANG, L.; ZHANG, B.; CHEN, J.; XIE, T.. Synonymous mutations in TLR2 and TLR9 genes decrease COPD susceptibility in the Chinese Han population. **Pulmonology**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 230-238, maio 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pulmoe.2022.09.010>.

EMILIEN, G.. Impact of genomics on drug discovery and clinical medicine. **Qjm**, [s.l.], v. 93, n. 7, p. 391-423, 1 jul. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/qjmed/93.7.391>.

FABIÃO, J.; SASSI, B.; PEDROLLO, E.F.; GERCHMAN, F.; KRAMER, C.K.; LEITÃO, C.B.; PINTO, L.C.. Why do men have worse COVID-19-related outcomes? A systematic review and meta-analysis with sex adjusted for age. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [S.L.], v. 55, n. 22, p. 320-330, 2022. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x2021e11711>.

FAM (fluorescein), HEX, JOE, ROX, TAMRA, TET, Texas Red® and others. 2021. Disponível em: <https://www.atdbio.com/content/33/FAM-fluorescein-HEX-JOE-ROX-TAMRA-TET-Texas-Red-and-others>. Acesso em: 06 set. 2021.

FEKONJA, Ota; AVBELJ, Monika; JERALA, Roman. Suppression of TLR Signaling by Targeting TIR domain-Containing Proteins. **Current Protein And Peptide Science**, [S.L.],

v. 13, n. 8, p. 776-788, dez. 2012. Bentham Science Publishers Ltd..
<http://dx.doi.org/10.2174/138920312804871148>.

GANTIER, Michael P.; IRVING, Aaron T.; KAPARAKIS-LIASKOS, Maria; XU, Dakang; EVANS, Vanessa A.; CAMERON, Paul U.; BOURNE, James A.; FERRERO, Richard L.; JOHN, Matthias; BEHLKE, Mark A.. Genetic modulation of TLR8 response following bacterial phagocytosis. **Human Mutation**, [S.L.], v. 31, n. 9, p. 1069-1079, 22 jul. 2010. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1002/humu.21321>.

HABIBABADI, Hossein Mehrabi; PARSANIA, Masoud; POURFATHOLLAH, Ali Akbar; HAGHIGHAT, Setareh; SHARIFI, Zohreh. Association of TLR3 single nucleotide polymorphisms with susceptibility to HTLV-1 infection in Iranian asymptomatic blood donors. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 53, p. 1-9, 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0026-2020>.

HAGE, Fadi G.; SZALAI, Alexander J.. C-Reactive Protein Gene Polymorphisms, C-Reactive Protein Blood Levels, and Cardiovascular Disease Risk. **Journal Of The American College Of Cardiology**, [S.L.], v. 50, n. 12, p. 1115-1122, set. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2007.06.012>.

HALUSHKA, Marc K.; FAN, Jian-bing; BENTLEY, Kimberly; HSIE, Linda; SHEN, Naiping; WEDER, Alan; COOPER, Richard; LIPSHUTZ, Robert; CHAKRAVARTI, Aravinda. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 22, n. 3, p. 239-247, jul. 1999. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/10297>.

HO, Jamie Sy; FERNANDO, Daniel I; CHAN, Mark y; SIA, Ching-Hui. Obesity in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Annals Of The Academy Of Medicine, Singapore**, [S.L.], v. 49, n. 12, p. 996-1008, 31 dez. 2020. Academy of Medicine, Singapore. <http://dx.doi.org/10.47102/annals-acadmedsg.2020299>.

HUMPHREYS, Stephen. The unethical use of BMI in contemporary general practice. **British Journal Of General Practice**, [S.L.], v. 60, n. 578, p. 696-697, 1 set. 2010. Royal College of General Practitioners. <http://dx.doi.org/10.3399/bjgp10x515548>.

HUNT, Ryan; SAUNA, Zuben E.; AMBUDKAR, Suresh V.; GOTTESMAN, Michael M.; KIMCHI-SARFATY, Chava. Silent (Synonymous) SNPs: Should We Care About Them? *Em*: KOMAR, Anton A. (org.). **Single Nucleotide Polymorphisms**. Methods in Molecular Biology Totowa, NJ: Humana Press, 2009. v. 578p. 23–39. DOI: [10.1007/978-1-60327-411-1_2](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_2). Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-411-1_2. Acesso em: 27 jun. 2024.

ÍNDICE de massa corporal (IMC). Elaborado por MSD Manuals. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt/profissional/multimedia/table/%C3%ADndice-de-massa-corporal-imc>. Acesso em: 22 jun. 2024.

IWASAKI, Akiko; MEDZHITOV, Ruslan. Detection of PAMPs by Toll-Like Receptors (TLRs). Disponível em: <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-5f3eb7afb20ace00af8f6514-detection-of-pamps-by-toll-like-receptors-tlrs>. Acesso em: 04 jul. 2024.

KHAN, Mujeeb; ADIL, Syed F.; ALKHATHLAN, Hamad Z.; TAHIR, Muhammad N.; SAIF, Sadia; KHAN, Merajuddin; KHAN, Shams T.. COVID-19: a global challenge with old history, epidemiology and progress so far. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 39, 23 dez. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26010039>.

KIM, Ah-Yeon; SHIM, Hyun-Jin; KIM, Su Yeon; HEO, Sunghye; YOUN, Hyung-Sun. Differential regulation of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of Toll-like receptors by cardamonin. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 64, p. 1-9, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2018.08.018>.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C.. **Robbins Patologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Grupo Editorial Nacional, 2021.

LAHIRI, D. K; NURNBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LAWSON, Daniel John; DAVIES, Neil Martin; HAWORTH, Simon; ASHRAF, Bilal; HOWE, Laurence; CRAWFORD, Andrew; HEMANI, Gibran; DAVEY SMITH, George; TIMPSON, Nicholas John. Is population structure in the genetic biobank era irrelevant, a challenge, or an opportunity? **Human Genetics**, [S. l.], v. 139, n. 1, p. 23–41, 2020. DOI: [10.1007/s00439-019-02014-8](https://doi.org/10.1007/s00439-019-02014-8).

LEAL, Valéria Louzada; BRIXNER, Betina; POSSUELO, Lia Gonçalves; SILVA, Chana de Medeiros da; RENNEN, Dagmar Pollo. **Protocolos e técnicas laboratoriais de rotina: aplicações em biologia molecular, microbiologia, cultivo celular e farmacognosia**. Santa Cruz do Sul: Tiki Books, 2019.

LEE, Clarissa C.; AVALOS, Ana M.; PLOEGH, Hidde L.. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 168-179, 3 fev. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3151>.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, Laura E.; MARTINEZ-ARMENTA, Carlos; MEDINA-LUNA, Daniel; ORDÓÑEZ-SÁNCHEZ, María Luisa; TUSIE-LUNA, Tere; ORTEGA-PEÑA, Silvestre; HERRERA-LÓPEZ, Brígida; SUAREZ-AHEDO, Carlos; JIMENEZ-GUTIERREZ, Guadalupe Elizabeth; HIDALGO-BRAVO, Alberto. Implication of myddosome complex genetic variants in outcome severity of COVID-19 patients. **Journal Of Microbiology, Immunology And Infection**, [S.L.], v. 56, n. 5, p. 939-950, out. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2023.06.002>.

MATZINGER, P. Tolerance, Danger, and the Extended Family. **Annual Review Of Immunology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 991-1045, abr. 1994. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.005015>.

MINASHKIN, Mikhail M.; GRIGORTSEVICH, Nataliya Y.; KAMAEVA, Anna S.; BARZANOVA, Valeriya V.; TRASPOV, Alexey A.; GODKOV, Mikhail A.; AGEEV, Farkhad A.; PETRIKOV, Sergey S.; POZDNYAKOVA, Nataliya V. The Role of Genetic Factors in the Development of Acute Respiratory Viral Infection COVID-19: Predicting Severe Course and Outcomes. **Biomedicines**, Switzerland, v. 10, n. 3, 2022. DOI: [10.3390/biomedicines10030549](https://doi.org/10.3390/biomedicines10030549).

MINISTÉRIO da Saúde - COVID-19 NO BRASIL. 2024. Disponível em: https://infoms.saude.gov.br/extensions/covid-19_html/covid-19_html.html. Acesso em: 30 jun. 2024.

MOSQUERA-SULBARAN, Jesús A.; PEDREAÑEZ, Adriana; CARRERO, Yenddy; CALLEJAS, Diana. C-reactive protein as an effector molecule in Covid-19 pathogenesis. **Reviews In Medical Virology**, [S.L.], v. 31, n. 6, p. 31-39, 17 fev. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.2221>.

NOVAIS, Caroline Monteiro; PIRES-ALVES, Melissa. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (pcr). **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, S.I., v. 1, n. 33, p. 10-13, jul. 2004.

NÜSSLEIN-VOLHARD, Christiane. The Toll gene in Drosophila pattern formation. **Trends In Genetics**, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 231-245, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2021.09.006>.

PARASHER, Anant. COVID-19: current understanding of its pathophysiology, clinical presentation and treatment. **Postgraduate Medical Journal**, [S.L.], v. 97, n. 1147, p. 312-320, 25 set. 2020. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-138577>.

PARSANIA, Masoud; KHORRAMI, Seyed Mahmood Seyed; HASANZAD, Mandana; PARSANIA, Negar; NAGOZIR, Sina; MOKHTARI, Narges; HABIBABADI, Hossein Mehrabi; GHAZIASADI, Azam; SOLTANI, Saber; JAFARPOUR, Ali. Association of polymorphisms in TLR3 and TLR7 genes with susceptibility to COVID-19 among Iranian population: a retrospective case-control study. **Iranian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 1, n. 16, p. 114-123, 12 fev. 2024. Knowledge E DMCC. <http://dx.doi.org/10.18502/ijm.v16i1.14880>.

PATI, Abhijit; PADHI, Sunali; CHAUDHURY, Sanskruti; PANDA, Aditya K.. TLR3 (rs3775291) variant is not associated with SARS-CoV-2 infection and related mortality: a population-based correlation analysis. **Human Cell**, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 1274-1277, 12 abr. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13577-021-00530-2>.

RS179008 Reference SNP (rs) Report. Elaborado pelo NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs179008>. Acesso em: 25 mar. 2024.

RS352140 Reference SNP (rs) Report. Elaborado pelo NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs352140>. Acesso em: 25 mar. 2024.

RS3764880 Reference SNP (rs) Report. Elaborado pelo NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3764880>. Acesso em: 25 mar. 2024.

RS3775291 Reference SNP (rs) Report. Elaborado pelo NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3775291>. Acesso em: 25 mar. 2024.

RUSSELL, Clark D.; LONE, Nazir I.; BAILLIE, J. Kenneth. Comorbidities, multimorbidity and COVID-19. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 334-343, fev. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-022-02156-9>.

SBI e API lançam guia para o tratamento medicamentoso da covid-19. 2023. Elaborado pela Sociedade Brasileira de Infectologia. Disponível em: <https://infectologia.org.br/2023/02/13/sbi-e-api-lancam-guia-para-o-tratamento-medicamentoso-da-covid-19/>. Acesso em: 07 mar. 2024.

SCIENTIFIC Brief: SARS-CoV-2 Transmission. 2021. Disponível em: https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/sars-cov-2-transmission.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fscience%2Fscience-briefs%2Fscientific-brief-sars-cov-2.html. Acesso em: 22 jul. 2022.

SHASTRY, Barkur S.. SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution. **Journal Of Human Genetics**, [s.l.], v. 52, n. 11, p. 871-880, 11 out. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10038-007-0200-z>.

SILVA, Marcos Jessé Abrahão; VIEIRA, Marcelo Cleyton da Silva; SOUZA, Alex Brito; SANTOS, Everaldina Cordeiro dos; MARCELINO, Beatriz dos Reis; CASSEB, Samir Mansour Moraes; LIMA, Karla Valéria Batista; LIMA, Luana Nepomuceno Gondim Costa. Analysis of associations between the TLR3 SNPs rs3775291 and rs3775290 and COVID-19 in a cohort of professionals of Belém-PA, Brazil. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-9, 19 dez. 2023. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2023.1320701>.

SOUYRIS, Mélanie; CENAC, Claire; AZAR, Pascal; DAVIAUD, Danièle; CANIVET, Astrid; GRUNENWALD, Solange; PIENKOWSKI, Catherine; CHAUMEIL, Julie; MEJÍA, José E.; GUÉRY, Jean-Charles. TLR7 escapes X chromosome inactivation in immune cells. **Science Immunology**, [S.L.], v. 3, n. 19, 26 jan. 2018. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/sciimmunol.aap8855>.

SRIVASTAVA, Anshika; HOLLENBACH, Jill A.. The immunogenetics of COVID-19. **Immunogenetics**, [S.L.], v. 75, n. 3, p. 309-320, 19 dez. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00251-022-01284-3>.

TAQMAN® Genotyping Master Mix Protocol. S.I: S.I., 2007. Disponível em: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fcms_039282.pdf. Acesso em: 06 set. 2021.

THERAPEUTICS and COVID-19: LIVING GUIDELINE 10 November 2023. Genebra: Iris Who, 2023. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/373975/WHO-2019-nCoV-therapeutics-2023.2-eng.pdf?sequence=1>. Acesso em: 07 mar. 2024.

TLR3 toll like receptor 3 [Homo sapiens (human)]. Elaborado pelo NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7098>. Acesso em: 22 jun. 2024.

TLR7 toll like receptor 7 [Homo sapiens (human)]. Elaborado pelo NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51284>. Acesso em: 22 jun. 2024.

TLR8 toll like receptor 8 [Homo sapiens (human)]. Elaborado pelo NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51311>. Acesso em: 22 jun. 2024.

TLR9 toll like receptor 9 [Homo sapiens (human)]. Elaborado pelo NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/54106>. Acesso em: 22 jun. 2024.

TOTURA, Allison L.; WHITMORE, Alan; AGNIHOTHARAM, Sudhakar; SCHÄFER, Alexandra; KATZE, Michael G.; HEISE, Mark T.; BARIC, Ralph S.. Toll-Like Receptor 3 Signaling via TRIF Contributes to a Protective Innate Immune Response to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *Mbio*, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 1-9, jul. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.00638-15>.

TWYMAN, R.m.. Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis. *Encyclopedia Of Neuroscience*, [s.l.], p. 871-875, 2009. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-008045046-9.00866-4>.

V'KOVSKI, Philip; KRATZEL, Annika; STEINER, Silvio; STALDER, Hanspeter; THIEL, Volker. Coronavirus biology and replication: implications for sars-cov-2. *Nature Reviews Microbiology*, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 155-170, 28 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>.

VERCAMMEN, Elisabeth; STAAL, Jens; BEYAERT, Rudi. Sensing of Viral Infection and Activation of Innate Immunity by Toll-Like Receptor 3. *Clinical Microbiology Reviews*, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 13-25, jan. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00022-07>.

VIVEIROS, Anissa; GHEBLAWI, Mahmoud; AUJLA, Preetinder K.; SOSNOWSKI, Deanna K.; SEUBERT, John M.; KASSIRI, Zamanah; OUDIT, Gavin Y.. Sex- and age-specific regulation of ACE2: insights into severe covid-19 susceptibility. *Journal Of Molecular And Cellular Cardiology*, [S.L.], v. 164, p. 13-16, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2021.11.003>.

VOLTARELLI JC. Febre e inflamação. *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 27, n. 1/2, p. 7-48, jan./jun. 1994.

WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. 2022. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 27 jul. 2024.

WHO-CONVENED global study of origins of SARS-CoV-2: China Part. Genebra: Iris Who, 2021. Elaborado pela OMS. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-convened-global-study-of-origins-of-sars-cov-2-china-part>. Acesso em: 07 mar. 2024.

XIE, Jianfeng; TONG, Zhaohui; GUAN, Xiangdong; DU, Bin; QIU, Haibo. Clinical Characteristics of Patients Who Died of Coronavirus Disease 2019 in China. *Jama Network Open*, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 205619-0, 10 abr. 2020. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.5619>.

YOUNESS, Ali; CENAC, Claire; FAZ-LÓPEZ, Berenice; GRUNENWALD, Solange; BARRAT, Franck J.; CHAUMEIL, Julie; MEJÍA, José Enrique; GUÉRY, Jean-Charles. TLR8 escapes X chromosome inactivation in human monocytes and CD4(+) T cells. **Biology of sex differences**, England, v. 14, n. 1, p. 60, 2023. DOI: [10.1186/s13293-023-00544-5](https://doi.org/10.1186/s13293-023-00544-5).

ZHENGLUN PAN, THOMAS A TRIKALINOS, FOTINI K KAVVOURA, JOSEPH LAU, JOHN P.A IOANNIDIS. Local Literature Bias in Genetic Epidemiology: An Empirical Evaluation of the Chinese Literature. **PLOS Medicine**, [S. l.], v. e334, n. 2(12), p. S.I., 2005. DOI: <https://doi.org/10.1371%2Fjournal.pmed.0020334>.

ANEXO A – TCLE utilizado na pesquisa

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada “Busca de marcadores genéticos e epigenéticos em pacientes com COVID-19: formação de um biorepositório”, que tem como objetivo geral formar um biorepositório de amostras de indivíduos com COVID-19 e indivíduos saudáveis para investigar o papel dos fatores genéticos e dos fatores ambientais sobre a expressão de genes relacionados com a resposta imune e com a metabolização e transporte de fármacos que podem ser importantes no tratamento da COVID-19. Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados dos projetos relacionados a este tema que serão desenvolvidos com a amostra que você disponibilizar permitirão compreendermos o que faz com que algumas pessoas tenham maior facilidade de desenvolver a doença do que outras e porque algumas pessoas respondem melhor aos medicamentos utilizados do que outras. Essas informações podem contribuir para uma melhor triagem de indivíduos de maior risco e uma melhor personalização de tratamentos em caso de novas infecções.

Para sua participação nesta pesquisa faremos uma coleta de sangue periférico e uma coleta com swab nasal (que é parecido com um cotonete). Nenhum dos dois procedimentos acarretará em dor, entretanto, você pode sentir um leve desconforto no momento da coleta e pode ficar com um hematoma local da coleta do sangue. Mas não se preocupe, esta marca arroxada desaparecerá em poucos dias sem a necessidade de nenhuma ação de sua parte. Para diminuir a chance destes riscos, aconselhamos que você não carregue peso com o braço onde foi realizada a coleta. Também será realizada uma entrevista através de questionário semiestruturado, onde coletaremos informações sociodemográficas e hábitos de vida (coisas como fumar, beber, fazer atividade física, entre outras). Você pode se sentir um pouco constrangido ao longo da entrevista, por incômodo em falar ou, ainda, por mobilização emocional. Desta forma, os riscos serão minimizados, pois, você não precisará responder a qualquer pergunta ou fornecer quaisquer informações durante a entrevista se sentir-se desconfortável ou achar que a resposta trata-se de algo muito particular, contudo os pesquisadores estarão dispostos a lhe ouvir, interromper a entrevista se assim você desejar, retornando a coletar os dados sob sua anuência tão logo se sinta à vontade para continuá-la. Para alcançarmos os objetivos propostos, precisaremos coletar também algumas informações de seu prontuário médico, mas não se preocupe que olharemos somente as informações pertinentes a esta pesquisa (efeitos adversos quando utilizou algum medicamento, resultados

de exames clínicos, entre outros).

Você poderá interromper ou cancelar a coleta ou o preenchimento do questionário quando achar necessário, sem que isso acarrete em quaisquer represálias atuais ou futuras. Afinal, você não é obrigado a participar da pesquisa e a sua decisão de não participar ou de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento será respeitada. Caso você tenha interesse em saber sobre o andamento ou o resultado desta pesquisa, você pode entrar em contato com a pesquisadora principal cujo contato encontra-se ao final deste termo. Se decidir que não quer mais participar desta pesquisa, você também pode comunicar sua decisão para a pesquisadora principal e sua vontade será respeitada. Destacamos que sua participação nesta pesquisa não influenciará em nada no tratamento que você vem recebendo atualmente na unidade que em que você está internado e ou em tratamento no hospital.

Para alcançarmos os objetivos propostos nesta pesquisa, precisamos comparar pessoas infectadas com COVID-19 com pessoas não infectadas, e as amostras que forem coletadas serão armazenadas durante o período de desenvolvimento do trabalho. As amostras estarão sob responsabilidade da pesquisadora principal cujo contato está apresentado abaixo e ficarão armazenadas no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) na Universidade Federal de Santa Catarina até a finalização dos objetivos desta pesquisa. Portanto, pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte de uma amostra de sangue periférico e de um swab nasal. A utilização do seu material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa, ou se você concordar, em outras pesquisas futuras com temática relacionada à atual desde que devidamente aprovadas pelo CEP.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em eventos ou periódicos científicos, mas seu anonimato sempre será mantido. Contudo, destacamos que apesar de nossos esforços para manter os dados anônimos, sempre existe a possibilidade mesmo que remota de quebra de sigilo, ainda que involuntária e não intencional. Caso isso aconteça, serão tomadas as providências necessárias de acordo com a legislação.

A legislação brasileira não permite que você tenha qualquer compensação financeira pela sua participação nesta pesquisa, contudo, você não terá nenhuma despesa advinda da sua participação, já que a coleta e a entrevista serão realizadas enquanto você estiver no hospital. Entretanto, se você tiver despesas extraordinárias comprovadamente decorrentes da sua participação na pesquisa, as mesmas serão ressarcidas mediante apresentação de comprovante. Se ocorrer algum dano em decorrência de sua participação na pesquisa, você poderá solicitar indenização de acordo com a legislação vigente.

Se você tiver alguma dúvida a respeito da pesquisa, você pode entrar em contato com

a pesquisadora responsável: Profa. Dra. Juliana Dal-Ri Lindenau, no Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética localizado no Campus Reitor João David Ferreira Lima - Bairro Córrego Grande, Florianópolis- SC, Brasil, telefone (048) 37219887, email: juliana.lindenau@ufsc.br.

Os aspectos éticos e a confidencialidade das informações fornecidas, relativos às pesquisas com seres humanos, serão respeitados de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras da Resolução N° 466, de 12 de dezembro de 2012 e Resolução N° 441 de 2011, aprovadas pelo Conselho Nacional de Saúde.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação na pesquisa, você poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEPSH/UFSC) da Universidade Federal de Santa Catarina: Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), Rua: Desembargador Vitor Lima, número 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC, CEP 88040-400, telefone (48) 3721-6094, e-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br. O CEPSH é um órgão colegiado interdisciplinar, deliberativo, consultivo e educativo, vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina, mas independente na tomada de decisões, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Eu, _____ RG _____, confirmo que recebi todas as informações necessárias para entender porque e como este estudo está sendo realizado e nesses termos e considerando-me livre e esclarecido (a):

- () Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.
 () Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisas, desde que relacionadas com a temática da pesquisa atual e devidamente aprovadas pelo comitê de ética em pesquisas com seres humanos.

Este documento está redigido em duas vias, deverá ser assinado por você e pela pesquisadora e cada um deverá ficar com uma via. O mesmo deve ser rubricado em todas as suas páginas por todos os envolvidos (participante e pesquisador).

Florianópolis, _____ de _____ de _____.

Assinatura do (a) participante: _____

Assinatura do (a) pesquisador (a): _____