



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DANNY VICTORIA BARBOSA MORAES

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO -819 T/C DE IL-10 NA INFECÇÃO POR
SARS-COV-2 EM PACIENTES DA REGIÃO OESTE DA BAHIA**

**Barreiras-BA
2022**

DANNY VICTORIA BARBOSA MORAES

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO -819 T/C DE IL-10 NA
INFECÇÃO POR SARS-COV-2 EM PACIENTES DA REGIÃO
OESTE DA BAHIA**

Monografia apresentada à
Universidade Federal do Oeste
da Bahia como requisito para
conclusão do Trabalho de
Conclusão de Curso em
Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Jonilson
Berlink Lima

Coorientadora: Prof. Dr^a.
Larissa Paola Rodrigues
Venâncio

**Barreiras-BA
2022**

FICHA CATALOGRÁFICA

M828 Moraes, Danny Victoria Barbosa.

Avaliação do polimorfismo -819 t/c de il-10 na infecção por sars-cov-2 em pacientes da região oeste da Bahia. / Danny Victoria Barbosa Moraes. – 2022.

36f.

Orientador: Prof. Dr. Jonilson Berlink Lima.

Monografia (Graduação) – Bacharelado em Medicina. Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. Barreiras, BA, 2022.

1. Covid-19. 2. Polimorfismo. 3. RT - PCR. I. Lima, Jonilson Berlink.
II. Universidade Federal do Oeste da Bahia - Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDD 610

Biblioteca Universitária de Barreiras - UFOB

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e Nossa Senhora, que me permitiram chegar até aqui e concluir esse trabalho tão esperado. Agradeço, também, à minha família, especialmente minha mãe, irmão e avós, que foram essenciais não só para minha curta (por enquanto) trajetória acadêmica, mas também para o meu crescimento quanto pessoa. À minha mãe, especialmente, dedico esse trabalho, por ser minha rocha e fortaleza em todos os momentos. Aos meus avós, Socorro, Nena e Walmir, agradeço por todas as demonstrações de carinho e amor que tiveram comigo, e por todo o suporte que me deram em todos os momentos da minha graduação. Espero um dia poder retribuir tudo o que fizeram por mim. Agradeço, ainda, ao meu namorado, Ariel, por ser o ouvinte fiel dos meus desabafos sobre esse trabalho (não foram poucos) e aos meus amigos e colegas, tanto da faculdade quanto de fora dela. Estendo ainda esse não tão curto agradecimento ao meu Professor orientador Jonilson Berlink, por toda a gentileza, carinho e paciência que teve comigo durante esses quase 2 anos de trabalho, e também à professora Larissa, que sempre esteve disponível e disposta a sanar minhas dúvidas. Foi uma honra poder aprender com seres humanos e profissionais tão excelentes. Aos meus colegas de bancada, Luiz, Fernando, Marcos e muitos outros, obrigada por todos os momentos de ajuda e conhecimentos compartilhados. Por fim, concluo esses agradecimentos direcionando-os ao CNPq, que financiou essa pesquisa mesmo com todos os ataques que vem sofrendo. A ciência brasileira resiste a duras penas, mas resiste. Que possamos a cada dia interiorizar ainda mais o conhecimento científico, levando-o a atender as necessidades das mais diversas populações. Que esse trabalho possa servir para acrescentar, ainda que pouco, ao vasto conhecimento já disponível acerca da COVID-19 – uma doença que mudou amplamente a realidade mundial.

“Ad astra per aspera” – Por caminhos difíceis alcançaremos as estrelas. (Ditado Latino)

RESUMO

MORAES, D.V.B. Avaliação do polimorfismo -819 T/C de IL-10 na infecção por SARS-CoV-2 em pacientes da região Oeste da Bahia. Barreiras-BA, 2022, 37p. **Monografia** – bacharelado em Medicina – Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB).

No dia 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a doença COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, uma pandemia (WHO, 2020). A COVID-19 é considerada uma doença altamente imprevisível, pendendo entre casos leves, de simples síndrome gripal, a casos graves com Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG). Nesse sentido, diversos estudos evidenciaram o fenômeno chamado de “tempestade de citocinas” como um dos mais importantes fatores determinantes do quadro clínico dos pacientes infectados com a doença pelo alto nível de inflamação causado a nível celular. Entre as citocinas participantes desse fenômeno está a Interleucina 10, que é produzida principalmente por macrófagos e inibe a expressão de citocinas do padrão Th1 (pró-inflamatórias), a ação de células apresentadoras de antígenos (APC's) e algumas funções das células T, diminuindo a amplitude da resposta inflamatória do organismo. Nesse sentido, níveis elevados de IL-10 podem ser considerados marcadores e preditores de gravidade da COVID-19. Apesar de sua elevada importância, são escassos os estudos que relacionam os polimorfismos de região promotora da IL-10 com os mais diversos quadros clínicos da COVID-19. Assim, este estudo buscou relacionar o polimorfismo rs1800871 (-819 T -> C), que afeta a transcrição gênica da interleucina 10, com o quadro clínico dos indivíduos participantes. Para isso, foi selecionada uma coorte de 225 indivíduos da região Oeste da Bahia, subdivididos em 4 grupos com quadros clínicos distintos: “óbitos”, “internação”, “COVID positivo” e “COVID negativo”. As amostras foram genotipadas a partir de RT-PCR. Na investigação dessa variante, foi verificada uma associação da frequência genotípica com o quadro clínico dos indivíduos investigados ao comparar-se o grupo “positivos” com os grupos “óbitos” ($X^2=8,233$; $p=0,0163$), “internação” ($X^2=6,389$; $p=0,041$) e “negativos” ($X^2=15,57$; $p=0,0004$). Além disso, foi encontrada diferença estatisticamente significativa ao se comparar as idades dos pacientes pertencentes aos grupos (teste ANOVA – valor de $p<0.0001$). Os resultados sugerem que a mutação pode ser um fator protetivo para a doença. Este trabalho descreve, pela primeira vez, a frequência dessa variante no Oeste da Bahia, sendo de extrema importância para compreensão do panorama genético da população da região.

Palavras-chave: COVID-19. Polimorfismo. RT-PCR. SARS-CoV-2. Interleucina 10

ABSTRACT

MORAES, D.V.B. Evaluation of the -819 T/C polymorphism of IL-10 in SARS-CoV-2 infection in patients from the western region of Bahia. Barreiras-BA, 2022, 37p. Monograph – Bachelor of Medicine – Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB).

On March 11, 2020, the World Health Organization (WHO) declared the disease COVID-19, caused by the SARS-CoV-2 virus, a pandemic (WHO, 2020). COVID-19 is considered a highly unpredictable disease, ranging from mild cases, from simple flu syndrome, to severe cases with Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). In this sense, several studies have highlighted the phenomenon called “cytokine storm” as one of the most important factors determining the clinical picture of patients infected by the disease due to the high level of inflammation caused at the cellular level. Among the cytokines participating in this phenomenon is Interleukin 10, which is produced mainly by macrophages and inhibits the expression of Th1 cytokines (pro-inflammatory), the action of antigen-presenting cells (APC's) and some functions of T cells, decreasing the extent of the body's inflammatory response. In this sense, high levels of IL-10 can be considered markers and predictors of COVID-19 severity. Despite its high importance, there are few studies that relate IL-10 promoter region polymorphisms with the most diverse clinical conditions of COVID-19. Thus, this study sought to relate the rs1800871 polymorphism (-819 T -> C), which affects the gene transcription of interleukin 10, with the clinical picture of the individuals participating in the study. For this, a cohort of 225 individuals from the western region of Bahia was selected, and they were subdivided into 4 groups with different clinical conditions: “deaths”, “hospitalization”, “positive COVID” and “negative COVID”. Samples were genotyped using RT-PCR. In the investigation of this variant, it was found that the genotypic frequency data are associated with the clinical status of the investigated individuals when comparing the “positive” group with the “death” groups ($X^2=8.233$; $p=0.0163$), “ward” ($X^2=6.389$; $p=0.041$) and “negative” ($X^2=15.57$; $p=0.0004$). Furthermore, a statistically significant difference was found when comparing the ages of the patients belonging to the groups (ANOVA test – p -value <0.0001). The data collected suggest that the mutation may be a protective factor for the disease. This work describes, for the first time, the frequency of this variant in the West of Bahia, being extremely important for understanding the genetic panorama of the population of the region.

Key words: COVID-19. Polymorphism. RT-PCR. SARS-CoV-2. Interleukyn 10.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências sense e antisense do primer utilizado para genotipagem	18
Tabela 2 - Enzima utilizada para digestão das amostras e tamanho dos padrões de banda observados na genotipagem	19
Tabela 3 - Mediana de idade dos pacientes pertencentes aos grupos.	21
Tabela 4 - Quantidade de pacientes separados por genótipos em cada grupo (óbitos, internação, COVID Positivo e COVID negativo).....	23
Tabela 5 - Frequência genotípica e alélica da mutação -819 T>C em cada grupo analisado: óbitos, internação, COVID positivo e COVID negativo.	23
Tabela 6 - Comparação entre valores da dosagem de IL-10 e presença dos alelos selvagem (T) e mutante (C) dos pacientes da tabela 6 em log. Não foi encontrada significância estatística (valor de $p>0,05$).	26
Tabela 7: Comparação entre genótipos dos pacientes da tabela 6 e dosagem de IL-10 média (em log). Não foi encontrada significância estatística (valor de $p>0,05$)...	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O papel das interleucinas na mediação da resposta imunológica na COVID-19, especialmente na tempestade de citocinas, dando destaque ao papel da IL-10.....9

Figura 2: - Estudo realizado pelo autor BAO et. Al. acerca do genótipo de indivíduos e sua relação com a produção de IL-10, demonstrando maiores níveis de IL-10 no genótipo TT (selvagem).....12

Figura 3: ondas da pandemia de COVID-19 desde a semana 01 até o momento de realização deste estudo (maio de 2022). Atualmente, o número de casos encontra-se em estabilidade.....14

Figura 4: Padrões de banda esperados na genotipagem dos indivíduos selvagens (TT), mutantes (CC) e heterozigotos (TC).....20

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 3,5% indicando oito amostras testadas neste estudo. (Foi utilizado marcador de peso molecular de 100bp; H: heterozigoto (genótipo TC), S: selvagem (genótipo TT), M: mutante (genótipo CC).....24

Figura 2 - Média dos níveis de IL-10 em pg/ml dosados em pacientes com genótipos selvagem (TT) e heterozigoto (TC) de uma parcela do grupo "óbitos". Não foram incluídos nessa análise os pacientes com genótipo mutante (CC).....25

Figura 3 - Média dos níveis de IL-10 em pg/ml dos pacientes portadores dos alelos T (selvagem) e C (mutante) em uma parcela do grupo "óbitos".....25

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. O SARS-CoV-2	6
1.2. Fisiopatologia da COVID-19 e a tempestade de citocinas	7
1.3. IL-10 e a resposta imunológica	9
1.4. Polimorfismo rs1800871 e sua relação com patologias inflamatórias ...	10
1.5. Epidemiologia da COVID-19	12
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo Geral	16
3.2. Objetivos Específicos	17
4. METODOLOGIA	17
4.1. Local de pesquisa	17
4.2. Casuística	17
4.3. Critérios Para Inclusão dos Sujeitos	17
4.4. Genotipagem da mutação rs1800871 por PCR convencional	18
4.5. Digestão dos amplicons	19
4.6. Análise estatística	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÕES	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

1.1. O SARS-CoV-2

No dia 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a doença COVID-19, causada pelo vírus SARS-Cov-2, uma pandemia (WHO, 2020). Os primeiros casos foram registrados na cidade de Wuhan, na China, mas logo se tornaram preocupação mundial pela rápida disseminação da doença. No contexto brasileiro, o SARS-CoV-2 apresenta-se como uma enorme preocupação da saúde pública. No dia 10 de abril de 2022, o Brasil apresentava 30.600.000 casos confirmados e 664.000 óbitos pela doença (WHO, 2022).

Retrospectivamente, os coronavírus sempre estiveram em evidência no meio científico, tendo em vista que o SARS-CoV-2 não é o único dessa família a infectar seres humanos (SEQUERA, 2020). O MERS-CoV, por exemplo, é o coronavírus causador da Síndrome Respiratória do Oriente Médio, enquanto o SARS-CoV causa Síndrome Respiratória Aguda Grave (LEE, 2020). Nesse sentido, a pandemia do SARS-CoV-2 corresponde ao terceiro surto zoonótico de coronavírus do século XXI.

O SARS-CoV-2, enquanto causador da COVID-19 (Coronavirus Disease 2019), é um vírus envelopado de RNA pertencente ao gênero Betacoronavírus, à família Coronaviridae e à ordem Nidoviridae, esta última tendo como representantes diversos vírus causadores de infecções no Trato Gastrointestinal e respiratório. Sua estrutura consiste em proteínas estruturais como as de Membrana (M), de Embrulho (E) e a proteína Spike (S). A proteína S, inclusive, confere a estrutura de “coroa” ao vírus, responsável pela adesão desse ao receptor ACE2 (Angiotensin Convertir Enzyme 2) presente nas células humanas, que coincidentemente é o mesmo receptor ao qual o vírus SARS-CoV se liga. (MOTTA; et al., 2020; TAY, et al., 2020). A ACE-2 é uma proteína transmembrana responsável pela homeostase da angiotensina, sendo que a angiotensina tipo 2 é um agente vasopressor e pró-inflamatório (SHAH, et al.).

A proteína S se liga à extremidade aminoterminal da ACE-2, e as membranas viral e celular se fundem através da extremidade carboxiterminal (ZHANG, et al.). A infecção pelo vírus, principalmente nas células pulmonares, está associada a uma

ativação proteolítica do receptor pela Spike a partir de um sítio de clivagem furina-protease, algo que diferencia o SARS-CoV-2 dos outros coronavírus capazes de infectar humanos (LEHNER, et al.) e que possivelmente aumenta o tropismo do vírus particularmente pelos pneumócitos do tipo II (ZHENG; et al 2020; MELGAREJO, 2020).

Além da ACE-2, a proteína S do SARS-CoV-2 pode se ligar ao domínio b1b2 do receptor NRP-1 (receptor da neuropilin-1), o que potencializa a infectividade do vírus no organismo. Estudos recentes feitos a partir de autópsias de indivíduos que vieram a óbito por conta da infecção demonstraram, inclusive, neurônios olfatórios infectados positivos para NRP-1 na cavidade nasal. Além disso, a quantidade de receptores NRP-1 encontrada nesses pacientes foi consideravelmente maior quando comparada ao grupo controle (JIANG, 2022). A TMPRSS2 (serina protease transmembrana 2) também é importante na infecção celular pelo vírus, e células que expressam esse receptor em conjunto com a ACE2 apresentam maior risco de infecção direta.

1.2. FISIOPATOLOGIA DA COVID-19 E A TEMPESTADE DE CITOCINAS

Uma das grandes preocupações durante a infecção pelo SARS-CoV-2 é a chamada tempestade de citocinas, uma resposta excessiva e aberrante do sistema imunológico do hospedeiro diante de uma infecção, presente em diversas doenças, inclusive na COVID-19. Essa resposta aberrante e não resolutive causa diversos danos aos órgãos internos dos pacientes, podendo levar, por exemplo, ao choque e a sepse em casos mais severos. (ELHABYAN, 2020).

Originalmente, o termo “tempestade de citocinas” foi cunhado para designar o estado de hiper-inflamação em pacientes não imunodeficientes – neste caso, crianças portadoras de uma apresentação sistêmica de Artrite Inflamatória Juvenil (sJIA, na sigla em inglês), também conhecida como doença de Stills. Esses pacientes apresentam elevados níveis de citocinas inflamatórias na corrente sanguínea, juntamente com a síndrome de ativação macrofágica (MAS). (MCGONAGLE et al., 2020)

No entanto, as crianças portadoras da condição não apresentam o quadro clássico de pneumonia associado à COVID-19, mas sim manifestações

extrapulmonares, como febre, adenopatia, hepatoesplenomegalia, anemia e outras citopenias, além de queda da função hepática e CIVD relacionada à elevação dos níveis de citocinas (MCGONAGLE et al., 2020). Outras doenças que cursam com tempestade de citocinas são: doença de Castleman multicêntrica, sepse e linfohistiocitose hemofagocítica secundária (HLH).

Citocinas são moléculas (polipeptídeos) mediadoras intercelulares essenciais para o funcionamento do sistema imunológico. No entanto, quando produzidas excessivamente, como na tempestade de citocinas, podem causar danos aos sistemas, ao levar a um estado hiperinflamatório patológico, com desbalanço entre mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios.

A gênese dessa condição envolve diversos aspectos do sistema imunológico, tanto da parte inata quanto adaptativa. Por exemplo, as células NK (Natural Killers) são as principais responsáveis pela tempestade de citocinas na HLH, quando ocorre um defeito na função destrutiva dessas células e uma consequente continuidade ao estímulo antigênico, prolongando a inflamação.

Em relação à COVID-19, existem diferentes hipóteses para a origem da tempestade de citocinas. A mais aceita delas supõe que a ligação do SARS-CoV-2 ao receptor da ACE2 na membrana celular promove falha dos efeitos anti-inflamatórios, anti-trombóticos e anti-fibróticos da própria ACE2, que perde “espaço” em seus receptores (ZANZA et al., 2022).

Figura 4 - O papel das interleucinas na mediação da resposta imunológica na COVID-19, especialmente na tempestade de citocinas, dando destaque ao papel da IL-10.

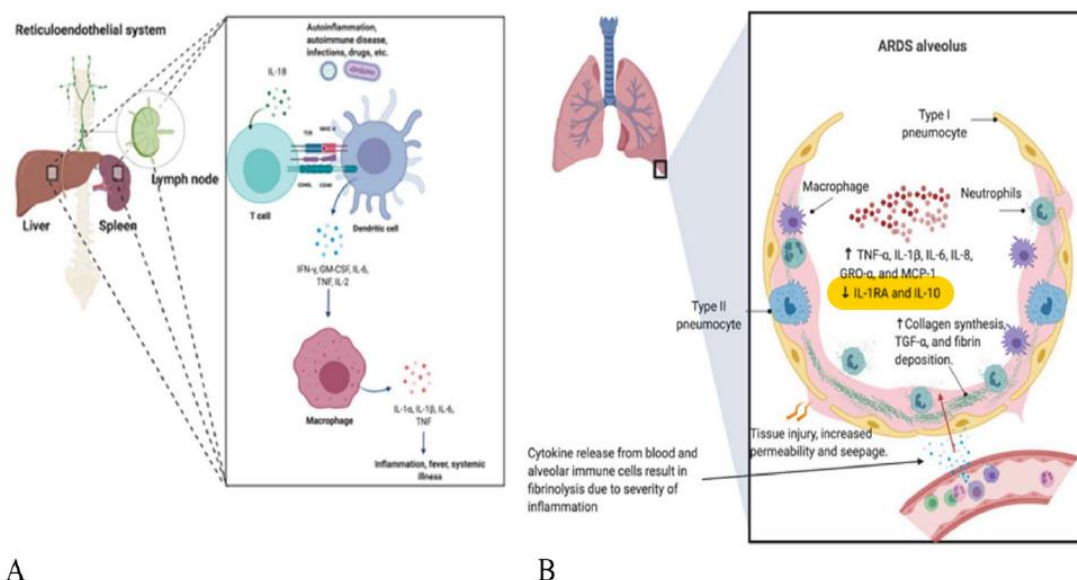


Fig. 1. Classical MAS Organ Pattern versus COVID-19 Related Picture.

. Adaptada de: ZANZA et al., 2022

1.3. IL-10 E A RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A interleucina 10 inibe a replicação dos linfócitos e a produção de citocinas pró-inflamatórias. É produzida principalmente por macrófagos e age na inibição a expressão de citocinas do padrão Th1. (SHIN, 2005). Além disso, a IL-10 promove funções mediadas pelos linfócitos B, tais como aumento da proliferação celular, diferenciação celular e produção de anticorpos. No entanto, também pode inibir, por exemplo, a apresentação de antígenos pelas APCs (Antigen Presentation Cells) e algumas funções das células T. Outra ação importante dessa citocina é a redução da produção de outras citocinas como IL-2 e IFN-gama, diminuindo a amplitude da resposta Th1. (TARIQUE, 2020). IL-10 tem, por isso, efeitos pleiotrópicos de imunorregulação de inflamação, diminuindo a expressão de MHC de classe II e co-estimulando macrófagos.

Durante a tempestade de citocinas, as interleucinas IL-6 e IL-10 encontram-se em níveis elevados, principalmente em pacientes graves. Elas são consideradas, respectivamente, mediadores pró-inflamatórios ou inibitórios indutores da fase aguda e, quando aumentadas, podem ser consideradas preditores de gravidade da COVID-19 (ELHABYAN, 2020). A IL-10 está também diretamente relacionada a níveis

elevados de PCR (Proteína C Reativa) em pacientes com apresentação grave da COVID-19 (HAN, 2020).

A IL-10 é considerada um excelente biomarcador para prever desfechos desfavoráveis da COVID-19, além de ser um fator de risco para morte do paciente quando em níveis muito elevados. (AVENDAÑO-FÉLIX, 2021). Além disso, essa citocina tem a função de inibir a síntese de outras citocinas pelas células T helper, como IL-2, IL-3, IFN gama e GM-CSF. Assim, fica claro seu papel essencial no desenvolvimento da resposta imunológica de pacientes não somente com COVID-19, mas também dos acometidos por outras doenças infectocontagiosas como Influenza A (H1N1) (CHOUDHARY, 2018) e hepatite C (BARKHASH, 2018).

Apesar de não haver tão extensas descrições na literatura sobre seus polimorfismos, a IL-10 tem papel crucial na definição do panorama de citocinas do indivíduo infectado pelo SARS-CoV-2, estabelecendo um contrabalanço, inclusive, com outra proteína de fase aguda: a Proteína C Reativa (HAN, 2020). Outrossim, foi evidenciado um aumento de 37% do nível de IL-10 no soro de pacientes portadores da forma grave de COVID-19, em relação aos portadores da forma leve (HAN, 2020).

Diante de todo esse panorama, os polimorfismos da citocina IL-10 se tornam importantes alvos de estudos a fim de discernir o que leva a formas de apresentação tão distintas da COVID-19.

1.4. POLIMORFISMO rs1800871 E SUA RELAÇÃO COM PATOLOGIAS INFLAMATÓRIAS

O gene codificador da interleucina 10 está localizado no cromossomo 1q31-32. Seu tamanho é de 4,8kb e contém 5 exons e 4 íntrons, codificando 178 aminoácidos. Na região promotora desse gene, são encontrados diversos SNP (Single Nucleotide Polymorphism), e os mais comuns são: -1082G, -592C e -819C, sendo o último o foco desse trabalho. Todos estão relacionados a uma produção aumentada de IL-10, influenciam também na expressão e funcionalidade dessa citocina (BARKHASH, 2018)

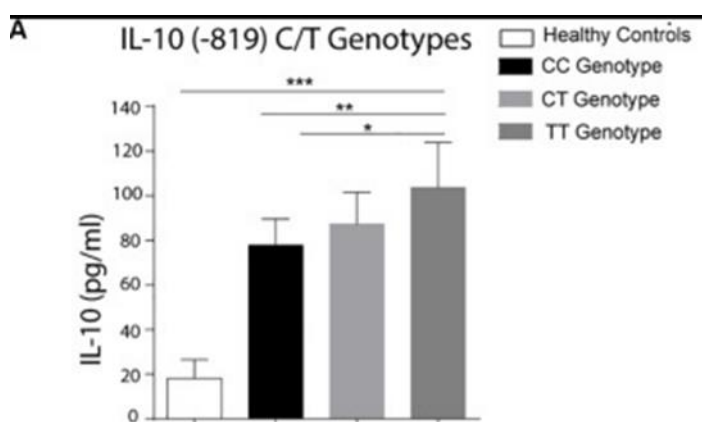
Um estudo na Índia revelou a associação do alelo G do polimorfismo rs1800896 (que também é um polimorfismo de região promotora que desencadeia

uma maior transcrição da citocina) de modo dominante com proteção contra Influenza A grave, devido a uma maior produção de IL-10, contribuindo para uma redução na inflamação e evolução menos severa da doença. No entanto, é importante salientar que esse aumento nos níveis da citocina, apesar de diminuir a inflamação, pode diminuir também o clearance viral, prejudicando a resposta imune. (TARIQUE, 2020).

Um dos trabalhos sobre mutações SNP na região promotora do gene da IL-10 encontrou resultados significativos em relação ao nível de transcrição da citocina, particularmente em relação ao polimorfismo -819 T/C. As análises de citometria de fluxo realizadas pelos autores, com enfoque na patogenia da lepra/hanseníase, doença predominantemente de base imunológica, com diferentes formas de expressão a depender do perfil imune do indivíduo infectado, demonstraram um aumento no número de células T CD4 e Treg produzindo IL-10 quando presentes os genótipos TC e CC. Nesse sentido, tal mutação pode caracterizar um aumento na produção dessa citocina nos indivíduos heterozigotos e homozigotos para o alelo mutante (C) (TARIQUE, 2020).

Ademais, outro trabalho demonstrou o importante papel dos polimorfismos de região promotora da IL-10 no curso da hepatite causada pelo vírus da Hepatite B (HBV na sigla em inglês). Neste estudo, o alelo G do polimorfismo -1082 teve associação significativa com a susceptibilidade da população à doença, mas o alelo C do polimorfismo -819 não, o que sugere uma certa “independência” na produção da citocina. (BAO et al., 2015)

Figura 5 - Estudo realizado pelo autor BAO et. Al. acerca do genótipo de indivíduos e sua relação com a produção de IL-10, demonstrando maiores níveis de IL-10 no genótipo TT (selvagem)



Fonte: BAO et al., 2015.

A partir desse referencial, tem-se escopo para hipotetizar acerca da importância de tais polimorfismos que afetam a produção de IL-10 no panorama da COVID-19, especificamente o -819 T/C, a fim de identificar uma possível relação entre a presença ou não desse polimorfismo ao se tratar das variadas apresentações clínicas da infecção pelo vírus SARS-CoV-2.

1.5. EPIDEMIOLOGIA DA COVID-19

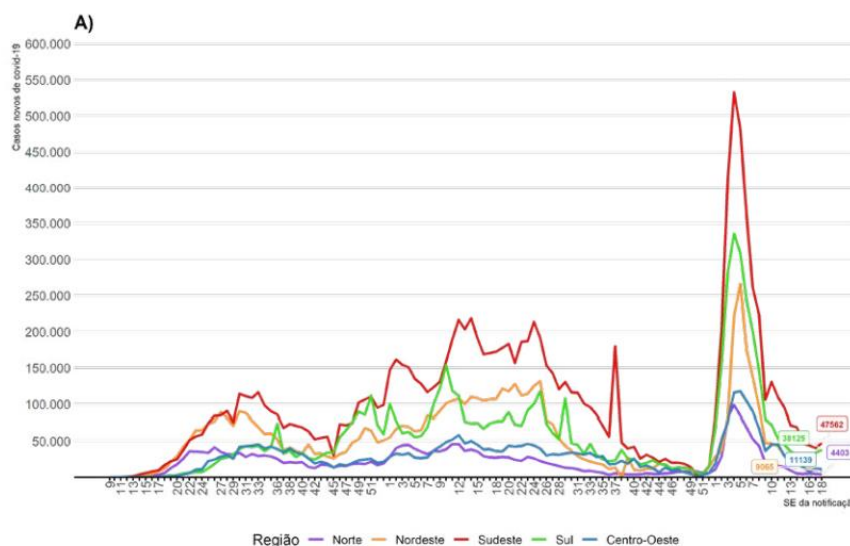
A COVID é uma emergência de saúde pública desde o momento do seu surgimento, em 29 de dezembro de 2019 (OMS). Em março de 2020, com a deflagração da Pandemia, ficou evidente o quanto os sistemas de saúde de diversos locais do mundo, especialmente o Brasil, estavam despreparados para lidar com tamanha demanda, o que acabou prejudicando grandemente o manejo dos pacientes com COVID-19.

Em 7 de maio de 2022, foram confirmados 517.097.886 casos de COVID-19 no mundo. Os Estados Unidos da América foram o país com a maior quantidade de casos acumulados (81.858.744), seguido pela Índia (43.102.194) e Brasil (30.558.530). (Boletim epidemiológico 112, Ministério da Saúde). Para um país de proporções continentais e grande população como o Brasil, com aproximadamente 215 milhões de habitantes (IBGE, 2022), o número confirmado de óbitos foi de 664.126 até a data de publicação do boletim oficial de número 112. Com tais dados, foi possível obter a taxa de mortalidade acumulada de 313,6 óbitos por 100 mil habitantes, superando, por exemplo, a taxa de mortalidade acumulada por câncer de 1996 a 2017, que foi de 166,13 por 100 mil habitantes, e também por doenças isquêmicas do coração, que foi de 79,19 (MANSUR, 2021).

Segundo LI (2021), algumas das comorbidades mais comuns entre os casos graves de COVID-19 foram: hipertensão arterial (38,7%), doença cardíaca coronária (10,4%) e doença pulmonar obstrutiva crônica (4,8%). Todas essas comorbidades são consideradas “comuns” no rol de doenças tratadas no Brasil, especialmente na Atenção Primária à Saúde. Nesse sentido, intervenções sobre essas patologias também se tornam de extrema importância para o controle de casos graves da COVID-19.

Na região Oeste da Bahia, local onde este estudo está sendo conduzido, a maior prevalência dos casos, até o período de junho de 2021, em relação a idade, foi entre indivíduos da faixa etária de 30 a 39 anos (GOMES, 2021). O coeficiente de mortalidade foi de 56,2 a cada 100 mil habitantes, situação discrepante da média atual de 2022, com um número inferior de óbitos devido a vacinação, mas é importante salientar que tal estudo abarcou dados apenas até o final de 2020 – o primeiro ano de Pandemia. Além disso, é essencial destacar que o coeficiente de incidência da doença (3.884,1 a cada 100 mil habitantes) foi maior no Oeste Bahiano no período do que nos estados de Sergipe (2.049 a cada 100 mil habitantes) e Paraíba (1.717 a cada 100 mil habitantes).

Figura 6 - O gráfico representa as ondas da pandemia de COVID-19 desde a semana 01 até o momento de realização deste estudo (maio de 2022). Atualmente, o número de casos encontra-se em estabilidade.



Fonte: Boletim 112 do Ministério da Saúde

A partir do exposto, torna-se evidente que o estudo dos polimorfismos relacionados às regiões promotoras do gene que codifica a interleucina 10 é essencial para um maior entendimento da ação do SARS-CoV-2 no organismo humano. Após mais de dois de pandemia, mesmo com o desenvolvimento de vacinas em tempo recorde, é notável que esse problema de saúde pública a nível mundial ainda é mal compreendido, e a ausência de um tratamento específico

cientificamente comprovado e estabelecido para a doença agrava ainda mais a situação.

2.0. JUSTIFICATIVA

Apesar de já ter passado mais de dois anos que a OMS declarou a pandemia do novo Coronavírus (WHO, 2020), diversos aspectos relacionados ao vírus SARS-CoV-2 continuam uma incógnita, mesmo com grande parte da comunidade científica mundial voltada para estudos sobre o tema. Nesse sentido, a COVID-19 trouxe não apenas danos em relação à saúde pública, mas também à economia mundial, que sofreu com os impactos causados pela alta taxa de mortalidade e pelo isolamento social necessário para o controle da pandemia.

As equipes de saúde enfrentam diariamente desafios para lidar com pacientes com a doença, que apresenta manifestações que vão muito além do comprometimento pulmonar, desde apresentações oftalmológicas e dermatológicas até a falência total de órgãos, como os rins (BABAPOOR-FARROKHRAN; et al, 2020; LI; HU; GU, 2020).

A rápida disseminação da doença pelo mundo, no entanto, não manteve um padrão específico de desdobramento. A COVID-19 veio em “ondas”, ou seja, geralmente com um padrão de estabilidade precedendo uma nova alta de casos positivos. Além disso, tais “ondas” apresentam características distintas entre si – com as variantes do vírus prevalecendo individualmente em cada uma delas. Por exemplo, em um estudo sediado na África do Sul, os pacientes admitidos na quarta

onda da doença eram mais jovens que os da terceira, com idades médias de 36 e 59 anos, respectivamente. (MASLO, 2022)

No Brasil, a segunda e a terceira onda foram consideradas as mais letais, afetando de maneira particular indivíduos mais jovens, levando caos a um sistema de saúde já sobrecarregado pela primeira onda. Exemplo disso é a cidade de Manaus-AM, cujo sistema público e privado de saúde entrou em colapso devido a variante Gama em janeiro e fevereiro de 2021. (ORELLANA, 2022)

Em relação ao Oeste da Bahia, especificamente Barreiras, foram 23.768 casos confirmados de COVID-19 e 354 óbitos pela doença ao longo desses mais de 2 anos de pandemia. No dia 09/06/22, data de publicação do último boletim da SESAB (Secretaria de Saúde do Estado da Bahia), estavam ativos 85 casos. A taxa de letalidade geral do município foi de 1,49% (SESAB, 2022).

A partir disso, fica claro o impacto que o vírus SARS-CoV-2 causou em todo o mundo, desde o sistema de saúde até a parte econômica. A força de trabalho foi extremamente afetada pela doença, particularmente no Brasil, que já se encontrava em ascendente crise econômica desde 2019, a qual foi agravada com a chegada da Pandemia.

Nesse sentido, o estudo sobre as mais diversas variáveis que envolvem essa doença torna-se essencial – especialmente a definição mais precisa de um panorama genético populacional que auxilie a desvelar aspectos significativos da COVID-19. O estudo dos polimorfismos de citocinas, neste caso, da IL-10, é de suma importância para identificar susceptibilidade ou fator de proteção em populações, e com isso promover melhor aparato para o desenvolvimento de tratamentos direcionados à resposta imunológica dos pacientes. O desenvolvimento de vacinas em tempo recorde foi, absolutamente, um fator primordial para frear o grande número de mortes causados pela doença, mas o tratamento durante e após a infecção também se mostra essencial, já que mesmo pessoas com sintomas leves podem desenvolver incapacidades em decorrência da mesma.

Baseado nessas informações, o estudo do polimorfismo -819 T>C (rs1800871) é importante para obtenção de informações acerca de como variantes genéticas podem modificar a produção e expressão de proteínas (nesse caso, uma citocina) e, consequentemente, interferir na resposta imune frente a uma infecção como a pelo vírus SARS-CoV-2.

3.0. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar em pacientes a ocorrência da variante -819 T>C (rs1800871) e sua relação com diferentes perfis de resposta clínica à infecção por SARS-CoV-2 na região Oeste da Bahia.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a frequência dos alelos C e T no polimorfismo -819 T/C (IL-10) em grupos de pacientes com diferentes quadros de COVID-19 residentes na região Oeste da Bahia.
2. Correlacionar a frequência dos polimorfismos estudados com os grupos avaliados.

4.0. METODOLOGIA

4.1. LOCAL DO ESTUDO

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Agentes Infecciosos e Vetores (LAIVE) da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), localizado no município de Barreiras-BA. A supervisão foi feita pelos membros pertencentes ao Núcleo de Agentes Infecciosos e Vetores (NAIVE), especialmente os professores doutores Jonilson Berlink Lima e Larissa Barbosa Venâncio. As amostras utilizadas, de sangue e swab nasofaríngeo, para genotipagem são advindas dos pacientes pertencentes à população do Oeste da Bahia que se submeteram ao teste molecular de diagnóstico de COVID-19 realizado pelo LAIVE no ano de 2020 e assinaram o termo de consentimento.

4.2. TIPO DE ESTUDO

Estudo de coorte retrospectivo.

4.3. CASUÍSTICA

Para análise da mutação -819 T>C (rs1800871), o estudo avaliou o total de 225 pacientes testados para COVID-19 na região Oeste da Bahia. Esses pacientes foram agrupados em 4 grupos distintos: óbitos por COVID-19 (N=72), internados por COVID-19 (N=58), casos positivos não graves de COVID-19 (N=44) e casos negativos para COVID-19 (N=51). Este último grupo será composto por pacientes que testaram negativo para a doença. Foram observados, para consideração, gênero e idade dos indivíduos – dados que foram obtidos através da ficha de notificação emitida pela Secretaria Municipal de Saúde (SMS) das cidades de origem dos indivíduos. A análise para detecção do vírus SARS-CoV-2 nas amostras obtidas foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Molecular do LAIVE, localizado no campus Reitor Edgard Santos da Universidade Federal do Oeste da Bahia, em Barreiras. O estudo foi aprovado pelo CONEP, sob registro CAAE: 30629520.6.0000.0008.

4.5. CRITÉRIOS PARA INCLUSÃO DOS PACIENTES

Neste estudo, foram incluídos pacientes atendidos na região Oeste da Bahia que foram a óbito, os internados em UTI ou enfermaria, com teste PCR positivo e teste negativo para COVID-19, cujas amostras laboratoriais foram analisadas no LAIVE no período de abril a dezembro de 2020. As informações acerca dos óbitos e do tipo de internação dos pacientes (UTI/enfermaria) foram obtidas nas fichas de notificação emitidas pelas SMS. Todos os pacientes internados estiveram em leitos exclusivos para COVID-19.

4.6. GENOTIPAGEM DA MUTAÇÃO -819 T>C (rs1800871) POR PCR CONVENCIONAL

a) Extração do DNA genômico total

O DNA genômico total de cada indivíduo do estudo foi extraído de amostras de swab nasofaríngeo ou sangue total, armazenadas a -80°C, utilizando kit de extração de DNA e RNA PureLink (Invitrogen), conforme manual do fabricante. A manipulação das amostras foi realizada em laboratório de nível de biossegurança NB2 (LAIVE).

As amostras de DNA eluídas em solução TE foram acondicionadas em placas de

fundo chato de 96 poços com mapa de identificação individual e estocadas em ultrafreezer a -20°C.

b) Padronização da reação PCR para a mutação -819 T>C (rs1800871)

Para a análise da biologia molecular da mutação -819 T>C (rs1800871), foram utilizadas as sequências de primers (oligonucleotídeos iniciadores) descritas na tabela 1. A análise foi realizada por meio de reações em cadeia da polimerase.

Tabela 1 - Sequências sense e antisense do primer utilizado para genotipagem.

Gene	Variant ealélica	Sequencia do <i>primer</i> (F – <i>foward</i> ; R – <i>reverse</i>)	Amplicon (pb)	Referências
IL10	-819 T>C	F- 5'- TCATTCTATGTGCTGGAGATGG-3' R- 5'-TGGGGGAAGTGGGTAAGAGT -3'	209	CANSANÇÃO et al.; SUN et al.

Fonte: produzida pelo autor.

Para realização da reação, foi estabelecido o volume final de 15 µL, com reagentes nas seguintes concentrações: dNTP (0,1mM de cada base), 1X tampão da Taq, MgCl₂ (4,0 mM), Primers forward e reverse (0,9 µM de cada primer), Platinum Taq (Invitrogen) (0,5U) e DNA (1,6 µM). O volume final foi atingido com água ultrapura.

A PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; desnaturação intermediária a 95°C por 15 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos; extensão intermediária a 72°C por 30 segundos; extensão final a 72°C por 7 minutos – tudo isso em um total de 40 ciclos.

Finalizada a amplificação das amostras através de PCR, as amostras foram aplicadas em gel de agarose de concentração 2%, com as seguintes configurações: 90 volts, 270mA, 80 Watts por 35 minutos.

c) Digestão dos amplicons obtidos por PCR

Para genotipagem da mutação -819 T>C (rs1800871) por RFLP, foi utilizada a enzima de restrição Rse 1, do tipo *fast digest*. Seu padrão de digestão está descrito na tabela 2.

Tabela 2 - enzima utilizada para digestão das amostras e tamanho dos padrões de banda observados na genotipagem.

Mutação	Enzima de restrição	Tamanho de fragmento (pb) selvagem	Tamanho de fragmento (pb) mutantes	Referência
-819 T>C	Rse1	209 pb	83bp, 126bp	CANSANÇÃO et al.; SUN et al.

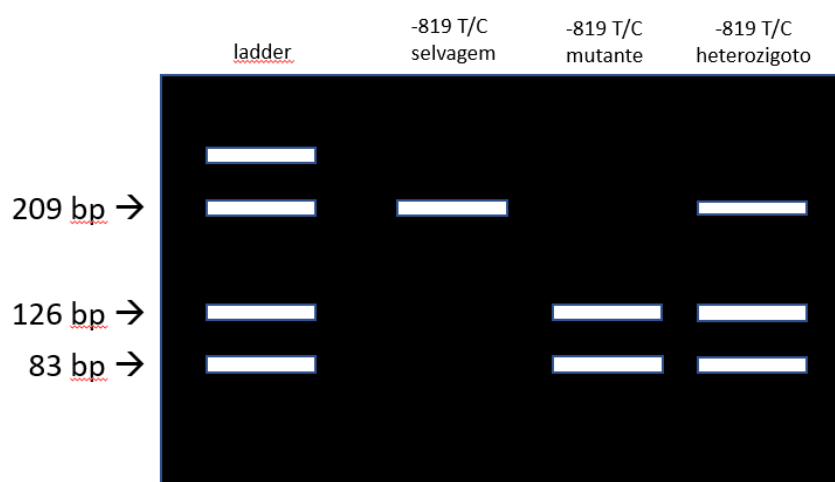
Fonte: produzida pelo autor.

Para realização da reação, foi estabelecido o volume final de 15 µL, com reagentes nas seguintes concentrações: dNTP (0,1mM de cada base), 1X tampão da Taq, MgCl₂ (4,0 mM), Primers forward e reverse (0,9 µM de cada primer), Platinum Taq (Invitrogen) (0,5U) e DNA (1,6 µM). O volume final foi atingido com água ultrapura.

Ao final da preparação da reação, esta foi para o termociclador com o seguinte protocolo: período de incubação a 37°C por 15 minutos e inativação a 65°C por 15 minutos.

Para visualização dos padrões de banda, as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 3,5%, com as seguintes configurações: 90 volts, 270mA, 80 Watts por 35 minutos.

Figura 7 - Padrões de banda esperados na genotipagem dos indivíduos selvagens (TT), mutantes (CC) e heterozigotos (TC).



Padrões de banda esperados: IL-10 (-819)
Fragmentos: 83 bp e 126 bp

Fonte: produzida pelo autor.

d) Análise estatística

A análise descritiva foi realizada por meio da organização das informações contidas nas fichas de notificação para os pacientes que foram testados para o SARSCoV-2 no Laboratório de Agentes Infecciosos e Vetores (LAIVE), Unidade I – Agentes Infecciosos. Dados qualitativos, como idade e genótipos, foram analisados por qui-quadrado.

Os resultados de genotipagem das variantes genéticas foram tabuladas para cada grupo dos indivíduos em estudo. Dados de diversidade genética (equilíbrio de Hardy-Weinberg) foram analisados para cada grupo avaliado utilizando o software PRISMA versão 9.4.0 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Dados de frequências genotípicas e alélicas foram analisados por meio de teste de qui-quadrado de Pearson, que também foi utilizado para análise por gênero e para comparação entre as dosagens de IL-10 obtidas no plasma e os genótipos de uma parcela dos pacientes. Foi empregado o teste ANOVA, realizado através do software PRISMA versão 9.4.0, para análise dos dados de idade dos pacientes participantes do estudo. O nível de significância empregado em cada análise foi de 5%.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela X estão apresentados os dados de idade sobre a coorte analisada no estudo da mutação -819 T>C (rs1800871). Foram analisadas as amostras de 225 indivíduos. Dentre o total, 106 indivíduos (47,1%) são do sexo masculino e 119 (52,9%) são do sexo feminino. O número de indivíduos de sexo biológico não difere estatisticamente ($X^2=0,75$; $p=0.3861$). A média de idade da coorte foi de 50,25 anos. A idade mínima observada foi de 0 anos e a máxima de 93 anos. Em relação à idade dos pacientes pertencentes à coorte, como esperado, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste ANOVA – valor de $p<0.0001$), o que possibilita inferir que a idade é um fator determinante na apresentação clínica da doença.

Tabela 3 - Mediana de idade dos pacientes pertencentes aos grupos.

Idade (Mediana)	Masculino	Feminino	Total
Grupos*			
Óbitos	70 (30-93)	69,5 (31-89)	70 (30-93)
Internações	64 (20-90)	61 (26-86)	63 (20-90)
COVID positivo	41 (20-85)	33 (8-54)	34 (8-85)
COVID negativo	30 (19-44)	34,5 (0-59)	34 (0-59)

Fonte: produzida pelo autor.

De início, pode-se verificar uma quantidade de indivíduos do sexo feminino sutilmente superior à do sexo masculino (52,9% contra 47,1%), especialmente nos grupos COVID-19 Negativo (82,4% contra 17,6%) e COVID-19 Positivo (56,8% contra 43,2%). Essa diferença pode ser interpretada como uma discrepância no momento de delimitação da coorte, que pendeu em relação a um sexo, ou como um reflexo do fato de, atualmente, o sexo feminino compor cerca de 70% da força de trabalho em saúde no Brasil – dado que, no momento em que esses dados foram coletados, durante a primeira onda, os profissionais de saúde foram o grupo mais infectado pelo vírus do SARS-CoV-2 (ROGATKO; BEIGUELMAN; MATOS et al; HERNANDES; VIEIRA). Nesse sentido, esses profissionais, que são mais frequentemente testados para a doença, compõem parte importante da coorte.

Além dos dados referentes a gênero, considerou-se a avaliação de dados de cor/etnia dos indivíduos componentes da coorte. Entretanto, devido ao viés que pode estar presente nessas informações, como foi relatado por SILVA et al., que utilizou uma amostragem semelhante à do presente trabalho, preferiu-se por não utilizá-los para análises neste estudo, tendo em vista que a autodeclaração em relação a cor/etnia não é fidedigna para critérios de avaliação populacional.

Neste estudo, o grupo “óbitos” totalizou 72 indivíduos, sendo 45 do sexo masculino e 27 do sexo feminino. Em relação ao sexo masculino, foram identificados: 8 indivíduos (17,8%) homozigotos selvagens (TT), 30 indivíduos (66,6%) heterozigotos (TC) e 7 indivíduos (15,6%) homozigotos mutantes (CC). Em relação ao sexo feminino, foram encontrados 6 indivíduos (22,2%) homozigotos selvagens (TT), 16 (59,2%) heterozigotos (TC) e 5 (18,6%) indivíduos homozigotos mutantes (CC).

O grupo “internação” foi composto por 58 indivíduos, sendo eles 33 do sexo masculino e 25 do sexo feminino. Quanto ao sexo masculino, verificou-se: 5 indivíduos (15,1%) homozigotos selvagens (TT), 21 indivíduos (63,6%) heterozigotos (TC) e 7 indivíduos (21,2%) homozigotos mutantes (CC). Já em relação ao sexo feminino, foram: 5 indivíduos homozigotos selvagens (TT), 17 indivíduos heterozigotos (TC) e 3 indivíduos homozigotos mutantes.

No grupo COVID-19 Positivo, composto por 44 pacientes, foram 19 indivíduos do sexo masculino e 25 do sexo feminino. Dentre os do sexo masculino, 3 indivíduos (15,8%) eram homozigotos selvagens (TT), 14 (73,7%) eram heterozigotos (TC) e 1 (10,5%) era homozigoto mutante (CC). No sexo feminino, nenhum indivíduo (0%) foi identificado como homozigoto selvagem, mas houveram 24 indivíduos (96%) heterozigotos (TC) e 1 indivíduo (4%) homozigoto mutante (CC).

O último grupo, COVID-19 Negativo, composto por 51 indivíduos, tem 9 componentes do sexo masculino e 42 do sexo feminino. Quanto ao sexo masculino, tem-se que 2 indivíduos (22,2%) são homozigotos selvagens (TT), 3 (33,3%) são heterozigotos (TC) e 4 (44,5%) são mutantes (CC). No subgrupo do sexo feminino, 7 indivíduos (16,7%) são homozigotos selvagens (TT), 23 (54,8%) são heterozigotos (TC) e 12 (28,5%) são homozigotos mutantes (CC).

Tabela 4 - Quantidade de pacientes separados por genótipos em cada grupo (óbitos, internação, COVID Positivo e COVID Negativo).

Grupos (n=225)				
Genótipo	Óbitos (%) N=72	Internação n (%) N=58	COVID Positivo n (%) N= 44	COVID Negativo n (%) N=51
rs1800871				
TT	14 (19,4%)	10 (17,2%)	3 (6,8%)	9 (17,6%)
TC	46 (63,9%)	38 (65,5%)	38 (86,4%)	26 (51%)
CC	12 (16,7%)	10 (17,3%)	2 (4,6%)	16 (31,3%)
Alelos				
T	74 (51,4%)	58 (50%)	44 (51,2)	44 (43,1%)
C	70 (48,6%)	58 (50%)	42 (48,8%)	58 (56,9%)

Fonte: produzida pelo autor.

Tabela 5 - : frequência genotípica e alélica da mutação -819 T>C em cada grupo analisado: óbitos, internação, COVID positivo e COVID negativo.

Grupos	Total (n=225)	Frequência Genotípica			Frequência Alélica		Equilíbrio de Hardy- Weinberg	Valor de P*
		TT	TC	CC	T	C		
Óbitos	72	0,21	0,61	0,18	0,515	0,485	0,05	p>0,05
Internação	58	0,172	0,655	0,172	0,5	0,5	0,1	p>0,05
COVID Positivo	44	0,07	0,86	0,07	0,5	0,5	0,52	p>0,05
COVID Negativo	51	0,216	0,510	0,274	0,47	0,53	0	p>0,05

Fonte: produzida pelo autor.

Estatisticamente, os dados de frequência genotípica associam-se com o perfil clínico dos indivíduos investigados. Este resultado implica em dizer que os genótipos identificados diferem entre os grupos amostrais. Nesse sentido, ao avaliar-se quais grupos amostrais apresentam a associação genótipo vs. perfil clínico, pôde-se identificar que houve diferença estatisticamente significativa ao comparar-se os grupos “óbitos” vs. “positivos” ($X^2=8,233$; $p=0,0163$), “enfermaria” vs. “positivos” ($X^2=6,389$; $p=0,041$) e “positivos” vs. “negativos” ($X^2=15,57$; $p=0,0004$). Assim, o grupo “positivos” foi o que apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a todos os outros grupos. Os dados de frequência alélica encontram-se em equilíbrio em todos os grupos, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles, como foi demonstrado na tabela 5.

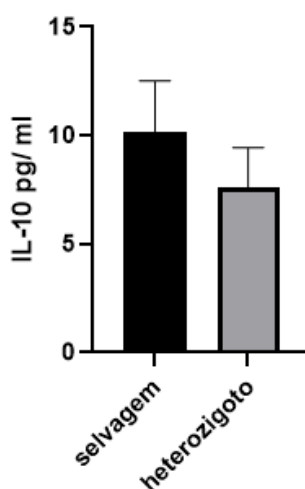
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 3,5% indicando oito amostras testadas neste estudo. (Foi utilizado marcador de peso molecular de 100bp; H: heterozigoto (genótipo TC), S: selvagem (genótipo TT), M: mutante (genótipo CC).



Fonte: produzida pelo autor.

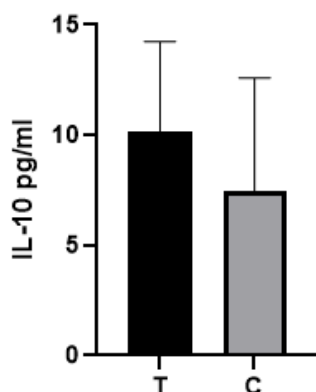
A figura 5 demonstra a realização da eletroforese para genotipagem da mutação rs1800871. O tamanho total do fragmento é de 209 pares de base (bp, na sigla em inglês), com fragmentos de tamanho 126bp e 83bp. A figura demonstra exemplos todos os genótipos obtidos durante a genotipagem, na prática, de acordo com os padrões exemplificados na figura 4.

Figura 9 - Média dos níveis de IL-10 em pg/ml dosados em pacientes com genótipos selvagem (TT) e heterozigoto (TC) de uma parcela do grupo "óbitos". Não foram incluídos nessa análise os pacientes com genótipo mutante (CC).



Fonte: produzida pelo autor.

Figura 10 - Média dos níveis de IL-10 em pg/ml dos pacientes portadores dos alelos T (selvagem) e C (mutante) em uma parcela do grupo "óbitos".



Fonte: produzida pelo autor.

Nas figuras 6 e 7 estão demonstrados os dados de 13 pacientes pertencentes ao grupo óbitos e seus respectivos genótipos e dosagem de IL-10 no plasma (em picogramas/ml). Pode-se perceber, entre os pacientes, a predominância daqueles portadores de genótipo heterozigoto para a mutação, sendo 9 indivíduos portadores desse genótipo (TC), ainda que esta seja uma amostra muito pequena para ser representativa dos 72 pacientes pertencentes ao mesmo grupo.

Tabela 6: Comparação entre valores da dosagem de IL-10 e presença dos alelos selvagem (T) e mutante (C) dos pacientes da tabela 6 em *log*. Não foi encontrada significância estatística (valor de $p > 0,05$).

ALELOS	Média (log)	Desvio padrão (DP)
T (selvagem)	2,02	0,55
C (mutante)	1,85	0,54
Valor de p: 0,43		

Fonte: produzida pelo autor.

Na tabela 6, estão demonstrados os dados referentes à realização de um teste paramétrico (teste T) que comparou a dosagem de IL-10 referente aos pacientes representados nas figuras 6 e 7. A média (em log) de alelo selvagem (T) foi de 2,02 pg/ml, com desvio padrão (DP) de 0,55. Quanto ao alelo mutante (C), a média foi de 1,85 pg/ml, com DP de 0,54. O valor de p da comparação entre ambos foi de 0,43, logo, não foi encontrada significância estatística. Tal fato possivelmente

decorre do diminuto número de pacientes pertencentes ao grupo óbitos que tiveram suas amostras dosadas (apenas 13) e análises futuras são necessárias para avaliar se há ou não associação significativa entre a presença de um dos alelos e a dosagem de IL-10, apesar de, a princípio, os pacientes portadores do alelo T apresentarem maior dosagem da citocina.

Tabela 7: Comparação entre genótipos dos pacientes da tabela 6 e dosagem de IL-10 média (em log). Não foi encontrada significância estatística (valor de $p > 0,05$).

Genótipo	Média (log)	Desvio padrão (DP)
Selvagem (TT)	2,26	0,42
Heterozigoto (TC)	1,86	0,6
Valor de p: 0,31		

Fonte: produzida pelo autor.

Na tabela 7, estão demonstrados os dados referentes à realização de um teste paramétrico (teste T) que comparou a dosagem de IL-10 referente aos pacientes representados na tabela 6 em relação aos genótipos selvagem (TT) e heterozigoto (TC). Não foi realizada comparação com o genótipo mutante (CC). Em relação ao genótipo selvagem (TT), a média em log foi de 2,26 pg/ml, com desvio padrão (DP) de 0,42. Já no heterozigoto (TC), a média foi de 1,86 pg/ml e desvio padrão de 0,6. Assim como na comparação alélica, não foi encontrada significância estatística entre os parâmetros (valor de $p > 0,05$). Novamente, isso provavelmente se deve ao N reduzido de pacientes, cabendo novas análises mais extensas.

Todos os grupos amostrais foram avaliados para o Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW). O equilíbrio de Hardy-Weinberg é um dos principais pilares da genética de populações. Nesse sentido, ele se baseia em alguns princípios a fim de se considerar que determinada população se encontra em equilíbrio, que são: taxa nula de mutações, segregação mendeliana, ausência de seleção alélica ou gamética, “matching” randômico, ausência de flutuação genética e população infinita (BEIGUELMAN; ROGATKO). Dessa forma, a frequência dos alelos deve ser constante, sem fatores evolutivos influenciando no perfil genético da população.

Para avaliar se a população neste estudo está ou não em EHW, aplicou-se o teste de qui-quadrado (X^2) a fim de comparar os valores obtidos entre frequência esperada e a observada para os genótipos relacionados à variante. Assim, valores de “p” menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados para rejeitar a hipótese nula,

que neste caso é de que a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Na tabela 5 estão descritos os dados de frequência genotípica e alélica por grupos (óbitos, internações, COVID-19 positivos e COVID-19 negativos), além dos valores de X^2 e de p .

É importante salientar, novamente, que grupos amostrais fora do EHW indicam eventos que alteraram o equilíbrio genético daquela população – ou, simplesmente, uma escolha não randomizada da amostragem, como no caso, uma vez que os indivíduos foram selecionados entre aqueles que portavam especificamente a infecção pelo SARS-CoV-2

Diversos estudos ao longo dos anos buscaram avaliar a relação entre polimorfismos de IL-10 e diversas doenças, tendo em vista o caráter pleiotrópico dessa citocina na resposta imunológica. MOUGHIMI et al., em sua meta-análise acerca da relação entre polimorfismos de IL-10 e câncer de mama na população iraniana, encontrou relação entre os genótipos TC e CC e maior susceptibilidade à doença. KOSS et al. avaliou a relação entre o polimorfismo -819 (T>C), maior produção de IL-10 e doenças inflamatórias intestinais (Doença de Crohn e Retocolite ulcerativa), percebendo que o alelo C estava mais presente nos pacientes portadores das doenças em questão. Além disso, o estudo de YE et al. relacionou a presença do alelo C e do genótipo CC do polimorfismo como tendo associação com o risco de infecção por HBV (Vírus da Hepatite B).

Alguns estudos encontraram diferentes resultados para a mesma doença, como é o caso de MOHAMMADI et al. e MOURA et al. e o estudo do Lúpus Eritematoso Sistêmico. O primeiro encontrou associação entre o polimorfismo em questão e o risco aumentado de desenvolver LES pelo aumento da produção de IL-10. No entanto, o segundo, um estudo brasileiro, não encontrou esse mesmo resultado.

CHAGAS et al., em um estudo brasileiro que buscou associação entre dois polimorfismos de IL-10 (-1082 e -819) e HPV, definiu que a população estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para ambos os SNPs, além de não haver relação entre a ocorrência da doença e os polimorfismos. A população deste estudo, como pôde ser observado na tabela, também encontra-se em EHW.

A partir disso, fica claro o quão variável é a associação entre o polimorfismo -819 T>C (rs1800871) e diversas doenças. Nos artigos brasileiros citados, todas as

populações avaliadas para LES e HPV, uma doença autoimune e viral, respectivamente, estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, demonstrando, talvez, um equilíbrio geral da presença dos alelos selvagem (T) e mutante (C) na população brasileira, como foi encontrado pelo presente estudo.

Tal resultado é reforçado por estudos anteriores que analisaram o mesmo polimorfismo. AVENDAÑO-FÉLIX et al., em um estudo sobre diferentes polimorfismos de IL-10 e sua relação com a COVID-19 de 2021, verificaram que todos a população participante do estudo (N=193) estava dentro dos parâmetros para EHW em todos os casos, e comparações entre pacientes considerados “graves” e “não graves” e entre “sobreviventes” e “óbitos” não foram estatisticamente significantes. Os autores encontraram uma relação entre a maior prevalência de mialgia e obesidade em pacientes com genótipo CC e TC, somente, algo que não foi analisado neste trabalho.

Assim, os resultados deste estudo encontram concordância na literatura avaliada em relação ao equilíbrio populacional, mas ainda cabem outras análises para avaliar, por exemplo, a relação entre os genótipos desse polimorfismo (TT, TC e CC) e a produção de IL-10 durante o curso da COVID-19 a partir das análises coletadas de forma mais ampliada. Além disso, deve ser feita a relação entre esse polimorfismo e outros encontrados para outras citocinas a fim de perceber se existe associação entre polimorfismos associados e quadros clínicos da doença.

CONCLUSÕES

Este trabalho descreve pela primeira vez a frequência do polimorfismo -819 T/C (rs1800871) na população da região Oeste da Bahia, sendo de grande importância para a compreensão do panorama genético do local. Assim, é possível concluir que:

- Avaliando-se a mutação isoladamente, as frequências genotípicas diferiram entre os grupos analisados
- Os indivíduos do grupo “positivos” diferiram na frequência genotípica em relação a todos os outros grupos, o que pode indicar um fator protetivo do alelo C da mutação -819 T/C quando se trata de casos graves (“óbitos” e “internação”)
- A população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo
- A idade é um fator significativo para a ocorrência dos fenótipos clínicos da COVID-19.

REFERÊNCIAS

WHO CORONAVIRUS DASHBOARD. <https://covid19.who.int/>, 01 de junho de 2022.

LEE, SangJoon; CHANNAPPANAVAR, Rudragouda; KANNEGANTI, Thirumala-Devi. Coronaviruses: Innate Immunity, Inflammasome Activation, Inflammatory Cell Death, and Cytokines. **Trends in Immunology**, novembro, 2020

MOTTA, Juan Camilo; NOVOA, Danny Julian; GÓMEZ, Carmen Cecilia; MORENO, Julian Mauricio; VARGAS, Lina; PÉREZ, Jairo; MILLÁN, Henry; ARANGO, Álvaro Ignacio. Factores pronósticos en pacientes hospitalizados con diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 en Bogotá, Colombia. **Biomédica**, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 116-130, 30 out. 2020. Instituto Nacional de Salud (Colombia).

PAINEL CORONAVÍRUS. 2020. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br>. Acesso em 01/04/2021

TAY, Matthew Zirui et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*, p. 1-12, 2020.

SHAH, Vibhuti Kumar; FIRMAL, Priyanka; ALAM, Aftab; GANGULY, Dipyaman; CHATTOPADHYAY, Samit. Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons From The Past. **Frontiers in Immunology**, agosto, 2020.

ZHANG, Xiaonan; et al. Viral and host factors related to the clinical outcome of COVID-19. **Nature**, maio, 2020.

MATHESON, Nicholas; LEHNER, Paul. How does SARS-CoV-2 cause COVID-19?. **Science**, setembro, 2020.

MELGAREJO, Enrique. COVID-19: extraño nuevo virus, endotelio y enseñanzas de una pandemia. **Acta Médica Colombiana**, [S.L.], v. 45, n. 3, p. 1-4, 23 jul. 2020. Asociacion Colombiana de Medicina Interna

JIANG, Yizhou; RUBIN, Limor; PENG, Tangming; LIU, Linlin; XING, Xingan; LAZAROVICI, Philip; Zheng, Wenhua. Cytokine storm in COVID-19: from viral infection to immune responses, diagnosis and therapy. **International Journal of Biological Sciences**, janeiro, 2022.

ELHABYAN, Abdelazeem et al. The role of host genetics in susceptibility to severe viral infections in humans and insights into host genetics of severe COVID-19: A systematic review. **Virus research**, v. 289, p. 198163, 2020.

MCGONAGLE, Dennis; SHARIF, Kassem; O'REGAN, Anthony;

BRIDGEWOOD, Charlie. The role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like disease. **Elsevier**, junho, 2020.

ZANZA, Christian; ROMENSKAYA, Tatsiana; MANETTI, Alice Chiara; FRANCESCHI, Francesco; LA RUSSA, Raffaele; BERTOZZI, Giuseppe; MAIESE, Aniello; SAVIOLI, Gabriele; VOLONNINO, Gianpietro; LONGHITANO, Yaroslava. Cytokine storm in COVID-19: Immunopathogenesis and Therapy. **MDPI**, janeiro, 2022.

SHIN, Doo Hyoung; PARK, Lae Byung; KIM, Hyo Young; CHEONG, Sub Hyun; LEE, In Hee; PARK, Seung Kyu. Common interleukin 10 polymorphism associated with decreased risk of tuberculosis. **Experimental Molecular Medicine**, abril, 2005.

TARIQUE, Mohammad et al. Association of IL-10 gene polymorphism with IL-10 secretion by CD4 and T regulatory cells in human leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1974, 2020.

HAN, Huan; QINGFENG, Ma; et al. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. **EMERGING MICROBES & INFECTIONS**, maio, 2020

AVENDAÑO-FÉLIX, Mariana et al. Lack of Effects of the Genetic Polymorphisms of Interleukin-10 in Clinical Outcomes of COVID-19. **Viral Immunology**, v. 34, n. 8, p. 567-572, 2021.

CHOUDHARY, Manohar Lal et al. Association of single nucleotide polymorphisms in TNFA and IL10 genes with disease severity in influenza A/H1N1pdm09 virus infections: a study from Western India. **Viral immunology**, v. 31, n. 10, p. 683-688, 2018.

BARKHASH, Andrey V. et al. Single nucleotide polymorphism rs1800872 in the promoter region of the IL10 gene is associated with predisposition to chronic hepatitis C in Russian population. **Microbes and Infection**, v. 20, n. 3, p. 212-216, 2018.

TARIQUE, Mohammad et al. Association of IL-10 gene polymorphism with IL-10 secretion by CD4 and T regulatory cells in human leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1974, 2020.

BAO, Jingui et al. Association between IL-18 polymorphisms, serum levels, and HBV-related hepatocellular carcinoma in a Chinese population: a retrospective case-control study. **Cancer Cell International**, v. 15, n. 1, p. 1-8, 2015.

MANSUR, Antonio de Padua; FAVARATO, Desiderio. Taxas de Mortalidade por Doenças Cardiovasculares e Câncer na População Brasileira com Idade entre 35 e 74 Anos, 1996-2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 117, p. 329-340, 2021.

Li X, Ma X. Acute respiratory failure in COVID-19: is it “typical” ARDS?. *Crit*

Care. 2020;24(1):198

GOMES, Daiene Rosa et al. Interiorização da COVID-19 no Oeste da Bahia: perfil epidemiológico e análise espacial dos óbitos e casos confirmados. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 26, p. 4665-4680, 2021.

BABAPOOR-FARROKHRAN. Savallan; GILL, Deanna; WALKER, Jackson; RASEKHI, Roozbeh; BOZORGNIA, Behnam; AMAMULLAH, Aman. Myocardial injury and COVID-19: Possible mechanisms. **ELSEVIER**, julho, 2020.

MASLO, Caroline et al. Characteristics and outcomes of hospitalized patients in South Africa during the COVID-19 Omicron wave compared with previous waves. **Jama**, v. 327, n. 6, p. 583-584, 2022.

ORELLANA, Jesem Douglas Yamall; MARRERO, Lihsieh; HORTA, Bernardo Lessa. Letalidade hospitalar por COVID-19 em quatro capitais brasileiras e sua possível relação temporal com a variante Gama, 2020-2021. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 30, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Boletim Epidemiológico COVID-19, **Brasília-DF**, nº112. Junho, 2022.

BEIGUELMAN, Bernardo. Genética de populações humanas. **Ribeirão Preto: SBG**, v. 235, 2008.

ROGATKO, Andre; SLIFKER, Michael J.; BABB, James S. Hardy-Weinberg equilibrium diagnostics. **Theoretical population biology**, v. 62, n. 3, p. 251-257, 2002.

MOGHIMI, Mansour et al. Association of IL-10 rs1800871 and rs1800872 polymorphisms with breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, v. 19, n. 12, p. 3353, 2018.

MOURA, Vinícius Braceloti Vilhena de. Associação entre o polimorfismo na região promotora do gene IL10 (-819 T/C) e Lúpus Eritematoso Sistêmico em uma amostra brasileira. 2016.

CHAGAS, Bárbara Simas et al. Significant association between IL10-1082/-819 and TNF-308 haplotypes and the susceptibility to cervical carcinogenesis in women infected by Human papillomavirus. **Cytokine**, v. 113, p. 99-104, 2019.

MOHAMMADI, Saeed et al. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms (rs1800896, rs1800871 and rs1800872) and haplotypes are associated with the activity of systemic lupus erythematosus and IL10 levels in an Iranian population. **International Journal of Immunogenetics**, v. 46, n. 1, p. 20-30, 2019.

YE, Susu et al. Association of TLR3 (rs3775291) and IL-10 (rs1800871) gene polymorphisms with susceptibility to Hepatitis B infection: a meta-analysis. **Epidemiology & Infection**, v. 148, 2020.

SILVA, I.M.G. Investigação das variantes genéticas -617 C>A (rs6721961) e -653 A>G (rs35652124) do gene *NFE2L2* (*NRF2*) em indivíduos com diferentes perfis de resposta clínica à infecção por SARS-CoV-2 na região Oeste da Bahia. Barreiras, 2021, 51p. **Monografia** – Bacharelado em Medicina – Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB).

MATOS, Izabella Barison; TOASSI, Ramona Fernanda Ceriotti; OLIVEIRA, Maria Conceição de. Profissões e ocupações de saúde e o processo de feminização: tendências e implicações. **Athenea digital: revista de pensamento y investigación social**. Barcelona. Vol. 13, n. 2 (jul. 2013), p. 239-244, 2013.

HERNANDES, E.S.C.; VIEIRA, L. A guerra tem rosto de mulher: trabalhadoras de saúde no enfrentamento à covid-19. Associação Nacional dos Especialistas em Políticas Públicas e Gestão Governamental (ANESP), 2020.

VALEZI, Keren Bastos. Epidemiologia genética em leishmaniose visceral: Estudo de associação com a população de Bauru-SP. 2017.

SUN, Jie et al. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. **Nature medicine**, v. 15, n. 3, p. 277-284, 2009.

ROSSI, Átila Duque et al. Differential Expression of Human MicroRNAs During Dengue Virus Infection in THP-1 Monocytes. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, p. 874, 2021.

FICHA DE AVALIAÇÃO FINAL DO PROJETO/TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aluno (a): Danny Victoria Barbosa Moraes

Título: Avaliação do polimorfismo -819 T/C de IL-10 na infecção por SARS-CoV-2 em pacientes da região oeste da Bahia

Orientador(a): Jonilson Berlink Lima

Coorientador(a): Larissa Paola Rodrigues Venancio

Avaliador 1: Ana Isabela Ramos Feitosa de Assis

Avaliador 2: Isabele de Medeiros Lucena

Itens avaliados	Orientador (a)	Coorientador (a)	Avaliador 1	Avaliador 2
Trabalho escrito (0 a 7)	7,0		6,2	6,5
Apresentação Oral (0 a 3)	3,0		3,0	3,0
Nota final (0 a 10)	10,00		9,2	9,5

NOTA FINAL: A nota final será calculada pela média aritmética das notas finais de cada membro da banca. Observações:

BANCA EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
 JONILSON BERLINK LIMA
Data: 22/07/2022 18:24:12-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

(Presidente e Orientador)

Documento assinado digitalmente
 ANA ISABELA RAMOS FEITOSA DE ASSIS
Data: 21/07/2022 11:11:34-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

(Avaliador 01)

Documento assinado digitalmente
 ISABELE SANTANA MEDEIROS DE LUCENA
Data: 21/07/2022 12:47:09-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

(Avaliador 02)

Barreiras, 20 de julho de 2022.