



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

RECHFY KASEM ABOU ALI

ESTUDO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DAS CITOCINAS IL1 β , IL6, IL18 E DO INFLAMASSOMA NLRP1 E NLRP3 EM PACIENTES CONVALESCENTES DA COVID-19 E PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE COVID-19 NO ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL.

MANAUS
2024

RECHFY KASEM ABOU ALI

ESTUDO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DAS CITOCINAS IL1 β , IL6, IL18 E DO INFLAMASSOMA NLRP1 E NLRP3 EM PACIENTES CONVALESCENTES DA COVID- 19 E PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE COVID-19 NO ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como avaliação para o exame de defesa de Doutorado para a obtenção do título de Doutor em Imunologia na área de concentração “Imunologia Básica e Aplicada”.

Orientadora: Dra. Adriana Malheiro Alle Marie

Coorientadora: Dra. Andréa Monteiro Tarragô

**MANAUS
2024**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A398e	<p>Ali, Rechfy Kasem Abou</p> <p>Estudo dos polimorfismos nos genes das citocinas IL1, IL6, IL18 e do inflamassoma NLRP1 e NLRP3 em pacientes convalescentes da COVID- 19 e pacientes com diagnóstico de COVID-19 no Estado do Amazonas, Brasil. / Rechfy Kasem Abou Ali . 2024 90 f.: il. color; 31 cm.</p> <p>Orientadora: Adriana Malheiro Alle Marie Coorientadora: Andrea Monteiro Tarragô Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.</p> <p>1. covid-19. 2. Inflamassomas. 3. Polimorfismos. 4. IL1b. 5. nlrp3. I. Marie, Adriana Malheiro Alle. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título</p>
-------	---

RECHFY KASEM ABOU ALI

ESTUDO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DAS CITOCINAS IL1 β , IL6, IL18 E DO INFLAMASSOMA NLRP1 E NLRP3 EM PACIENTES CONVALESCENTES DA COVID- 19 E PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE COVID-19 NO ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL.

Aprovado em 03 de abril 2024

Banca Examinadora

Professora Doutora Adriana Malheiro Alle Marie
Presidente da banca

Professor Doutor Luís André Morais Mariúba
Membro interno da banca

Professor Doutor Dhêmerson Souza De Lima
Membro externo da banca

Professora Doutora Maria Edilene Martins De Almeida
Membro externo da banca

Professor Doutor Yury Oliveira Chaves
Membro externo da banca

*“Aos meus pais Kasem Abou Ali e Terezinha Abou Ali, irmão Kasem Junior,
meu marido Alessandro Silva, meus filhos Latifah Abou Ali e Kasem Neto!
Que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que
eu chegasse até esta etapa de minha vida.
Vocês são meu alicerce diário!
Obrigada por tudo!
Amo vocês!”*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por todas as oportunidades concedidas a mim, pela força nos momentos de fraqueza e dificuldades.

Aos meus pais Kasem Abou Ali e Terezinha Abou Ali, ao meu irmão Kasem Abou Ali Junior, por todo amor, educação, força, apoio e compreensão ao longo de toda minha vida.

Aos meus filhos Latifah Kasem Abou Ali e Kasem Abou Ali Neto que são o maior presente que Deus poderia ter me dado nesta vida.

Ao meu esposo Alessandro Silva que me compreendeu em todos os momentos de dificuldades, teve paciência nos momentos de estresse, e sempre me incentivando a nunca desistir.

Em especial a Dra. Adriana Malheiro Alle Marie, minha orientadora, pela paciência, apoio, humildade e todos os ensinamentos sobre o amor pela ciência e pesquisa, que para mim transmitiu durante toda minha vida científica. Obrigada por sempre ser tão compreensiva.

A minha coorientadora, Dra Andréa Monteiro Tarragô por toda sua dedicação e por ter estado ao meu lado neste trabalho quando mais tive dificuldade (chorei horrores em sua sala), mas suas sábias palavras sempre me reconfortavam e me davam forças para continuar.

Aos amigos do laboratório LabGen, Nadja Garcia, Luciana Cassa e Rafaella Santos por todo companheirismo e suporte.

Aos meus amigos em especial a Walter Neves, Lilyane Xabregas, Juliana Santos, Regiane Costa, Robson Junior, Bruno Nascimento, Dayane Vieira, Lucas Oliveira e Suelen Farias por todos os momentos inesquecíveis que vivemos juntos nesta jornada (e a hora do cafezinho era o melhor momento), fazia meus dias mais leves.

As minhas alunas de iniciação científica Jackeline Magalhães e Yasmin Rebelo, e a Dayane Vieira que me ajudaram com os resultados obtidos neste trabalho. Em especial a Wivian Silva

que foi minha primeira aluna de iniciação científica em 2019 e agora é minha colega de doutorado, e me ajudou com as análises finais desta tese (fico orgulhosa demais por isso).

À Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM) por me dar a oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV) pelo fornecimento de dados e amostras dos pacientes envolvidos no projeto.

A Fundação Oswaldo Cruz de Minas Gerais Instituto René Rachou (FIOCRUZ-MG) pela parceria em análise das amostras deste estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo investimento de recursos.

À Universidades Federal do Amazonas (UFAM), por esta formação acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA) e a todos os seus integrantes, pela concretização deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para concretização deste sonho.

EPÍGRAFE

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

A infecção pelo vírus SARS-CoV-2, conhecido como coronavírus, pode resultar em um quadro assintomático, quando o indivíduo não apresenta manifestações clínicas, ou quadro clínico que pode variar desde leve a complicações graves. Os achados em pacientes graves chamam atenção pela lesão pulmonar associada a uma intensa inflamação devido a produção de moléculas inflamatórias, denominada de tempestade de citocinas, produzidas principalmente pelo sistema imune inato e os problemas de coagulação, devido a reação inflamatória sistêmica (coagulação intravascular disseminada). Desta forma, avaliamos os polimorfismos das citocinas IL1 β , IL6, IL18, inflamassomas NLRP1 e NLRP3, juntamente com perfil de resposta imune de pacientes convalescentes da COVID-19 atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas e pacientes com COVID-19 atendidos no Hospital Universitário Getúlio Vargas. Foi possível observar diferenças estatísticas entre os genótipos e alelos do NLRP1 (rs35865013), NLRP3 (rs10754558), IL6 (rs1800795) e IL18 (rs1872384) dos grupos controle e convalescente, o que poderia ter alguma relação com a proteção/risco à COVID-19. E os genótipos AA e AG NLRP1 rs35865013 e o genótipo CG da IL18 dos pacientes com COVID-19 podem estar relacionados com proteção contra a doença. As citocinas IL1 β e IL6 apresentaram uma maior concentração sérica nos pacientes com COVID-19, e quando separados entre grupos Alta e Óbito, verificamos que os pacientes que vieram a Óbito apresentaram uma alta produção dessas citocinas. Sendo provável que este aumento significativo de IL1 β e IL6 possa ter levado ao desfecho final desses pacientes. Os pacientes com COVID-19 que apresentaram o genótipo AT NLRP1 rs12150220 tiveram maior concentração de IL1 β quando comparados aos pacientes com genótipo TT. Sugerindo que os pacientes com genótipo AT liberam maior concentração de IL1 β , conseqüentemente, uma melhor resposta da imunidade inata contra a COVID-19. Na comparação dos genótipos AA/AT NLRP1 rs12150220, GG NLRP1 rs35865013, CT/TT NLRP3 rs10802502, CC NLRP3 rs10754558, CC IL1 β rs16944 e GG/GC IL6 rs1800795 dos pacientes com COVID-19 e os pacientes convalescentes nos períodos D30, D60 e D90, foram observadas diferenças estatísticas na produção de IL1 β e IL6, onde os com COVID-19 apresentaram uma maior concentração nos diferentes genótipos. Nosso trabalho ressalta a importância da análise de variações genéticas nos genes do inflamassoma NLRP1 e NLRP3 como possíveis fatores de risco na evolução clínica da COVID-19.

Palavras-chave: COVID-19, Inflamassomas, polimorfismos, citocinas

ABSTRACT

Infection with the SARS-CoV-2 virus, known as coronavirus, can result in an asymptomatic condition, when the individual does not present clinical manifestations, or a clinical condition that can range from mild to serious complications. The findings in critically ill patients draw attention to lung damage associated with intense inflammation due to the production of inflammatory molecules, called cytokine storms, produced mainly by the innate immune system, and coagulation problems, due to a systemic inflammatory reaction (disseminated intravascular coagulation). In this way, we evaluated the polymorphisms of the cytokines IL1 β , IL6, IL18, NLRP1 and NLRP3 inflammasomes, together with the immune response profile of convalescent patients from COVID-19 treated at the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas and patients with COVID-19. 19 treated at the Getúlio Vargas University Hospital. It was possible to observe statistical differences between the genotypes and alleles of NLRP1 (rs35865013), NLRP3 (rs10754558), IL6 (rs1800795) and IL18 (rs1872384) of the control and convalescent groups, which could have some relationship with protection/risk to COVID-19. And the AA and AG NLRP1 rs35865013 genotypes and the IL18 CG genotype of patients with COVID-19 may be related to protection against the disease. The cytokines IL1 β and IL6 showed a higher serum concentration in patients with COVID-19, and when separated between high and Death groups, we found that patients who died had a high production of these cytokines. It is likely that this significant increase in IL1 β and IL6 may have led to the final outcome of these patients. Patients with COVID-19 who presented the AT NLRP1 rs12150220 genotype had a higher concentration of IL1 β when compared to patients with the TT genotype. Suggesting that patients with the AT genotype release a higher concentration of IL1 β , consequently, a better innate immunity response against COVID-19. In the comparison of the genotypes AA/AT NLRP1 rs12150220, GG NLRP1 rs35865013, CT/TT NLRP3 rs10802502, CC NLRP3 rs10754558, CC IL1 β rs16944 and GG/GC IL6 rs1800795 of patients with COVID-19 and convalescent patients in periods D30, D60 and D90, statistical differences were observed in the production of IL1 β and IL6, where those with COVID-19 showed a higher concentration in the different genotypes. Our work highlights the importance of analyzing genetic variations in the NLRP1 and NLRP3 inflammasome genes as possible risk factors in the clinical evolution of COVID-19.

Keywords: COVID-19, Inflammasomes, polymorphisms, cytokines

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição dos casos de SARS-CoV-2 no Brasil por região.	20
Figura 2: Representação do SARS-CoV-2.	22
Figura 3: Demonstração da junção S1/S2 com a ACE2 na célula.	23
Figura 4: Mecanismos moleculares de entrada, replicação e egressão do SARS-CoV-2.	24
Figura 5: Esquema de entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira.	25
Figura 6: Mediação da inflamação pulmonar por NLRP3 a infecção por SARS-CoV-2.	30
Figura 7: Estrutura dos domínios proteicos do NLRP1.	32
Figura 8: Estrutura dos domínios proteicos do NLRP3.	33
Figura 9: Fluxograma da realização do imunoenensaio cromatográfico rápido, utilizando o kit MedTeste Coronavírus (COVID-19) IgG/IgM.	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Concentrações dos mediadores solúveis IL1 β e IL6 em pg/mL, na comparação entre o grupo COVID-19 e convalescentes (D30, D60 e D90).....	50
Gráfico 2: Concentrações dos mediadores solúveis IL1 β e IL6 em pg/ml. Comparação entre os grupos leve, grave e crítico/alta e óbito.....	51
Gráfico 3: Concentrações dos mediadores solúveis IL1 β e IL6 em pg/ml para seus respectivos SNPs, e da concentração de IL1 β para os SNPs das variantes de NLRP1 e NLRP3 nos pacientes com COVID- 19.	52
Gráfico 4: Concentrações dos mediadores solúveis IL1 β e IL6 em pg/ml para seus respectivos SNPs, e da concentração de IL1 β para os genótipos das variantes de NLRP1 e NLRP3 nos pacientes convalescentes da COVID-19 nos períodos D30, D60 e D90.....	53
Gráfico 5: Concentrações das citocinas IL1 β e IL6 em pg/ml para seus respectivos SNPs, e da concentração de IL1 β para os genótipos das variantes NLRP1 e NLRP3, nos pacientes com COVID-19 em comparação com pacientes convalescentes da COVID-19 nos períodos D30, D60 e D90.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação dos pacientes caso Leve, Grave e Crítico da COVID-19	39
Tabela 2. Descrição dos polimorfismos da PCR-RFLP.	42
Tabela 3 Descrição dos polimorfismos da PCR (qPCR).....	43
Tabela 4 Variáveis sociodemográficas de indivíduos do grupo controle, convalescente e pacientes com COVID-19.	45
Tabela 5 Frequência dos alelos e genótipos dos polimorfismos nos genes <i>NLRP1</i> e <i>NLRP3</i> em pacientes convalescentes da COVID-19 e indivíduos controles.	46
Tabela 6 Frequência dos alelos e genótipos dos polimorfismos nos genes <i>NLRP1</i> e <i>NLRP3</i> em Pacientes com COVID-19 separados conforme diagnóstico clínico (Leve, Grave e Crítico) e indivíduos controles.....	47
Tabela 7 Frequência dos alelos e genótipos dos polimorfismos nos genes das citocinas <i>IL1β</i> , <i>IL6</i> e <i>IL18</i> em pacientes convalescentes da COVID-19 e indivíduos controles.	48
Tabela 8 Frequência dos alelos e genótipos dos polimorfismos nos genes <i>IL1β</i> , <i>IL6</i> e <i>IL18</i> em Pacientes com COVID-19 separados conforme diagnóstico clínico (Leve, Grave e Crítico) e indivíduos controles.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM2	Proteína AIM2 induzida por interferon
ASC	Proteína do tipo speck contendo CARD associada à apoptose
ATP	Adenosina trifosfato
CARD	Domínio de recrutamento e ativação de Caspase
CARD8	Domínio de recrutamento da caspase membro da família 8
CARDINAL	Ligante ativado pelo inibidor CARD de NF-κB
cDNA	DNA complementar
CLR	Família lectina do tipo C
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FIIND	Função para encontrar domínio
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Intervalo de Confiança
IFN	Interferon
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
IL3-IGH	Transcrito gênico formado pela fusão dos genes <i>il3</i> e <i>igh</i>
IRAK1	Quinase associada ao receptor de interleucina-1
IKAK2	Quinase associada ao receptor de interleucina-2
Kb	Kilo Base
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
MDP	Muramil-dipeptídeo
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NACHT	Domínio inibitório de apoptose neural
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Células assassinas naturais
NLR	Receptor do tipo NOD

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	SARS-CoV-2 no Brasil e no Mundo	19
2.2	Características Estruturais do SARS-CoV-2	21
2.3	Transmissão	25
2.4	Imunopatogênese na COVID-19	26
2.5	Polimorfismos nos genes dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3	32
2.6	Polimorfismos nos genes das citocinas IL1 β , IL6 e IL18	33
3.	OBJETIVOS	35
3.1	Geral	35
3.2	Específicos.....	35
4.	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	Modelo de Estudo.....	36
4.2	Aspectos Éticos.....	36
4.3	Área de Estudo.....	36
4.4	População de Estudo.....	36
4.5	Pacientes convalescentes (G1).....	37
4.6	Critérios de inclusão	37
4.7	Critérios de não inclusão	37
4.8	Critérios de exclusão	38
4.9	Doadores de sangue saudável (G2)	38
4.10	Pacientes com infecção e sintomáticos para COVID-19 (G3).	38
4.11	Coleta do Material Biológico	39
4.12	Análise da produção de anticorpos	39
4.13	Extração de DNA.....	40
4.14	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	41

4.15	Genotipagem dos Polimorfismos nos Genes Interleucina 1 (IL1 β), Interleucina 6 (IL6) e Interleucina 18 (IL18)	41
4.16	Genotipagem por PCR-RFLP para estudos de polimorfismos.....	42
4.17	Genotipagem por Real-Time Quantitativo PCR (qPCR)	42
4.18	Dosagem de Citocinas Plasmáticas	43
4.19	Análise Estatística.....	44
5.	RESULTADOS.....	45
6.	DISCUSSÃO	57
7.	CONCLUSÃO	64
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXOS	77

1. INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019 foi anunciado na China um novo surto pelo SARS-CoV-2, causador da doença COVID-19, esse vírus veio se espalhando pelo mundo em um curto espaço de tempo. Este rápido avanço na transmissão do SARS-CoV-2 e a alta infectividade provocada por este vírus, fez com que no dia 11 de março de 2020, a OMS declarasse emergência global de saúde pública (Pandemia). Depois de três anos, e mais de sete milhões de mortos em todo o mundo, no dia 05 de maio de 2023, a OMS anunciou o final do estado de emergência em saúde pública de importância internacional para a pandemia de COVID-19. Esse anúncio do fim da Pandemia não significa que a COVID-19 tenha deixado de ser uma ameaça à saúde, sendo assim a propagação mundial do vírus SARS-CoV-2 continua (WHO, 2024)

A infecção na maioria das vezes desencadeia um quadro leve, mas em uma pequena parte da população infectada, o quadro clínico vai de moderado à grave em um curto espaço de tempo. Os pacientes graves desenvolvem um processo inflamatório altamente exacerbado, com quadro pulmonar grave, com a presença de uma tempestade de citocinas e mediadores inflamatórios, culminando em edema e muitas vezes formação de trombos (AN; ZHU; YANG, 2020a; FUNG et al., 2020a; WHO, 2024).

Os polimorfismos genéticos nos genes das citocinas podem levar a uma resposta imune alterada e, por sua vez, influenciar o risco ou o resultado de uma doença infecciosa. Os genes das citocinas têm significativo papel no controle dos mecanismos da resposta imune e por isso, os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*/Polimorfismo de nucleotídeo único) destes genes vem sendo amplamente estudados. (DE SÁ et al., 2022; NEIRA-GOULART et al., 2023). Embora vários investigadores tenham relatado relações entre polimorfismos genéticos nas citocinas ou nos receptores de citocinas em várias doenças, o papel de tais polimorfismos não foram descritos na resposta infecciosa à COVID-19 na população do Amazonas-Brasil.

Muitos fatores estão envolvidos neste processo inflamatório, desde as células da resposta imune, como as citocinas que regulam a transmigração de células para os pulmões, assim como mediadores lipídicos e fatores genéticos associados ao perfil da resposta imune desenvolvida por estes indivíduos (HE et al., 2006a; SONG et al., 2020a). No entanto, até o momento pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na resposta imune que levam o indivíduo a cura ou a progressão grave da doença. Desta forma, se faz necessário estudos amplos em diferentes populações de pacientes com COVID-19 para o entendimento dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório destes pacientes.

Dessa maneira, é importante entender a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3, como também os polimorfismos nos genes das citocinas IL1 β , IL6 e IL18 e sua relação com a quantidade de citocinas IL1 β e IL6 circulantes nos pacientes convalescentes da COVID-19 e pacientes com COVID-19, para compreender a associação genética entre esses polimorfismos e a resposta imunológica da infecção pelo SARS-CoV-2, principalmente no Estado do Amazonas, onde a pandemia foi intensificada por um grande número de pacientes graves e alto índice de mortalidade, durante duas ondas da infecção (FVS-AM, 2024). Este fato sugere que fatores genéticos do indivíduo, não só do vírus, podem estar envolvidos na evolução clínica da doença.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 SARS-CoV-2 no Brasil e no Mundo

Em 31 de dezembro de 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS) foi alertada a respeito de um surto de pneumonia na cidade de Wuhan, província de Hubei, na República Popular da China. Tratava-se de uma nova cepa de coronavírus, que até então, ainda não havia sido descrita em seres humanos. Filogeneticamente, esse novo vírus é altamente homólogo ao coronavírus (CoV) que causou um surto de síndrome respiratória aguda grave (SARS) em 2003, sendo então nomeado SARS-CoV-2 pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) e Organização Mundial da Saúde, (OMS) em 11 de fevereiro de 2020, e a doença associada foi chamada de doença do coronavírus 2019 (COVID-19), (VELAVAN; MEYER, 2020; ZHANG, 2020; ZHOU et al., 2020b).

A infecção por SARS-CoV-2 aumentou rapidamente em escala epidêmica, listada como Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional pela OMS em 30 de janeiro de 2020. Em 11 de março de 2020, a COVID-19 foi caracterizada pela OMS como uma pandemia. A rápida disseminação e as medidas de controle de saúde pública que se seguiram levaram ao isolamento e quarentena sem precedentes, (BALKHAIR, 2020; SHIRANI et al., 2020; WHO, 2022).

O SARS-CoV-2 é altamente transmissível, capaz de causar um amplo espectro de manifestações clínicas em pacientes com COVID-19, podendo variar de resfriado até uma pneumonia grave. Os sintomas mais comuns da COVID-19 são: febre, tosse seca e fadiga, outros sintomas que são menos comuns e podem afetar alguns pacientes incluem a perda de paladar ou cheiro, congestão nasal, conjuntivite (também conhecida como olhos vermelhos), dor de garganta, dor de cabeça, dores musculares ou articulares, diferentes tipos de erupção cutânea, náusea ou vômito, diarreia, calafrios ou tonturas, (WHO, 2022; XAVIER et al., 2020).

Os sintomas da doença COVID-19 grave é a falta de ar, perda de apetite, confusão, dor persistente ou pressão no peito, alta temperatura (acima de 38°C). Os sintomas menos comuns são a irritabilidade, confusão, consciência reduzida (às vezes associada às convulsões), ansiedade, depressão, distúrbios do sono, complicações neurológicas mais graves e raras, como acidentes vasculares cerebrais, inflamação do cérebro, delírio e danos aos nervos, (WHO, 2022; XAVIER et al., 2020; ZHENG et al., 2020).

Globalmente, foram confirmados 774.771.942 casos de COVID-19 e 7.035.337 mortes até 07 de março de 2024, e um total de 13.59 bilhões doses de vacinas foram administradas. Na mesma data, o Brasil confirmou 38.592.310 casos e 710.427 mortes, com 1,8% de letalidade, e um total de 547.460.755 doses de vacinas foram administradas (BRASIL, 2024; WHO, 2024).

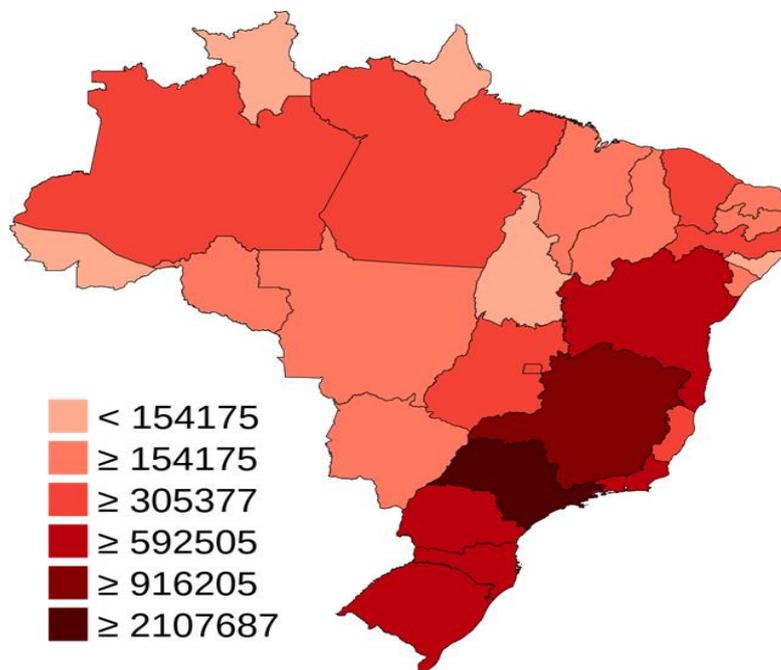


Figura 1: Distribuição dos casos de SARS-CoV-2 no Brasil por região. Fonte: (BRASIL, 2022)

No Estado do Amazonas, os números de casos observados trouxeram preocupação e alerta nacional, com 641.681 casos confirmados e 14.491 óbitos, considerando que ainda pode haver casos subnotificados. De acordo com o Boletim epidemiológico de 06 de março de 2024, entre os casos graves da COVID-19, observa-se predomínio de pessoas com cardiopatias e diabéticos, presente em 34,9% e 28,1% dos óbitos respectivamente, (FVS-AM, 2024; RANZANI et al., 2021).

Em relação à faixa etária dos pacientes internados, mais de 60% dos homens que necessitaram de internação em UTI tinham 60 anos ou mais, o grupo com idade entre 20 e 59 anos do sexo masculino, compreende mais da metade dos casos de internação em UTI. As internações entre as mulheres na faixa etária de 60 anos ou mais correspondeu a 57% das internações em 2020 contra 51% em 2021. Em 2020, 70% dos pacientes que evoluíram para óbito apresentavam pelo menos 1 comorbidade, em 2021 essa proporção reduziu para 57%. Nessas pessoas, as comorbidades mais frequentes continuam sendo as cardiopatias, seguido de diabetes e hipertensão (FVS-AM, 2024; ORELLANA et al., 2021).

Com relação aos óbitos por COVID-19, pessoas da faixa etária de 60 anos ou mais continuam apresentando a maior proporção deste desfecho, para ambos os sexos. No entanto, observa-se um aumento da proporção de óbitos na faixa etária de 20 a 59 anos que, em 2020 representavam 25% dos óbitos e agora compreendem 32% no sexo feminino e 39% no sexo masculino. A taxa de letalidade por COVID-19 no Amazonas, em 2021, foi de 5%, isto é, a cada 100 pessoas infectadas, 5 evoluem para óbito. A maior letalidade ocorre em pacientes com 60 anos, em ambos os períodos, (FVS-AM, 2024; ORELLANA et al., 2021).

Quando comparamos as taxas de infecções entre o 1º (2020) e 2º (2021) período da pandemia no Amazonas, observamos que a maior proporção de casos de COVID-19 continua ocorrendo em pessoas da faixa etária de 20 a 59 anos, possivelmente porque este grupo é o que mais se expõe ao risco de infecção, como também o aumento no número de hospitalizações nesta faixa etária, comparado com 2020, quando a maior proporção de internações era de pessoas com 60 anos ou mais. Houve um aumento na proporção de internações em leitos de UTI por pessoas da faixa etária de 20 a 59 anos do sexo masculino, quando a maior proporção em 2020 era de pessoas com 60 anos ou mais. Em relação à taxa de óbitos houve um aumento na faixa entre 20 e 59 anos, e a maior letalidade continua sendo de pacientes com 60 anos ou mais. Teve aumento também na proporção de internações em leitos de UTI e óbitos por pessoas sem comorbidades em 2021, (FVS-AM, 2024; WHO, 2022).

2.2 Características Estruturais do SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2, pertence a uma grande família de vírus denominada Coronavírus (CoVs), que podem ser divididos em quatro gêneros, alfa, beta, gama e delta, dos quais alfa e beta-CoVs são conhecidos por infectar seres humanos, (WILDE et al., 2018). Nos últimos anos, foram descritos CoVs humanos altamente patogênicos, SARS-CoV e MERS-CoV, que causaram um surto originalmente na China em 2003 e na Arábia Saudita em 2012, respectivamente. (PAULES; MARSTON; FAUCI, 2020).

O atual SARS-CoV-2, responsável pelo terceiro surto de CoV na história registrada de seres humanos, pertence à família *Coronaviridae*, ao gênero *Betacoronavirus*, está incluso no grupo IV pela classificação de Baltimore, com genoma de RNA de fita simples de polaridade positiva (ssRNA), com aproximadamente 26 a 32kb. A partícula viral é envelopada, com morfologia esférica, com 100 a 160nm de diâmetro, (ANDERSEN et al., 2020; LI et al., 2020b; VIRALZONE, 2020).

Os coronavírus consistem em quatro proteínas estruturais: a proteína do nucleocapsídeo (N) forma o capsídeo helicoidal para acomodar seu genoma. Toda a estrutura é ainda envolvida por um envelope lipídico, que é feito de proteínas S (*spike*), E (envelope) e M (membrana) (Figura 2). A membrana e as proteínas do envelope são necessárias para a montagem do vírus e a proteína *spike* participa do processo de reconhecimento e entrada do vírus nas células dos hospedeiros, (JIN et al., 2020).

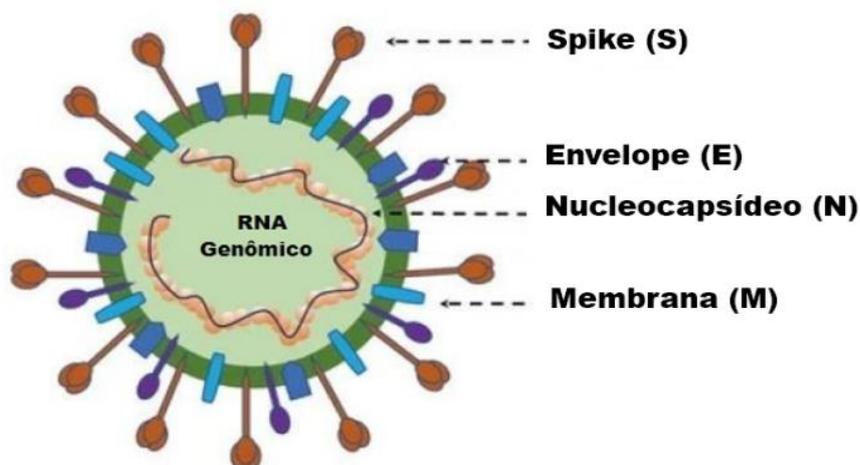


Figura 2: Representação do SARS-CoV-2. Fonte: Adaptado (JIN et al., 2020)

As glicoproteínas *spike* (S), formam grandes saliências (peplômeros) na superfície do vírus semelhante a coroas e, portanto, chamada de “CORONA” (latim= coroa). Composta por três segmentos: (1) ectodomínio grande, (2) domínio transmembranar e (3) cauda intracelular. Sendo um trímero em forma de cravo com três cabeças S1 e uma haste S2 trimérica. As subunidades S1 e S2 de ligação ao receptor são colocadas na região do ectodomínio. Durante a infecção, a S1 se liga ao receptor do hospedeiro e a S2 funde a membrana do hospedeiro às membranas virais, liberando assim o genoma viral na célula (Figura 3) (YESUDHAS; SRIVASTAVA; GROMIHA, 2021).

A glicoproteína S é expressa na superfície dos vírions SARS-CoV-2, se ligam à Enzima Conversora da Angiotensina 2 (ACE2) nas células hospedeiras e invadem as células por fusão de membrana ou endocitose. Para iniciar a fusão da membrana, as glicoproteínas S precisam sofrer clivagem por proteases endógenas, o que permite que elas se engajem na ACE2 mais avidamente (OU et al., 2020). Algumas proteases envolvidas neste processo já foram identificadas, por exemplo, furina e TMPRSS2, no entanto, outras proteases também podem estar envolvidas (Figura 3), (HOFFMANN et al., 2020).

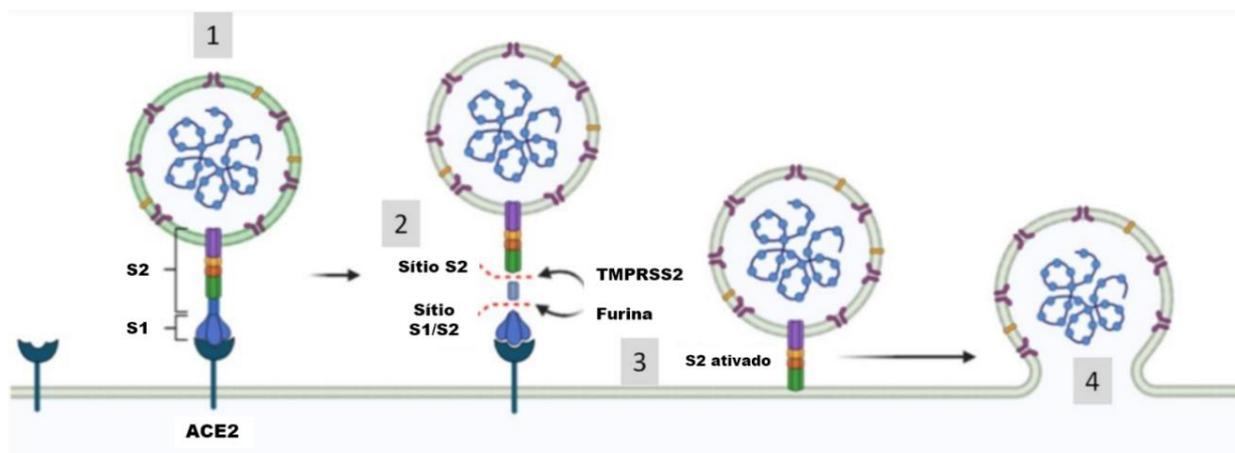


Figura 3: Demonstração da junção S1/S2 com a ACE2 na célula. Fonte: Adaptado (VILLOUTREIX et al., 2021)

Além disso, o acoplamento de SARS-CoV-2 à membrana celular é facilitado por proteoglicanos de sulfato de heparano na célula hospedeira, que interagem com as glicoproteínas S. Na glicoproteína S da SARS-CoV-2, três novos sítios de ligação ao glicosaminoglicano foram recentemente descritos, um dos quais está localizado no local de clivagem S1/S2, (KIM et al., 2020b). Esta descoberta implica ainda o envolvimento de proteoglicanos da superfície da célula hospedeira no processo de entrada na célula (FENRICH et al., 2020; MUKHERJEE; MAHATA, 2021).

A entrada endocitótica em Coronaviridae depende da localização de seus receptores nas membranas, uma vez que eles medeiam esse processo. Este mecanismo compartilha os mesmos princípios de ativação com o sistema renina-angiotensina-aldosterona, sugerindo sua origem filogenética comum. O processo inicial da endocitose dependente de ACE2 pelo SARS-CoV-2 foi relatada como dependente de bifosfato de fosfatidilinositol. A entrada independente de protease e mediada por mediadores lipídicos pode simular a ativação fisiológica do receptor pela angiotensina II, o que resulta em seu recrutamento para o sistema renina-angiotensina intracelular (CHEN et al., 2012; FENRICH et al., 2020; OU et al., 2020).

Após a endocitose de ACE2, as proteases da cathepsina L lisossomal são normalmente levadas para o endossomo. Foi recentemente demonstrado que a cathepsina L é capaz de clivar as glicoproteínas S, permitindo que os vírions iniciem a fusão, escapem dos endossomos e liberem suas proteínas e material genético no citosol. Por depender preferencialmente da endocitose em vez da fusão da membrana, o SARS-CoV-2 provavelmente adia sua detecção

pelo sistema imunológico, porque dessa forma menos proteínas virais antigênicas são deixadas na superfície da célula (FENRICH et al., 2020; MAO et al., 2020).

A ativação dos mecanismos moleculares de entrada, replicação e saída das células pelo SARS-CoV-2, ocorre quando o vírus invade a célula atracando nos proteoglicanos da superfície celular e envolvendo o receptor ACE2 com a glicoproteína (S). Se a glicoproteína S for clivada por proteases do hospedeiro (TMPRSS2), a entrada por fusão de membrana ou endocitose aconteceria. Caso a clivagem não ocorra, o vírus invadirá a célula por meio de endocitose mediada por receptor. As proteases lisossomais (Catepsina L) eventualmente clivam as glicoproteínas S. Isso permite que eles induzam a fusão da membrana e liberem as proteínas virais e o RNA no citoplasma (Figura 4), (BADAWI; ALI, 2021; ZHANG; FRIEDMAN, 2021).

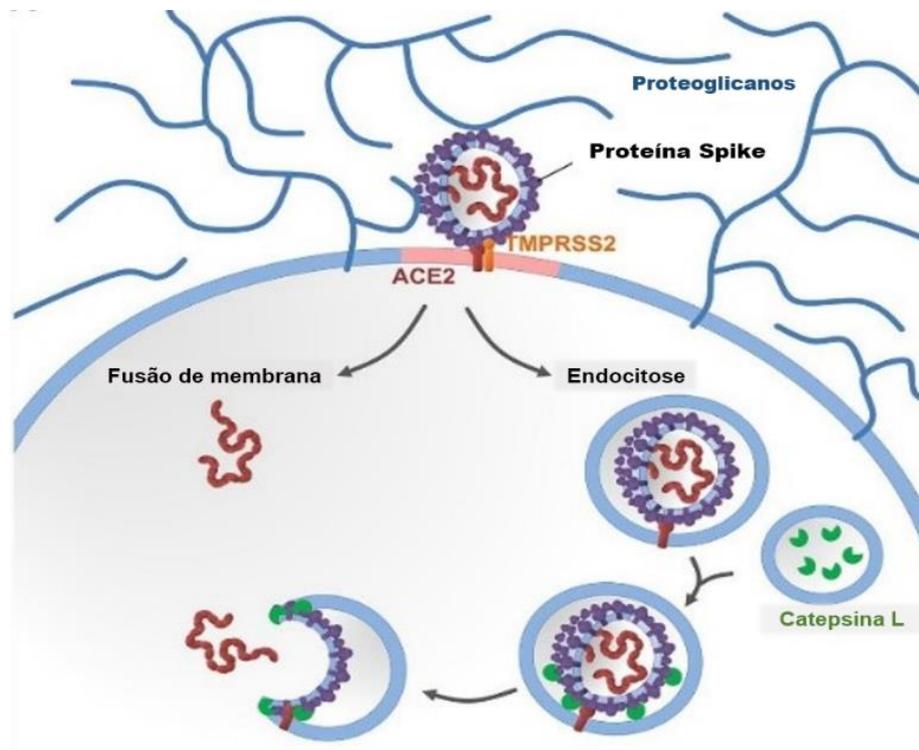


Figura 4: Mecanismos moleculares de entrada, replicação e egressão do SARS-CoV-2. Fonte: Adaptado (FENRICH et al., 2020)

O vírus entra na célula (1), libera seu material genético (2) e se replica no núcleo da célula. Os vírions que não obtêm suas glicoproteínas S iniciadas por proteases lisossomais seriam, posteriormente, levados para vários compartimentos da membrana celular (3), o que possivelmente modula seu metabolismo e altera sua morfologia. Isso resulta no surgimento de um sistema membranoso denominado rede retículo vesicular. A tradução do RNA mensageiro

viral, a síntese de proteínas virais e a montagem de novos vírions ocorrem dentro dessa rede e de outras vesículas intracelulares (4). Novos vírions deixam a célula infectada por brotamento através de bolsas lipídicas, seja por egressão mediada por fusão de membrana ou por exossomos (5). A clivagem intracelular da glicoproteína S pela furina ou proteases TMPRSS2 permitiria aos vírions induzir a fusão da membrana. Alternativamente, a montagem de vírions dentro de vesículas secretoras permitiria que eles fossem transportados para a membrana celular apical (6) ou membrana pré-sináptica (no caso dos neurônios) (Figura 5) (FENRICH et al., 2020; XAVIER et al., 2020).

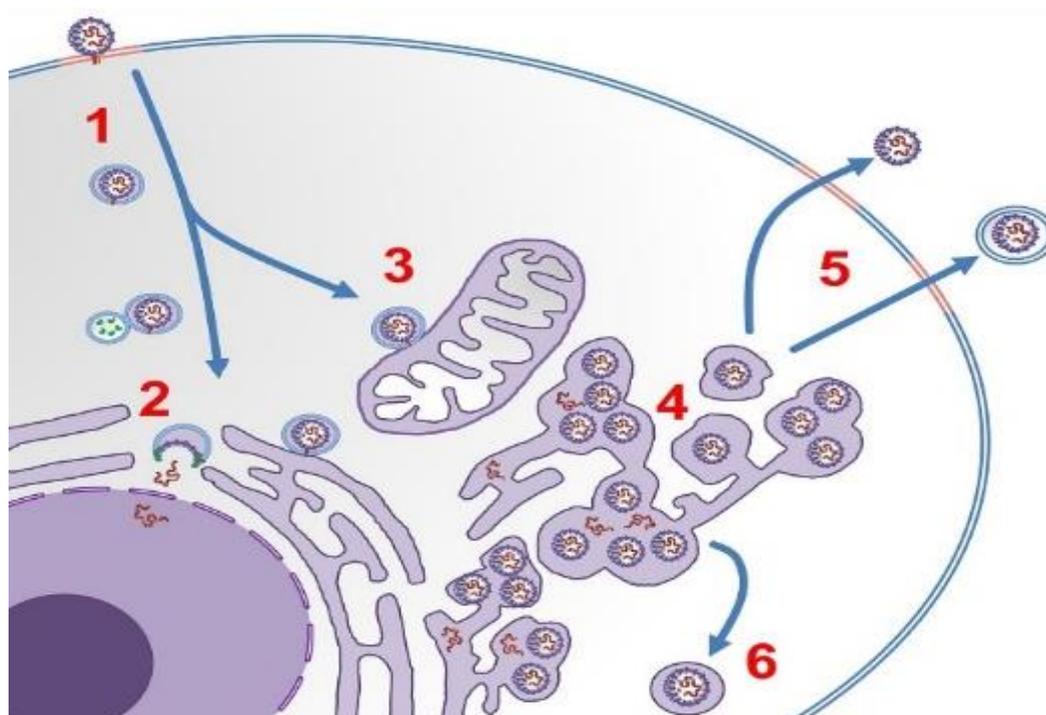


Figura 5: Esquema de entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira. Fonte: Adaptado (FENRICH et al., 2020)

2.3 Transmissão

O SARS-CoV-2 pode ser transmitido a uma pessoa saudável se ela tiver contato com a pessoa infectada através de contato direto por gotículas respiratórias ou por contato direto com roupas, maçanetas contaminadas, dentre outros ZHANG et al., 2020. Estudos relataram que a transmissão por aerossol (transmissão aérea) também é possível para SARS-CoV-2. No entanto, a transmissão pode ser evitada mantendo uma distância de 2 metros entre duas pessoas, uso de

máscaras e isolamento das pessoas infectadas (PHELAN; KATZ; GOSTIN, 2020; ZHANG et al., 2020a; ZHU et al., 2020).

Durante a fase inicial do surto da COVID-19, um conjunto de dados foi obtido de 1.099 pacientes com COVID-19, confirmados em laboratório de 552 hospitais em 30 províncias da China, em 29 de janeiro de 2020. Apenas 2% dos pacientes tinham histórico de contato com animais; mais de três quartos já haviam visitado a cidade de Wuhan ou eram residentes. Conseqüentemente, os padrões de surto ou a fonte de infecção não puderam ser previstos com base no estudo. O período de incubação do SARS-CoV-2 foi de 1 a 12 dias, no entanto, o período médio de incubação foi de 4 dias. Os sintomas mais comuns são: febre (43% na admissão e 88,7% durante a hospitalização), tosse (67,8%), diarreia (3,8%) e fadiga (WANG et al., 2020a; YESUDHAS; SRIVASTAVA; GROMIHA, 2021; ZHANG et al., 2020a).

O SARS-CoV-2 foi detectado na saliva, sangue, expectoração e urina antes do desenvolvimento da pneumonia viral, e alguns pacientes não desenvolvem pneumonia. Pessoas assintomáticas são fontes potenciais de infecção por SARS-CoV-2, que controlam a dinâmica de transmissão do surto (ROTHER et al., 2020; YESUDHAS; SRIVASTAVA; GROMIHA, 2021; ZHANG et al., 2020a).

2.4 Imunopatogênese na COVID-19

Uma resposta imune antiviral efetiva do hospedeiro deve envolver mecanismos da imunidade inata e adaptativa, incluindo a síntese de diversas quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, recrutamento de macrófagos e granulócitos pró-inflamatórios. A ativação de células T CD4⁺ CD8⁺ e células B são essenciais para controlar a replicação viral, limitando a disseminação do vírus, eliminação das células infectadas e regulação de danos teciduais (IVASHKIV; DONLIN, 2014; LI et al., 2020a).

Assim como outros CoVs, supõe-se que o SARS-CoV-2 pode induzir uma resposta imune protetora mediada por linfócitos T. No entanto, pacientes com COVID-19 hospitalizados normalmente manifestam linfopenia, sugerindo que a imunidade celular pode ser suprimida pelo vírus (WANG et al., 2020b; ZHANG et al., 2020b).

Aproximadamente 80% dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 apresentam sintomas leves ou são assintomáticos. Entretanto, pacientes graves podem apresentar elevadas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL2, IL6, IL7, IL10, G-CSF, IP-10, MCP-1, MIP-1 α e TNF α , (GABRIELLA; ANNALISA, 2020). De fato, dados obtidos de

pacientes infectados com SARS-CoV-2 têm mostrado que casos graves podem ser caracterizados por uma tempestade de citocinas associada a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (CHEN et al., 2020; HUANG et al., 2020; QIN et al., 2020).

Uma variedade de citocinas, incluindo a família IL1, IL6, IL8, IL10, TNF- α e interferon IFN - γ , estão envolvidas no desenvolvimento de uma tempestade de citocinas, embora as principais citocinas pareçam diferir dependendo da doença. É importante ressaltar que mesmo que os sintomas clínicos causados por uma tempestade de citocinas exibam um padrão comum, o tratamento deve ser individualizado porque o grau em que cada citocina contribui para o desenvolvimento da doença pode ser diferente (KIM et al., 2020a).

Além disso, a gravidade da COVID-19 foi relacionada ao nível de citocinas pró-inflamatórias e subconjuntos de células imunes, (WAN et al., 2020; WANG et al., 2020c). Níveis elevados de citocinas (IL6, IL10 e TNF- α), linfopenia (nas células T CD4⁺ e CD8⁺) e expressão reduzida de IFN- γ nas células T CD4⁺ estão associados à casos graves de COVID-19 (PEDERSEN; HO, 2020).

Qin (2020) observou que pacientes graves tendem a apresentar contagens mais baixas de linfócitos, contagem mais alta de leucócitos e elevada razão neutrófilos-linfócitos. Assim como, porcentagens menores de monócitos, eosinófilos e basófilos. A maioria dos casos graves demonstraram níveis elevados de biomarcadores relacionados à infecção e citocinas inflamatórias. O número de células T diminuiu significativamente em casos graves. As células T CD4⁺ e as células T CD8⁺ estavam diminuídas no grupo de pacientes graves (QIN et al., 2020).

Os quadros mais graves de COVID-19 são caracterizados por intenso processo inflamatório, com importante recrutamento de neutrófilos e macrófagos classicamente ativados. Também se encontram altas concentrações de citocinas inflamatórias, como IL6 e IL1 β , que é produzida de maneira dependente do inflamassoma, um complexo de proteínas intracelulares que promove processos inflamatórios. A presença de altas concentrações de IL1 β em pacientes sugere importante participação do inflamassoma na patogênese da COVID-19 (RODRIGUES et al., 2020a).

Os inflamassomas compreende um grupo de moléculas sensores, a proteína adaptadora ASC e as caspases efetoras. As moléculas do sensor de inflamassoma são classificadas em domínio contendo as proteínas pirina e HIN - PYHIN (AIM2 e IFI16) e receptor do tipo NOD - NLR (NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP9, NLRP12 e NLRC4). A ativação dos sensores resulta na ativação da caspase, que cliva os precursores das citocinas inflamatórias Interleucina IL1 β e

IL18 em suas formas ativas, como também a gasdermin-D, uma proteína formadora de poros que induz uma forma inflamatória de morte celular chamada piroptose. A piroptose controla a secreção de citocinas dependentes de inflamassoma e contribui para a defesa antimicrobiana e doenças auto inflamatórias mediadas por inflamassoma. Estudos clínicos mostraram que o aumento da atividade do inflamassoma leva à desregulação imunológica e, em última instância à doença grave para pacientes com COVID-19 (CUI; ZHANG, 2021; RODRIGUES et al., 2020a).

O NLRP1 é um regulador da resposta imune inata e é expresso em muitos tipos células: células dendríticas, macrófagos, barreiras epiteliais e principalmente nas células de *Langerhans* da pele. Padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) ou Padrões moleculares associados à danos (DAMPs) estimulam os receptores *Toll-like* de superfície (TLRs) com subsequente montagem do inflamassoma NLRP1 e ativação da caspase-1. A caspase-1 ativa então cliva o precursor IL1 β inativo (pró-IL1 β) na IL1 β madura e ativa madura, estimulando assim as respostas inflamatórias, devido às suas propriedades altamente inflamatórias e imunoestimulantes, o processamento e a liberação da IL1 β bioativa são rigidamente controlados. No entanto, nas síndromes periódicas associadas à criopirina (CAPSs), que incluem doença auto inflamatória familiar pelo frio, síndrome de Muckle-Wells e doença inflamatória de início neonatal, as substituições de aminoácidos no domínio NACHT de NLRP3 resultam na ativação constitutiva da caspase-1 e processamento e secreção de IL1 β bioativa, acompanhada de inflamação sistêmica e local acentuada. Monócitos sanguíneos de pacientes afetados liberam significativamente mais IL1 β bioativo maduro do que células de indivíduos saudáveis. Da mesma forma, uma mutação de ativação dominante em NLRP1 de camundongo recentemente mostrou resultar em um fenótipo inflamatório sistêmico grave associado com liberação muito elevada de IL1 β ativa, (BAUERNFRIED et al., 2021; CUI; ZHANG, 2021)

O inflamassoma NLRP3, formado por três estruturas básicas: receptores do tipo NOD, proteína adaptadora (ASC) e pró-caspase 1. Essas caspases ativas são capazes de induzir a maturação proteolítica de interleucina-1 beta (IL1 β) e IL18, que então são liberadas para o meio extracelular. Um estudo recente demonstrou diretamente que o inflamassoma NLRP3 é ativado em resposta à infecção por SARS-CoV-2, sendo assim, os inflamassomas e piroptose têm sido propostos como alvos terapêuticos para COVID-19. A presença de morte celular e produtos derivados de inflamassoma, como IL1 β , IL18 e LDH em soros de pacientes sugere envolvimento de inflamassoma, mas a demonstração definitiva da participação do inflamassoma ainda é necessária porque esses produtos podem ser produzidos por vias

independentes de inflamassoma (CUI; ZHANG, 2021; RODRIGUES et al., 2020a; SONG et al., 2020b; YAP; MORIYAMA; IWASAKI, 2020).

Na infecção por SARS-CoV-2, ocorre uma tempestade de citocinas que tem características semelhantes à Síndrome de Liberação de Citocinas (SRC), e indivíduos com COVID-19 grave com tempestade de citocinas têm biomarcadores inflamatórios sistêmicos elevados, incluindo proteína C reativa, dímero D, ferritina, (MANGALMURTI; HUNTER, 2020).

Os pacientes apresentam uma resposta imune disfuncional caracterizada por altos níveis de citocinas plasmáticas, incluindo IL6, TNF- α , IL8, IL10, IL1RA e CXCL10. Os níveis de IL6 aumentam ao longo do tempo mais naqueles que morrem da infecção em comparação com aqueles que sobrevivem à estimulação de citocinas inflamatórias, principalmente por meio de macrófagos ativados, o que leva a lesão pulmonar aguda, síndrome do desconforto respiratório agudo, síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), choque e disfunção de múltiplos órgãos e coagulopatia, (FREEMAN; SWARTZ, 2020; MERAD; MARTIN, 2020; ZHOU et al., 2020a).

O NLRP3 medeia a inflamação pulmonar na infecção por SARS-CoV-2, e no momento que o vírus é inalado nas vias aéreas ocorre a ativação do receptor P2RX7 pela liberação de ATP extracelular. A sinalização P2RX7 pode levar à ativação de NLRP3 por meio de ativação direta ou indireta em macrófagos ativados. A ativação do inflamassoma NLRP3 conduz a secreção de IL1 β e IL18, que pode resultar em piroptose (morte celular programada). A ativação de subconjuntos de células imunes, em grande parte por meio de macrófagos ativados, resulta em uma cascata de ativação massiva de citocinas inflamatórias, incluindo IL6, TNF- α , IL8, IL10, IL1RA e CXCL10 que levam a lesão pulmonar aguda com síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), choque e disfunção de múltiplos órgãos e coagulopatia (figura 6), (FREEMAN; SWARTZ, 2020; SHARMA; DE ALBA, 2021; SWANSON; DENG; TING, 2019).

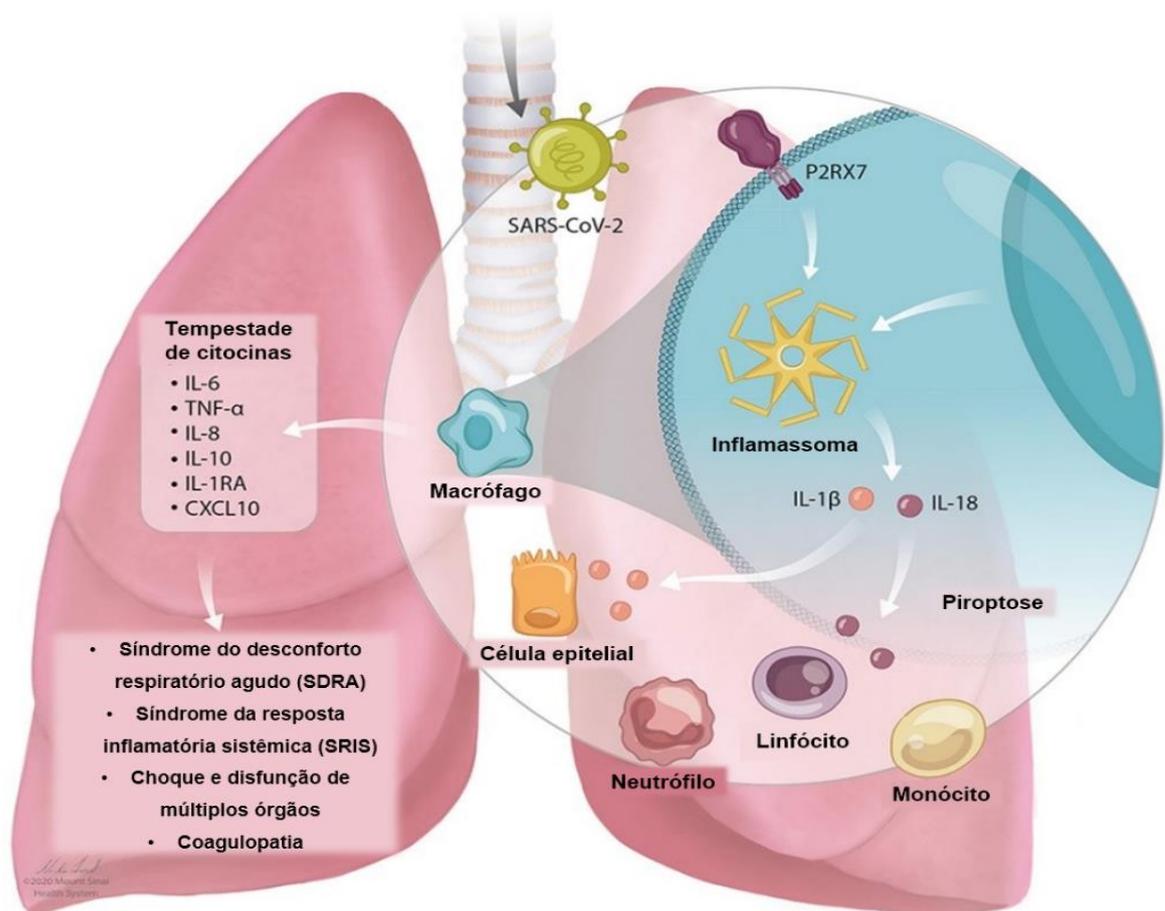


Figura 6: Mediação da inflamação pulmonar por NLRP3 a infecção por SARS-CoV-2. Fonte: Adaptado (FREEMAN; SWARTZ, 2020)

Existem estudos que reportam o inflamassoma NLRP3 e IL1 β na mediação da inflamação durante a lesão pulmonar e a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). O líquido bronco alveolar e o plasma em pacientes com SDRA apresentam níveis elevados de IL1 β em comparação com controles saudáveis e estão associados a piores desfechos clínicos. Em outras infecções por coronavírus, incluindo MERS-CoV e SARS-CoV, os pacientes com SDRA tinham níveis elevados de IL1 β , IL6 e IL8. Em outras infecções virais respiratórias, como a gripe, altos níveis de IL1 β foram detectados no fluido bronco alveolar e no plasma de pacientes com lesão pulmonar, (ALOSAIMI et al., 2020; BOUROS et al., 2004; GANTER et al., 2008; HE et al., 2006b; LAU et al., 2013; MARCHETTI et al., 2021; MEDURI et al., 1995; VAN DEN BERG; TE VELDE, 2020).

Além disso, GASSE et. al. em seu estudo com animais, observou que camundongos deficientes em componentes do inflamassoma reduziram a lesão pulmonar e aumentaram a sobrevivência com infecção por influenza. Em estudos farmacológicos em que IL1 β ou IL1R foram

antagonizados, a lesão pulmonar associada à influenza foi reduzida. Tomados em conjunto, IL1 β parece desempenhar um papel fundamental na lesão pulmonar aguda por infecções virais respiratórias e o direcionamento farmacológico desta via representa uma importante área de intervenção, (GASSE et al., 2007; KIM et al., 2015).

A lesão de células epiteliais alveolares do tipo II que expressam ACE2 leva à ativação do inflamassoma NLRP3. A resposta imune aguda à infecção por SARS-CoV-2 é amplamente impulsionada por macrófagos inflamatórios alveolares e derivados de monócitos que são ativados por PAMPs e DAMPs liberados por pneumócitos apoptóticos infectados. O TNF- α e a IL1 β secretados pelos macrófagos alveolares iniciam a cascata pró-inflamatória aguda imediatamente após a infecção. A secreção dessas citocinas induz a morte e dano celular, produção de PAMP / DAMP, recrutamento de células imunes e ativação de NLRP3 generalizada, estabelecendo uma cascata de feedback positivo pró-inflamatório. Mais recentemente, Blanco-Melo et al. (2020) demonstraram que a infecção por SARS-CoV-2 de células epiteliais brônquicas humanas primárias resultou na expressão de múltiplas citocinas e quimiocinas, incluindo TNF- α , IL6 e I1 β (BLANCO-MELO et al., 2020; CHANNAPPANAVAR et al., 2016; FU; XU; WEI, 2020; FU; CHENG; WU, 2020; MARCHETTI et al., 2021).

Esta morte celular inflamatória localizada se estende à vasculatura, induzindo o vazamento, edema e pneumonia característicos da COVID-19. É importante notar que o início dessa resposta imune patológica é caracterizado não por inflamação sistêmica, mas por um microambiente hiper inflamatório localizado no local da lesão tecidual. Conforme a cascata inflamatória progride, IL1 β e TNF- α induzem a secreção de citocinas NLRP3 adicionais, como IL6, que podem ser subsequentemente observadas no sangue periférico devido à perda de integridade vascular. A cinética da resposta inflamatória é essencial para a prática clínica eficaz - biomarcadores circulantes, como IL6, podem ser úteis para prever resultados e corroborar com decisões de tratamento imunomodulador, (AN; ZHU; YANG, 2020b; CHANNAPPANAVAR et al., 2016; FREEMAN; SWARTZ, 2020; FU; CHENG; WU, 2020).

O rápido declínio de pacientes com COVID-19 coincide com uma mudança abrupta da tempestade de citocinas NLRP3 para um estado imunossupressor compensatório. Essa fase de reparo e recuperação é caracterizada pela produção de IL10, polarização de macrófagos para o estado anti-inflamatório M2, supressão de NLRP3 e recrutamento de fibroblastos e plaquetas. O acúmulo de fibroblastos e macrófagos M2 no pulmão inicia a deposição de colágeno e a construção das matrizes extracelulares que caracterizam a fibrose da SDRA. Macrófagos M2 e

outros marcadores deste ambiente pró-fibrótico e anti-inflamatório foram detectados no líquido brônquio alveolar de pacientes graves com COVID-19, (FREEMAN; SWARTZ, 2020; FUNG et al., 2020b; LIAO et al., 2020; MERAD; MARTIN, 2020).

2.5 Polimorfismos nos genes dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3

O NLRP1 humano é considerado o maior NLR com um comprimento de 1.473 resíduos de aminoácidos e com peso molecular total de 165,9 kDa. Existem sete isoformas de NLRP1 humano produzidas por *splicing* alternativo. Eles diferem da sequência canônica por deleções, levando a alterações na sequência de proteínas que estão localizadas principalmente na região C-terminal. Ele contém um domínio NACHT central que é característico para todos os NLRs, seguido por um domínio de Repetição Rica em Leucina-LRR de sete repetições. Como é típico de todos NLRPs, a arquitetura de domínio do NLRP1 é complementada por um domínio N-terminal PYD. O domínio LRR é seguido por um trecho único de 30 kDa denominado domínio 'função para encontrar' ou FIIND. O C-terminal contém um segundo domínio efetor de morte, o domínio CARD. A presença dos domínios FIIND e CARD no C-terminal e a ligação entre os domínios PYD e NACHT faz com que o NLRP1 se destaque de todos os outros NLRs no genoma humano (Figura 7), (YU et al., 2018; ZHENG; LIWINSKI; ELINAV, 2020).

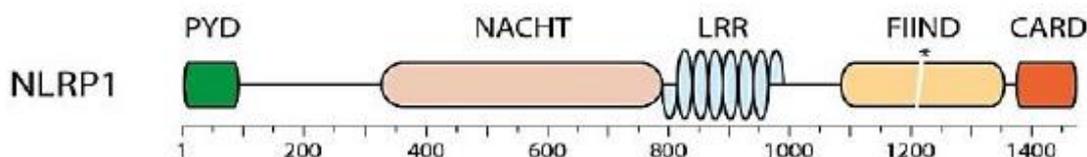


Figura 7: Estrutura dos domínios proteicos do NLRP1. Fonte: Adaptado (YU et al., 2018)

O inflamassoma NLRP3 (proteína 3 contendo domínio de NOD-, LRR- e pirina) consiste em um sensor (NLRP3), um adaptador (ASC; também conhecido como PYCARD) e um efetor (caspase 1). O NLRP3 contém um domínio de pirina amino-terminal (PYD), um domínio NACHT central (domínio presente em NAIP, CIITA, HET-E e TP1) e um domínio de repetição rico em leucina no terminal carboxi (domínio LRR). O domínio NACHT medeia a função ATPase que é vital para a auto associação e função de NLRP3 e os domínios LRR se autorregulam dobrando de volta para o domínio NACHT. ASC tem dois domínios de ligação de proteína, um PYD amino-terminal e um domínio de recrutamento de caspase carboxi-

terminal (CARD). O NLRP3 pode oligomerizar entre os domínios NACHT mediante estimulação, o que leva ao recrutamento de ASC por meio de interações PYD-PYD. A formação de múltiplos filamentos ASC é conhecida como ponto ASC. O complexo ASC montado pode recrutar caspase 1 para facilitar a clivagem e ativação (Figura 8), (FREEMAN; SWARTZ, 2020; SHARMA; DE ALBA, 2021).

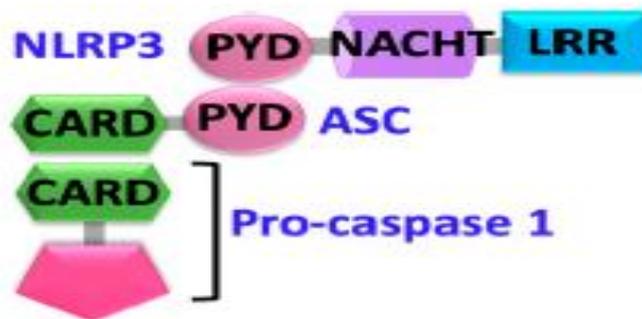


Figura 8: Estrutura dos domínios proteicos do NLRP3. Fonte: Adaptado (SHARMA; DE ALBA, 2021)

2.6 Polimorfismos nos genes das citocinas IL1 β , IL6 e IL18

A citocina IL1 β é codificada pelo gene *IL1 β* que está localizado no braço longo do cromossomo 2. Os polimorfismos presentes nesse gene podem influenciar a produção da IL1 β *in vivo e in vitro*. O gene IL1 β possui dois polimorfismos de nucleotídeo único-SNP (do inglês *single nucleotide polymorphism*) em sua região promotora, -31 (rs16944) e - 511 e um SNP no exon 5, na posição+3954. Os locais de transcrição foram estudados em várias doenças inflamatórias e infecciosas, (CRUZ et al., 2013; DA SILVA et al., 2019; FANG et al., 2015; MORAVEJ et al., 2012).

O polimorfismo rs16944 está associado ao risco de desenvolver doenças como Isquemia Silenciosa do Miocárdio (ISM) em pacientes diabéticos, suscetibilidade a leishmaniose tegumentar causada por *L. guyanensis* no Amazonas, choque séptico, refluxo gastroesofágico, risco de lesões da artéria coronária, suscetibilidade ao câncer, risco de artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico, entre várias outras doenças, (CRUZ et al., 2013; DA SILVA et al., 2019; PICOS et al., 2020; WANG et al., 2019; ZHU et al., 2021).

O gene *IL6* está localizado no cromossomo 7p21-24, consiste em sete exons e abrange 12,8 kb de DNA genômico. Foram relatadas várias variantes do gene em *IL6* com expressão

diferencial de citocinas em diferentes distúrbios. O rs1800795 e rs1800796 foram associados à níveis plasmáticos mais elevados de IL6 e ao risco de infecções do trato respiratório superior. Além disso, essas variantes de IL6 têm sido relacionadas ao bom e mau prognóstico de diferentes distúrbios, como sepse, doença cardíaca coronária e diabetes. Em pacientes graves com COVID-19, um aumento dos níveis de IL6 foi observado e relacionado ao mau prognóstico da doença. Uma terceira variante rs1800797 no promotor IL6 é relatada e seu papel no estudo da tempestade de citocinas pode estar relacionadas com COVID-19, (FRICKE-GALINDO; FALFÁN-VALENCIA, 2021; STRAFELLA et al., 2020; WANG et al., 2017).

O gene que codifica IL18 está localizado no cromossomo 11q22.2-q22.3, é composto por seis exons e cinco íntrons, tem 6 transcritos primários, formando uma proteína com 193 resíduos de aminoácidos e possui cerca de 90 polimorfismos conhecidos na região promotora e na porção codificadora do gene. O IL18 foi anteriormente denominado de fator de indução de interferon γ (*IFN-gamma inducing factor - IGIF*) e após análise estrutural, sua denominação foi alterada para IL18 por parecer estar relacionado com a família de IL1. Essa citocina exerce atividade tanto na resposta imune inata como adaptativa, e tem ação pleiotropica induzindo a expressão de quimiocinas e citocinas, além de CXCL8 e TNF- α . Estudos observaram que polimorfismos na região promotora da IL18 -137 G/C (rs1872384), alteram a transcrição do gene, e alterando assim os níveis de produção da citocina, (AN et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2015; NOVICK et al., 2013).

Embora ainda não esteja claro o papel específico da imunidade inata, celular e humoral na patogênese e recuperação de pacientes COVID-19, o desenvolvimento da infecção e o estabelecimento ou não da doença dependem da interação entre o vírus e o sistema imunológico do indivíduo. Dentre os fatores virais, estão mutação, cepa viral e carga viral, entre outros. Os fatores relacionados ao indivíduo, incluem respostas imunes desequilibradas, genética (como genes *HLA*), polimorfismos em genes imunes, idade, sexo, estado nutricional, regulação imuno neuroendócrina e comorbidades associadas. Tais fatores contribuem para a duração e a gravidade da doença (LI et al., 2020c).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a influência dos polimorfismos nos genes das citocinas IL1 β , IL6, IL18 e dos receptores dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 na COVID-19.

3.2 Específicos

- Descrever a frequência dos polimorfismos nos genes das citocinas IL1 β , IL6, IL18 e dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 nos pacientes convalescentes da COVID-19, pacientes com COVID-19 e no grupo controle;
- Investigar a associação dos polimorfismos nos genes das citocinas IL1 β , IL6, IL18 e dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 nos pacientes convalescentes da COVID-19 e pacientes com COVID-19;
- Associar os polimorfismos nos genes das citocinas IL1 β e IL6 e do inflamassomas NLRP1 e NLRP3 com as concentrações séricas das citocinas IL1 β e IL6 nos pacientes convalescentes da COVID-19 e pacientes com COVID-19.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo Observacional descritivo exploratório realizado em pacientes convalescentes da COVID-19 atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas- FHEMOAM e pacientes com COVID-19 atendidos no Hospital Universitário Getúlio Vargas- HUGV.

4.2 Aspectos Éticos

O presente estudo constitui subprojeto de um projeto maior da linha de pesquisa sobre Sars-Cov-2, foi julgado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas- FHEMOAM. Projeto este intitulado “*Estudo de Biomarcadores Imunológicos em pacientes Convalescentes da infecção pelo Vírus SARS-CoV-2 (COVID-19).*” aprovado sob o número de CAAE 30975020.9.0000.0009.

As amostras do grupo controle utilizadas neste estudo foram obtidas a partir dos projetos “*Identificação e Seleção de Peptídeos Miméticos Reativos aos soros de pacientes HCV+ e sua influência no desenvolvimento da fibrose hepática in vitro*” aprovado sob o número de CAAE 49652815.8.0000.0009 e “*Avaliação o perfil celular humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na cidade de Manaus*” aprovado sob o número de CAAE 0024.0.112.000-10, coletados previamente à COVID-19.

4.3 Área de Estudo

O estudo foi desenvolvido na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas em parceria com Hospital Universitário Getúlio Vargas- HUGV.

4.4 População de Estudo

Este estudo foi composto por três grupos. Grupo 1 (G1), pacientes convalescentes da COVID-19 candidatos à doação de plasma, o grupo 2 (G2) doadores de sangue saudáveis (grupo controle) e grupo 3 (G3) pacientes que foram diagnosticados com COVID-19.

4.5 Pacientes convalescentes (G1)

Foram 139 candidatos elegíveis para doação de Plasma Convalescente (PC) recrutados a partir de uma lista de pacientes com COVID-19, qPCR positivos, fornecida pela Fundação de Vigilância em Saúde (FVS-AM). Os pacientes eram contatados por telefone, e convidados a participar do estudo após a contagem de aproximadamente 30 dias da pausa dos sintomas. Caso aceitassem, se dirigiam à Fundação HEMOAM, para a assinatura do TCLE, coleta de dados sociodemográficos e uma coleta de sangue total, distribuídos em um tubo de EDTA e um tubo com gel separador do sangue periférico.

Para estes pacientes, com o intuito de observar aspectos da resposta imunológica, como o perfil de mediadores imunológicos mediante a convalescência da infecção por SARS-CoV-2, utilizamos os seguintes tempos de coleta: D30 (30 dias após a infecção), D60 (60 dias após a infecção) e D90 (90 dias após a infecção)

4.6 Critérios de inclusão

Em ambos os grupos de doadores saudáveis e de pacientes convalescentes foram incluídos indivíduos de ambos os gêneros, maiores de 18 anos e que aceitaram participar do projeto através da assinatura do TCLE. Para o grupo de doadores de sangue saudáveis, foram incluídos indivíduos aptos à doação de sangue e que passaram pelos critérios clínicos e laboratoriais estabelecidos pelo Ministério da Saúde. Todos os incluídos de ambos os grupos testaram negativo para HIV, HBV, HCV, Sífilis, Doença de Chagas e HTLV, além de não apresentarem nenhum sintoma no momento da doação de sangue.

4.7 Critérios de não inclusão

Para indivíduos que participaram do grupo convalescente, não foram incluídos aqueles que faziam uso de medicamentos inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina, ou com anticorpos anti-eritrocitários.

Independente do grupo, não foram incluídos gestantes, puérperas, indígenas ou menores de idade.

4.8 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes que não possuíam amostra biológica suficiente para realização dos procedimentos metodológicos. Do grupo convalescente, foram excluídos aqueles com a doença sintomática no momento da inclusão, que ainda possuíam o teste de qPCR para SARS-CoV-2 positivo no momento da inclusão, e ou aqueles com reatividade sorológica para algum patógeno de importância transfusional.

4.9 Doadores de sangue saudável (G2)

Para o grupo controle, foram selecionados 192 doadores de sangue da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), de ambos os sexos, com faixa etária entre 18 a 65 anos e residentes em Manaus, que não apresentaram reatividade para Hepatite B (anti-HBc, HBsAg), HCV (anti-HCV), HIV (anti-HIV-1 e 2), HTLV (anti-HTLV I e II), doença de Chagas (teste ELISA), sífilis (VDRL). As amostras foram coletadas antes da pandemia de COVID-19, armazenados no nosso biorrepositório.

4.10 Pacientes com infecção e sintomáticos para COVID-19 (G3).

Foram convidados 25 pacientes internados no Hospital Universitário Getúlio Vargas-HUGV diagnosticados com COVID-19. A coleta de material destes pacientes foi feita pela equipe de enfermagem do hospital, após o consentimento do paciente ou familiar, pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram coletadas amostras de sangue periférico em um tubo de EDTA e um tubo com gel separador para exames de rotina, e que foram aproveitados para realização dos testes da pesquisa, desde que utilizados em até 12 horas após a coleta. Os dados epidemiológicos foram coletados de prontuários físicos e/ou eletrônicos coletados no HUGV, dos quais foram separados em grupos de pacientes com caso LEVE, GRAVE e CRÍTICO da doença, classificado de acordo com a tabela 1, conforme descrito no prontuário do paciente como diagnóstico clínico. Esses dados foram armazenados em tabelas do Microsoft Excel 2010.

Tabela 1 Classificação dos pacientes caso Leve, Grave e Crítico da COVID-19 (fonte HUGV 2020)

Doença Leve	Presença de quaisquer sintomas ou sinais (tosse, febre, coriza, fadiga, mialgia, perda do paladar, perda do olfato, diarreia, dor abdominal, cefaleia). Desfecho (Alta)
Doença Grave	Internação na UTI, uso de ventilação mecânica. Desfecho (Alta)
Doença Crítica	Internação na UTI, uso de ventilação mecânica, choque séptico e/ou disfunção de múltiplos órgãos. Desfecho (Obito)

4.11 Coleta do Material Biológico

As amostras para este estudo foram coletadas por punção venosa em dois tubos, tubo PPT (*Plasma Preparation Tube, Vacuntainer BD*) para procedimentos referentes à determinação do polimorfismo das citocinas propostos, e um tubo sem anticoagulante, no qual foi reservado para dosagem de citocinas previstas pelos projetos. As amostras foram processadas no Laboratório Multidisciplinar da Fundação Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, passaram por centrifugação a 3.000 rotações por 5 minutos (rpm) ou (1008 RCF), e, depois separados em alíquotas em tubos de criogênico e congelado à -80 °C até o momento de posterior análise.

4.12 Análise da produção de anticorpos

Foi realizada a avaliação qualitativa e quantitativa de anticorpos de classe IgM e IgG contra as proteínas do SARS-CoV-2 no soro dos participantes. Primeiramente, como critério de inclusão, foi realizado um teste imuno cromatográfico, com o kit MedTeste Coronavírus (COVID-19) IgG/IgM (Teste rápido), que é um imuno ensaio qualitativo baseado em membrana para a detecção de anticorpos do SARS-CoV-2 em sangue total, soro ou plasma. Durante o teste, a amostra reage com as partículas revestidas de antígeno viral no dispositivo de teste. A mistura em seguida, migra para cima na membrana cromatográfica por capilaridade e reage com o anti-IgG ou anti-IgM humano, na respectiva região da linha de teste, marcando de forma colorimétrica. Caso a amostra não contenha anticorpos do SARS-CoV-2, nenhuma marcação aparecerá nas linhas de teste, indicando um resultado negativo. Como procedimento de controle, uma linha aparecerá marcada na região específica, indicando que houve absorção apropriada através da membrana para a realização do teste (Figura 9).

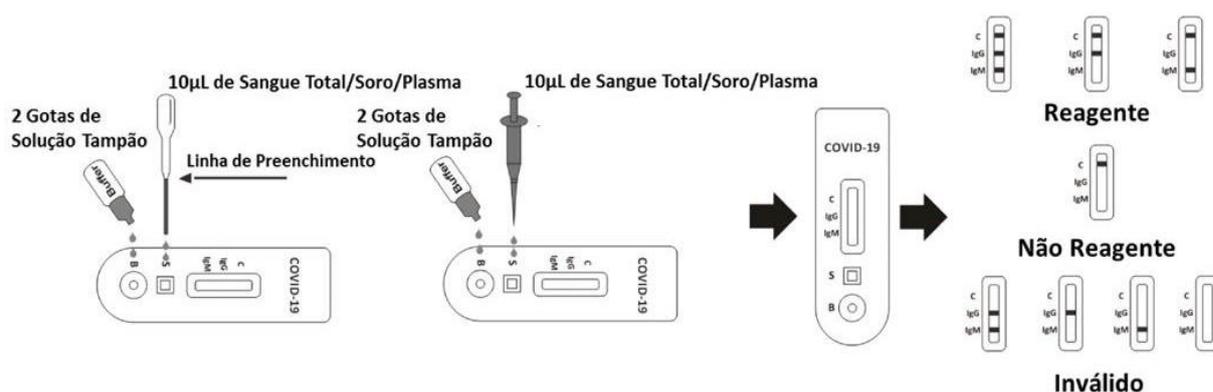


Figura 9: Fluxograma da realização do imunoenensaio cromatográfico rápido, utilizando o kit MedTeste Coronavírus (COVID-19) IgG/IgM. (MEDTESTE,2020)

Posteriormente, o soro obtido nos tubos com gel separador foi empregado para a confecção dos testes de imunoenensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA). Para o teste qualitativo, foram utilizados 200 µL para detecção de anticorpos de classe IgG com o kit SARS-CoV-2 IgG ARCHITEC (Abbott), onde o resultado foi expresso como Index (S/C), e utilizado para classificar em positivo ($\text{Index} \geq 1.4$) ou negativo ($\text{Index} < 1.4$). Todos os procedimentos foram seguidos conforme recomendações do fabricante. Os resultados qualitativo e quantitativo foram utilizados para análise dos dados.

4.13 Extração de DNA

As extrações do DNA das amostras foram realizadas a partir de 200µL de sangue total utilizando-se o *Kit Trizol*® (Cat. N° 15596026, *Invitrogen*) e seguindo as instruções do fabricante, (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016).

As amostras foram inicialmente lisadas em solução de Trizol a 4°C sob agitação vigorosa. Após a homogeneização, adicionou-se 100 µL de clorofórmio (99,9%) a 4°C nas amostras, sob agitação vigorosa e, em seguida, centrifugou-se as mesmas por 12 minutos a 10.000 rpm (11200 RCF) em temperatura ambiente. Posteriormente, observou-se que o produto resultante apresentou duas fases visíveis. Retirou-se cuidadosamente a fase superior contendo DNA genômico e transferiu-se para tubos de 1,5 mL previamente identificados. O DNA extraído foi precipitado através da adição de 500 µL de etanol 100% a 4°C, seguido de centrifugação por 15 minutos a 10.000 rpm (11200 RCF) em temperatura ambiente e descarte do sobrenadante.

A etapa de precipitação foi repetida, seguida de centrifugação por 12 minutos a 10.000 rpm (11200 RCF) em temperatura ambiente e descarte do sobrenadante. Removeu-se o etanol residual em banho seco a 56°C por 10 minutos. Por fim, o precipitado foi hidratado em 50 µL de água ultrapura e armazenado em freezer a -20 °C.

4.14 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As regiões genômicas de interesse dos genes *IL1β*, *IL6* e *IL18* foram amplificadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, PCR, *Polymerase Chain Reaction*) sob condições uniformes, seguida por análise dos polimorfismos do comprimento do fragmento de restrição (RFLP). A amplificação foi realizada utilizando o termociclador da *Applied Biosystems (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Carlsbad, USA)*, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese a 100 V por 45 min em gel de agarose com tampão de Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X) (estoque TAE 40 - trisase 1,6 M, acetato de sódio 0,8 M e sal dissódico do ácido etilenodiaminotetraacético 40 mM / 1000 mL de água deionizada) contendo brometo de etídio e posteriormente foram visualizados pelo transiluminador de luz UV *ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad)*.

4.15 Genotipagem dos Polimorfismos nos Genes Interleucina 1 (IL1β), Interleucina 6 (IL6) e Interleucina 18 (IL18)

O sítio polimórfico CT na posição -511 da região promotora do gene da citocina IL1β (304pb), GC na posição -174 da região promotora da citocina IL6 (198pb) e GC na posição -137 da região promotora da citocina IL18 (155pb), seguiram as referências para a realização da genotipagem dos SNPs, conforme especificado na tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos polimorfismos da PCR-RFLP.

Polimorfismo	Localização no genoma	Sequência 5' → 3'	Enzima de Restrição	Alelos e Fragmentos (bp)	Referência
IL1β (rs16944)	-511C/T (Região promotora)	5'TGGCATTGATCTGGTTCATC3' 5'GTTTAGGAATCTTCCCACTT3'	AvaI	304pb T/T 304, 190, 104pb C/T 190, 104pb C/C	(BHAT et al., 2014)
IL6 (rs1800795)	-174G/C (Região promotora)	5'ATCTTTGTTGGAGGGTGAGG 3' 5'AAAGGAAGAGTGGTTCTGCTTCT3'	NlaIII	140, 58pb G/G 198, 140, 58pb G/C 198pb C/C	(TARRAGÔ et al., 2014)
IL18 (rs1872384)	-137G/C (Região promotora)	5'CACAGAGCCCCAACTTTTTACGGCAGAGAA 3' 5'GACTGCTGTCGGCACTCCTTGG3'	MboII	155pb C/C 155, 116pb G/C 116pb G/G	(FOLWACZNY et al., 2005)

*rs: Sequência de referência; *bp: Pares de bases

4.16 Genotipagem por PCR-RFLP para estudos de polimorfismos

As reações de PCR-RFLP (*Polymerase chain reaction-restriction fragmente length polymorphism*) foram realizadas de acordo com os protocolos descritos por Folwaczny et al., (2005), Bhat et al., (2014), Tarragô et al., (2014). Foram utilizados primers específicos para os SNPs IL1β rs16944, IL6 rs1800795 e IL18 rs187238. A amplificação das sequências de interesse foi realizada no termociclador *Veriti®96 Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, USA)*. O produto da PCR foi submetido à reação de RFLP com as enzimas de restrição descritas na tabela 2 e os fragmentos gerados por PCR-RFLP foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2-4% corado com *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA, EUA)* e visualizados em *UV light Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad Corporation, Hercules, CA, EUA)* com sistema de documentação fotográfica.

4.17 Genotipagem por Real-Time Quantitativo PCR (qPCR)

A genotipagem dos polimorfismos de NLRP1 e NLRP3 foi realizada através da técnica de *Real-Time Quantitative PCR* (qPCR), utilizando sondas fluorescentes TaqMan alelo-específicas que permitem a discriminação dos SNPs estudados. As reações de qPCR foram realizadas com as sondas TaqMan® (*Thermo Fisher Scientific, USA*), a citar: NLRP1 (rs12150220 Cat#1600653_10; rs35865013 Cat#127453310) e NLRP3 (rs10754558 Cat#2605202810; rs10802502 Cat#2605202610). O termociclador *StepOnePlus Real-Time*

PCR Systems foi utilizado para amplificação das sequências de interesse e discriminação alélica.

Tabela 3 Descrição dos polimorfismos da PCR (qPCR)

Gene	Referência do SNP (rs)	Localização	VIC/FAM	Kit de Genotipagem de Ensaio TaqMan
NLRP1	rs12150220	Chr.17: 5582047	GGAGCTTGGGAAGAGCTTGGTAG AGG[A/T]GTGAGGCAGAGATTTC TGGGGGGAA	C_1600653_10
	rs35865013	Chr17: 5512596	GGTAAAGGAGATGGGTGGGTGG GGC[A/G]TGAAGGACCCGAAAG ACAAGGCCAG	C_1274533_10
NLRP3	rs10754558	Chr1: 247448734	GACAATGACAGCATCGGGTGTGTT GTT[C/G]TCATCACAGCGCCTCA GTTAGAGGA	C_26052028_10
	rs10802502	Chr1: 247448993	ATTTATTTATTTAAATTTTTTGTA A[C/T]AGTTTTGTTTTCTAATAAG AAAAAT	C_26052026_10

*rs: Sequência de referência; *Chr: Cromossomo localizado

4.18 Dosagem de Citocinas Plasmáticas

Para a dosagem das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento para cada um dos grupos, foram dosadas as citocinas: Interleucina-1 β (IL1 β), IL1RA, IL2, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8 (CXCL8), IL9, IL10, IL12p70, IL13, OS-15, IL17A, Interferon- γ (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α); quimiocinas: IP-10 (CXCL10), MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), PDGF-BB, RANTES (CCL5), VEGF, Eotaxina (CCL11), FGF Básico; e fatores de crescimento: Fator de Crescimento de Colônia de Granulócito (G-CSF [*do inglês Granulocyte Colony-Stimulating Factor*]), Fator de Crescimento de Colônia de Granulócito-Macrófago (GM-CSF [*do inglês Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*]) através da técnica de Luminex, que utiliza beads magnéticas com diferentes intensidades de fluorescência, conjugadas a 27 anticorpos específicos para cada molécula a ser analisada. Para este projeto foi utilizado o kit *e Bioplex-Pro Human Cytokine 27-Plex* da Bio-Rad, seguindo o protocolo e as recomendações do fabricante. A aquisição foi feita no equipamento Luminex 200 System da Fundação Oswaldo Cruz de Minas Gerais Instituto René Rachou (FIOCRUZ-MG) e analisadas pelo software Bioplex Manager.

4.19 Análise Estatística

Os resultados deste estudo foram tabulados e armazenados por meio do *Software Microsoft Excel*® (versão 2017 para *Windows*). O software *Graphpad Prism 9.0.0.1* foi utilizado para análise comparativa de citocinas circulantes entre os genótipos dos SNPs estudados. As variáveis contínuas foram analisadas pelos testes não paramétricos de *Mann-Whitney/Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de *Dunns* para comparar pares. O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) foi determinado pela comparação das frequências observadas e esperadas dos genótipos e alelos estudados, sendo aplicadas nos três grupos, através do site <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. As análises foram conduzidas considerando o IC de 95% e as diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Foram genotipadas amostras de um total de 356 indivíduos. Dos quais 139 eram pacientes convalescentes da COVID-19 sendo 124 (89,2%) homens e 15 (10,8%) mulheres. Dos 25 pacientes com COVID-19, 10 (40%) mulheres e 15 (60%) homens, e 192 controles negativos sendo 127 (66%) homens e 65 (34%) mulheres, resultado demonstrado na tabela 4.

Tabela 4 Variáveis sociodemográficas de indivíduos do grupo controle, convalescente e pacientes com COVID-19.

VARIÁVEIS	GRUPO CONTROLE (n=192)	GRUPO CONVALESCENTE (n=139)	GRUPO PACIENTE COVID-19 (n=25)
Idade (anos, mediana)	38	40	55
Sexo			
Masculino	127 (66%)	124 (89.2%)	15 (60%)
Feminino	65 (34%)	15 (10.8%)	10 (40%)

Os polimorfismos descritos nas tabelas abaixo foram submetidos ao teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* sendo as frequências genotípicas e alélicas dos grupos comparadas entre os grupos controle.

Tabela 5 Frequência dos alelos e genótipos dos polimorfismos nos genes *NLRP1* e *NLRP3* em pacientes convalescentes da COVID-19 e indivíduos controles.

PERFIL GENOTÍPICO E ALÉLICO	CN (n=192)	CONVALESCENTE (n=139)	OR (CI95%)	P	COMPARAÇÃO GENÓTIPOS
NLRP1 A/T (rs12150220)					
<i>AA</i>	80 (42%)	67 (48%)	0.543 (0.240-1.226)	0.1379	AA vs TT
<i>AT</i>	90 (46%)	62 (45%)	1.669 (0.764-3.648)	0.1951	AA+AT vs TT
<i>TT</i>	22 (12%)	10 (7%)	1.843 (0.816-4.162)	0.1379	TT vs AA
<i>A</i>	250 (65%)	196 (70%)	0.781 (0.560-1.088)	0.1436	A vs T
<i>T</i>	134 (35%)	82 (30%)			
NLRP1 A/G (rs35865013)					
<i>AA</i>	28 (14%)	23 (16%)	1.217 (0.224-6.615)	0.8196	AA vs GG
<i>AG</i>	161 (84%)	113 (82%)	0.720 (0.143-3.619)	0.6884	AA+AG vs GG
<i>GG</i>	03 (2%)	03 (3%)	0.821 (0.151-4.464)	0,8196	GG vs AA
<i>A</i>	217 (56%)	159 (57%)	0.973 (0.712-1.328)	0.8608	A vs G
<i>G</i>	167 (44%)	119 (43%)			
NLRP3 C/T (rs10802502)					
<i>CC</i>	73 (38%)	44 (32%)	1.452 (0.725-2.909)	0.2920	CC vs TT
<i>CT</i>	95 (49%)	74 (53%)	0.803 (0.427-1.509)	0.4944	CC+CT vs TT
<i>TT</i>	24 (13%)	21 (15%)	0.689 (0.344-1.380)	0.2920	TT vs CC
<i>C</i>	241 (63%)	162 (58%)	1.207 (0.880-1.655)	0.2429	C vs T
<i>T</i>	143 (37%)	116 (42%)			
NLRP3 C/G (rs10754558)					
<i>CC</i>	116 (60%)	53 (38%)	3.383 (1.482-7.719)	0.0026	CC vs GG
<i>CG</i>	65 (34%)	69 (50%)	0.436 (0.197-0.963)	0.0359	CC+CG vs GG
<i>GG</i>	11 (6%)	17 (12%)	0.296 (0.130-0.675)	0.0026	GG vs CC
<i>C</i>	297 (77%)	175 (63%)	2.009 (1.429-2.826)	0.00005	C vs G
<i>G</i>	87 (33%)	103 (37%)			

Segundo a tabela 5, a frequência do genótipo AA do NLRP1 rs12150220 no grupo controle e de pacientes convalescentes foi de 42% e 48%, respectivamente. O genótipo heterozigoto CT do NLRP3 rs10802502 apresentou frequência de 49% para o grupo controle e 53% para o grupo pacientes convalescentes, enquanto o genótipo GG do NLRP1 rs35865013 apresentou baixa frequência entre os dois grupos, 2% para o grupo controle e 3% para pacientes convalescentes. Para o polimorfismo do NLRP3 rs10754558 dos convalescentes quando comparado com o grupo controle foi encontrada diferenças significativas entre os genótipos CC vs GC (p=0.0026), CC+CG vs GG (p=0.0359), GG vs CC (p=0.0026) e alelos C vs G (p=0.00005).

Tabela 6 Frequência dos alelos e genótipos dos polimorfismos nos genes NLRP1 e NLRP3 em Pacientes com COVID-19 separados conforme diagnóstico clínico (Leve, Grave e Crítico) e indivíduos controles.

NLRP1 A/T (rs12150220)					
PERFIL GENOTÍPICO E ALÉLICO	CN(n=192)	LEVE (n=7)	OR (CI95%)	P	COMPARAÇÃO GENÓTIPOS
AA	80 (41,7%)	5 (71,4%)	0.178 (0.020 - 1.554)	0.0805	AA vs AT
AT	90 (46,9%)	1 (14,3%)	0.776 (0.089 - 6.754)	0.8182	AA+AT vs TT
TT	22 (11,4%)	1 (14,3%)	1.375 (0.153 - 12.388)	0.7756	TT vs AA
A	250 (65,1%)	11 (78,6%)			
T	134 (34,9%)	3 (21,4%)	0.509 (0.140 - 1.855)	0.3917	A vs T
GRAVE (n=8)					
AA	80 (41,7%)	6 (75%)	0.148 (0.017 - 1.257)	0.0449	AA vs AT
AT	90 (46,9%)	1 (12,5%)	0.906 (0.106 - 7.714)	0.0916	AA+AT vs TT
TT	22 (11,4%)	1 (12,5%)	1.650 (0.189 - 14.436)	0.6477	TT vs AA
A	250 (65,1%)	13 (81,25%)			
T	134 (34,9%)	3 (18,75%)	0.431 (0.121 - 1.537)	0.1823	A vs T
CRÍTICO (n=10)					
AA	80 (41,7%)	2 (20%)	2.667 (0.523 - 13.589)	0.2212	AA vs AT
AT	90 (46,9%)	6 (60%)	0.518 (0.103 - 2.595)	0.4157	AA+AT vs TT
TT	22 (11,4%)	2 (20%)	0.275 (0.037 - 2.065)	0.1825	TT vs AA
A	250 (65,1%)	10 (50%)			
T	134 (34,9%)	10 (50%)	1.866 (0.758 - 4.595)	0.1691	A vs T
NLRP1 A/G (rs35865013)					
PERFIL GENOTÍPICO E ALÉLICO	CN (n=192)	LEVE (n=7)	OR (CI95%)	P	COMPARAÇÃO GENÓTIPOS
AA	28 (14%)	3 (42,85%)	0.232 (0.049-1.092)	0.0458	AA vs AG
AG	161 (84%)	4 (57,15%)	0.228 (0.048-1.072)	0.0427	GG+AG vs AA
GG	03 (2%)	0 (0%)	0.860 (0.036-20.350)	0,5725	GG vs AA
A	217 (56%)	10 (71,4%)			
G	167 (44%)	4 (28,6%)	0.520 (0.160-1.686)	0.2680	A vs G
GRAVE (n=8)					
AA	28 (14%)	4 (50%)	0.174 (0.041-0.736)	0.0082	AA vs AG
AG	161 (84%)	4 (50%)	0.171 (0.040-0.723)	0.0074	GG+AG vs AA
GG	03 (2%)	0 (0%)	1.105 (0.049-25.169)	0,5152	GG vs AA
A	217 (56%)	12 (75%)			
G	167 (44%)	4 (25%)	0.433 (0.137-1.367)	0.1429	A vs G
CRÍTICO (n=10)					
AA	28 (14%)	0 (0%)	0.043 (0.007-0.255)	0.2.139e-06	GG vs AG
AG	161 (84%)	7 (70%)	0.037 (0.006-0.217)	0.2.413e-07	AA+AG vs GG
GG	03 (2%)	3 (30%)	0.018 (0.001-0.415)	0.00009	GG vs AA
A	217 (56%)	7 (35%)			
G	167 (44%)	13 (65%)	2.413 (0.942-6.182)	0.0591	A vs G
NLRP3 C/T (rs10802502)					
PERFIL GENOTÍPICO E ALÉLICO	CN (n=192)	LEVE (n=7)	OR (CI95%)	P	COMPARAÇÃO GENÓTIPOS
CC	73 (38%)	3 (42,8%)	0.512 (0.083-3.146)	0.4625	CC vs CT
CT	95 (49%)	2 (28,6%)	0.357(0.066-1.945)	0.2152	CC+CT vs TT
TT	24 (13%)	2 (28,6%)	0.493 (0.078-3.128)	0.4452	TT vs CC
C	241 (63%)	8 (57,1%)			
T	143 (37%)	6 (42,9%)	1.264 (0.430-3.717)	0.6696	C vs T
GRAVE (n=8)					
CC	73 (38%)	1 (12,5%)	3.842 (0.439-33.603)	0.1922	CC vs CT
CT	95 (49%)	5 (62,5%)	0.429 (0.082-2.246)	0.3029	CC+CT vs TT
TT	24 (13%)	2 (25%)	0.164 (0.014-1.894)	0.1030	TT vs CC
C	241 (63%)	7 (43,75%)			
T	143 (37%)	9 (56,25%)	2.167 (0.790-5.944)	0.1247	C vs T
CRÍTICO (n=10)					
CC	73 (38%)	2 (20%)	2.689 (0.543-13.332)	0.2092	CC vs CT
CT	95 (49%)	7 (70%)	1.286 (0.156-10.603)	0.8149	CC+CT vs TT
TT	24 (13%)	1 (10%)	0.658 (0.057-7.577)	0.7350	TT vs CC
C	241 (63%)	11 (55%)			
T	143 (37%)	9 (45%)	1.379 (0.558-3.408)	0.4849	C vs T
NLRP3 C/G (rs10754558)					
PERFIL GENOTÍPICO E ALÉLICO	CN (n=192)	LEVE (n=7)	OR (CI95%)	P	COMPARAÇÃO GENÓTIPOS
CC	116 (60%)	5 (71%)	0.921 (0.048-17.733)	0.4918	CC vs GG
CG	65 (34%)	2 (29%)	0.950 (0.051-17.694)	0.5147	CC+CG vs GG
GG	11 (6%)	0 (0%)	1.086 (0.056-20.908)	0.4918	GG vs CC
C	297 (77%)	12 (86%)			
G	87 (33%)	2 (14%)	0.569 (0.125-2.591)	0.7515	C vs G
GRAVE (n=8)					
CC	116 (60%)	3 (37,5%)	1.447 (0.070-29.788)	0.5941	CC vs GG
CG	65 (34%)	5 (62,5%)	1.077 (0.058-19.847)	0.4861	CC+CG vs GG
GG	11 (6%)	0 (0%)	0.691 (0.034-14.223)	0.5941	GG vs CC
C	297 (77%)	11 (69%)			
G	87 (33%)	5 (31%)	1.552 (0.525-4.587)	0.3836	C vs G
CRÍTICO (n=10)					
CC	116 (60%)	6 (60%)	3.515 (0.632-19.544)	0.1286	CC vs GG
CG	65 (34%)	2 (20%)	0.243 (0.046-1.285)	0.0729	CC+CG vs GG
GG	11 (6%)	2 (20%)	0.284 (0.051-1.582)	0.1286	GG vs CC
C	297 (77%)	14 (70%)			
G	87 (33%)	6 (30%)	1.463 (0.546-3.921)	0.4236	C vs G

A tabela 6 demonstra que entre todos os SNPs de NLRP1 e NLRP3 estudados, somente o NLRP1 rs12150220 ($p \leq 0,04$) e rs35865013 ($p \leq 0,0001$) se desviaram do Equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo de pacientes com COVID-19. O genótipo NLRP1 rs35865013 parece ser fator de risco para os pacientes com COVID-19 na população em estudo (AA+AG vs GG OR: 0.037 [IC 95%: 0.006-0.217, $p=0.2.413e-07$]; GG vs AG OR: 0.043 [IC 95%: 0.007-0.255, $p=0.2.139e-06$]. Todavia, quando observado os alelos individualmente para o SNP, não foi observada associação com o alelo G (OR: 2.413 [IC 95%: 0.942-6.182, $p=0.0591$).

Tabela 7 Frequência dos alelos e genótipos dos polimorfismos nos genes das citocinas IL1 β , IL6 e IL18 em pacientes convalescentes da COVID-19 e indivíduos controles.

PERFIL GENOTÍPICO E ALÉLICO	CN (n=192)	CONVALESCENTE (n=139)	OR (CI95%)	P	COMPARAÇÃO GENÓTIPOS
IL-1β -511 (rs16944)					
TT	62 (33%)	44 (32%)	0.934 (0.566-1.542)	0.7906	TT vs CT
CT	95 (49%)	63 (45%)	0.745 (0.435-1.277)	0.2841	CC+CT vs TT
CC	35 (18%)	32 (23%)	0.725 (0.408-1.290)	0.2733	CC vs CT
C	165 (42%)	127 (46%)	0.896 (0.657-1.222)	0.4874	C vs T
T	219 (58%)	151 (54%)			
IL-6 -174 (rs1800795)					
GG	73 (81,0%)	78 (56%)	2.983 (1.564-5.691)	0.0007	GG vs GC
GC	16 (18,0%)	51 (37%)	3.358 (1.797-6.275)	0.0001	GG vs GC+CC
CC	1 (1,0%)	10 (7%)	9.359 (1.169-74.93)	0.0116	GG vs CC
G	162 (90%)	207 (74%)	0.324 (0.186-0.565)	0.00004	C vs G
C	18(10%)	71 (26%)			
IL-18 -137 (rs1872384)					
CC	20 (10%)	23 (16%)	0.467 (0.231-0.942)	0.0316	CC vs GG
GC	90 (47%)	72 (52%)	1.610 (1.018-2.544)	0.0409	CC+GC vs GG
GG	82 (43%)	44 (32%)	2.143 (1.062-4.326)	0.0316	GG vs CC
C	130 (34%)	118 (42%)	0.694 (0.505-0.954)	0.0241	C vs G
G	254 (66%)	160 (58%)			

Na tabela 7 encontramos associação entre os genótipos da IL6 e IL18, onde IL6 rs1800795 mostrou ser estatisticamente significativa quando comparados os genótipos GG vs GC com valor de p ($p=0.0007$), GG vs GC+CC ($p=0.0001$) e GG vs CC ($p=0.0116$), assim como para comparações alélicas ($p=0.00004$). O resultado também foi significativo para o polimorfismo da IL18 -137 rs1872384, pois observou-se que para os genótipos CC vs GG o valor de p ($p=0.0316$), CC+GC vs GG ($p=0.0409$) e GG vs CC ($p=0.0116$), e a comparação dos alelos C vs G ($p=0.0241$).

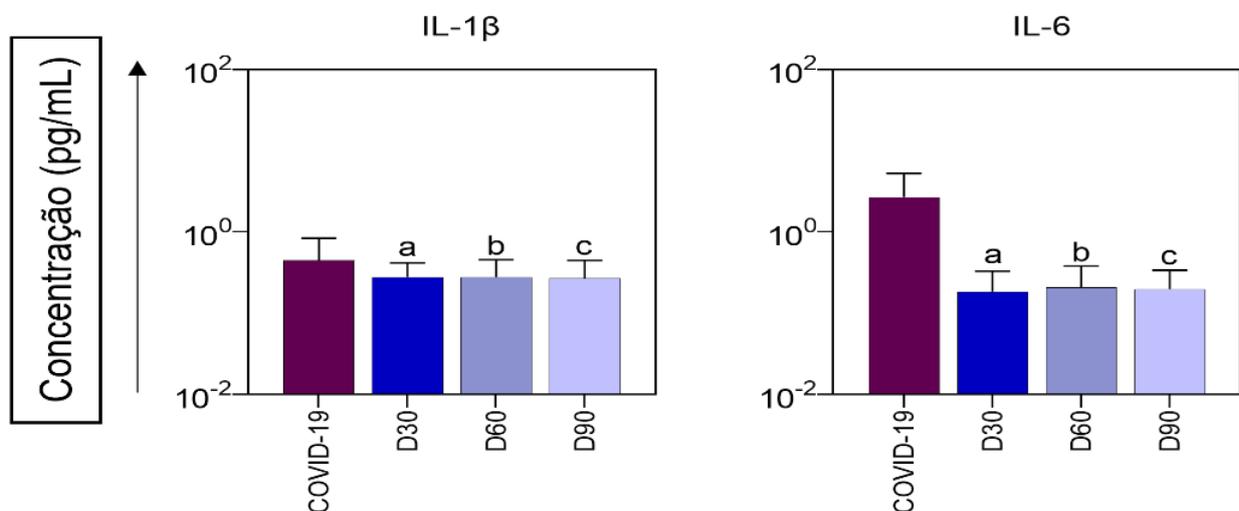
Tabela 8 Frequência dos alelos e genótipos dos polimorfismos nos genes *IL1 β* , *IL6* e *IL18* em Pacientes com COVID-19 separados conforme diagnóstico clínico (Leve, Grave e Crítico) e indivíduos controles.

PERFIL GENOTÍPICO E ALÉLICO	CN (n=192)	PACIENTES (n=25)	OR (CI95%)	P	COMPARAÇÃO GENÓTIPOS
IL-1β -511 (rs16944)					
LEVE (n=7)					
TT	62 (33%)	2 (28%)	0.979 (0.159-6.027)	0.9816	TT vs CT
CT	95 (49%)	3 (44%)	1.192 (0.122-6.318)	0.8360	CC+CT vs TT
CC	35 (18%)	2 (28%)	0.565 (0.076-4.185)	0.5712	CC vs TT
C	165 (42%)	7 (50%)	0.753 (0.259-2.190)	0.6019	C vs T
T	219 (58%)	7 (50%)			
GRAVE (n=8)					
TT	62 (33%)	2 (25%)	0.979 (0.159-6.027)	0.9816	TT vs CT
CT	95 (49%)	3 (37,5%)	0.372 (0.085-1.628)	0.1734	CC+CT vs TT
CC	35 (18%)	3 (37,5%)	0.376 (0.060-2.362)	0.2807	CC vs TT
C	165 (42%)	7 (43,7%)	0.586 (0.214-1.606)	0.2937	C vs T
T	219 (58%)	9 (56,3%)			
CRÍTICO (n=10)					
TT	62 (33%)	4 (40%)	0.653 (0.157-2.706)	0.5539	TT vs CT
CT	95 (49%)	4 (40%)	0.892 (0.181-4.382)	0.8877	CC+CT vs TT
CC	35 (18%)	2 (20%)	1.129 (0.197-6.479)	0.8916	CC vs TT
C	165 (42%)	12 (60%)	1.130 (0.452-2.828)	0.7936	C vs T
T	219 (58%)	8 (40%)			
IL-6 -174 (rs1800795)					
LEVE (n=7)					
GG	73 (81,0%)	03 (43%)	6.083 (1.238-29.882)	0.0140	GG vs GC
GC	16 (18,0%)	04 (57%)	5.725 (1.171-28.000)	0.0179	GG vs GC+CC
CC	1 (1,0%)	0 (0%)	7.000 (0.239-204.66)	0.8394	GG vs CC
G	162 (90%)	11 (78%)	0.278 (0.079-0.977)	0.1082	C vs G
C	18(10%)	3 (22%)			
GRAVE (n=8)					
GG	73 (81,0%)	04 (50%)	4.562 (1.031 - 20.199)	0.0320	GG vs GC
GC	16 (18,0%)	04 (50%)	4.294 (0.975 - 18.921)	0.0398	GG vs GC+CC
CC	1 (1,0%)	0 (0%)	5.444 (0.193 - 153.50)	0.8149	GG vs CC
G	162 (90%)	12 (75%)	0.333 (0.097 - 1.143)	0.1721	C vs G
C	18(10%)	4 (25%)			
CRÍTICO (n=10)					
GG	73 (81,0%)	06 (60%)	3.042 (0.768-12.04)	0.1000	GG vs GC
GC	16 (18,0%)	04 (40%)	2.863 (0.727-11.27)	0.1199	GG vs GC+CC
CC	1 (1,0%)	0 (0%)	0.265 (0.010-7.190)	0.7744	GG vs CC
G	162 (90%)	14 (70%)	2.250 (0.678-7.463)	0.2860	C vs G
C	18(10%)	6 (30%)			
IL-18 -137 (rs1872384)					
LEVE (n=7)					
CC	20 (10%)	2 (28%)	0.444 (0.076-2.597)	0.3565	CC vs CG
CG	90 (47%)	4 (58%)	0.291 (0.053-1.598)	0.1324	GG+GC vs CC
GG	82 (43%)	1 (14%)	8.200 (0.708-94.99)	0.0483	GG vs CC
C	130 (34%)	8 (57%)	0.384 (0.130-1.130)	0.0884	C vs G
G	254 (66%)	6 (43%)			
GRAVE (n=8)					
CC	20 (10%)	3 (37,5%)	0.296 (0.061-1.429)	0.1112	CC vs CG
CG	90 (47%)	4 (50%)	0.194 (0.043-0.872)	0.0186	GG+GC vs CC
GG	82 (43%)	1 (12,5%)	12.300 (1.214-124.58)	0.0083	GG vs CC
C	130 (34%)	10 (62,5%)	3.256 (1.158-9.158)	0.0185	C vs G
G	254 (66%)	6 (37,5%)			
CRÍTICO (n=10)					
CC	20 (10%)	2 (20%)	0.444 (0.076-2.597)	0.3565	CC vs CG
CG	90 (47%)	4 (40%)	1.118 (0.306-4.091)	0.8659	GG+GC vs CC
GG	82 (43%)	4 (40%)	2.050 (0.350-11.991)	0.4172	GG vs CC
C	130 (34%)	8 (40%)	0.768 (0.306-1.925)	0.5720	C vs G
G	254 (66%)	12 (60%)			

Na tabela 8 encontramos associação entre os genótipos da IL6 rs1800795 e IL18 rs1872384, que mostrou ser estatisticamente significativa nos grupos leve e grave. Na IL6 para GG vs GC (p=0.0140) e (p=0.0320), GG vs GC+CC (p=0.0179) e (p=0.0398). Na IL18 em GG vs CC (p=0.0483) e (p=0.0083) nos grupos leve e grave respectivamente. No grupo grave GG+GC vs CC (p=0.0186) e alelos C vs G (p=0.0185).

Para este estudo foram dosadas as concentrações séricas das citocinas IL1 β e IL6 de 77 pacientes, divididos em 15 pacientes com COVID-19 e em 62 pacientes convalescentes da COVID-19. Dos pacientes convalescentes dosamos estas citocinas nos períodos D30 (30 dias após a infecção), D60 (60 dias após a infecção) e D90 (90 dias após a infecção).

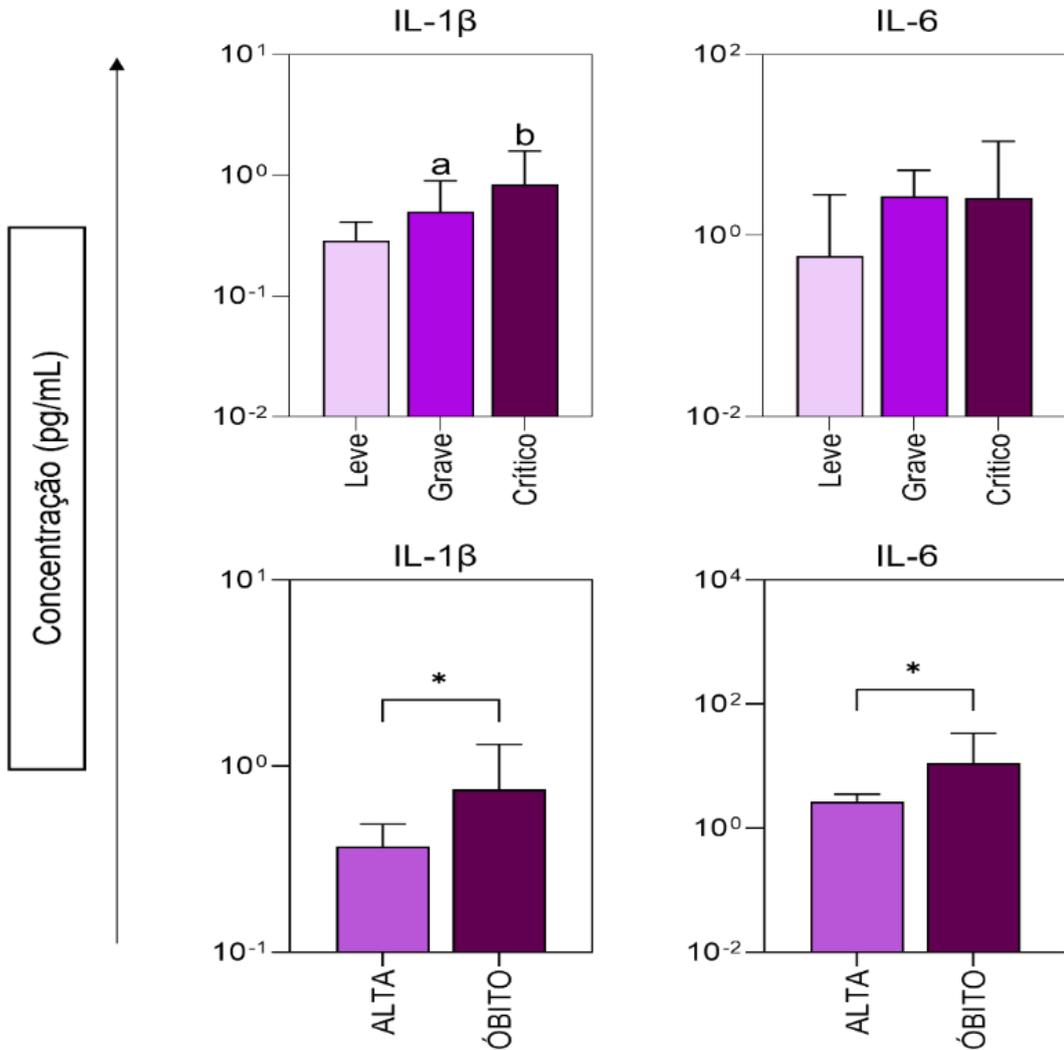
Gráfico 1: Concentrações dos mediadores solúveis IL1 β e IL6 em pg/mL, na comparação entre o grupo COVID-19 e convalescentes (D30, D60 e D90).



Legenda: (a), (b) e (c) valor p<0,05

No gráfico 1 para as análises estatísticas foram conduzidas usando o teste de *Kruskal-Wallis*, seguido do teste de *Dunn's* para múltiplas comparações. Quando avaliamos essas concentrações aos pares: **a** COVID-19 vs D30; **b** COVID-19 vs D60; **c** COVID-19 vs D90; **d** D30 vs D60; **e** D30 vs D90; **f** D60 vs D90. Verificamos um aumento de IL1 β (p=0.01) e IL6 (p<0.0001) quando comparamos pacientes com COVID-19 e os pacientes convalescente (D30, D60 e D90), este resultado considerado estatisticamente significativo.

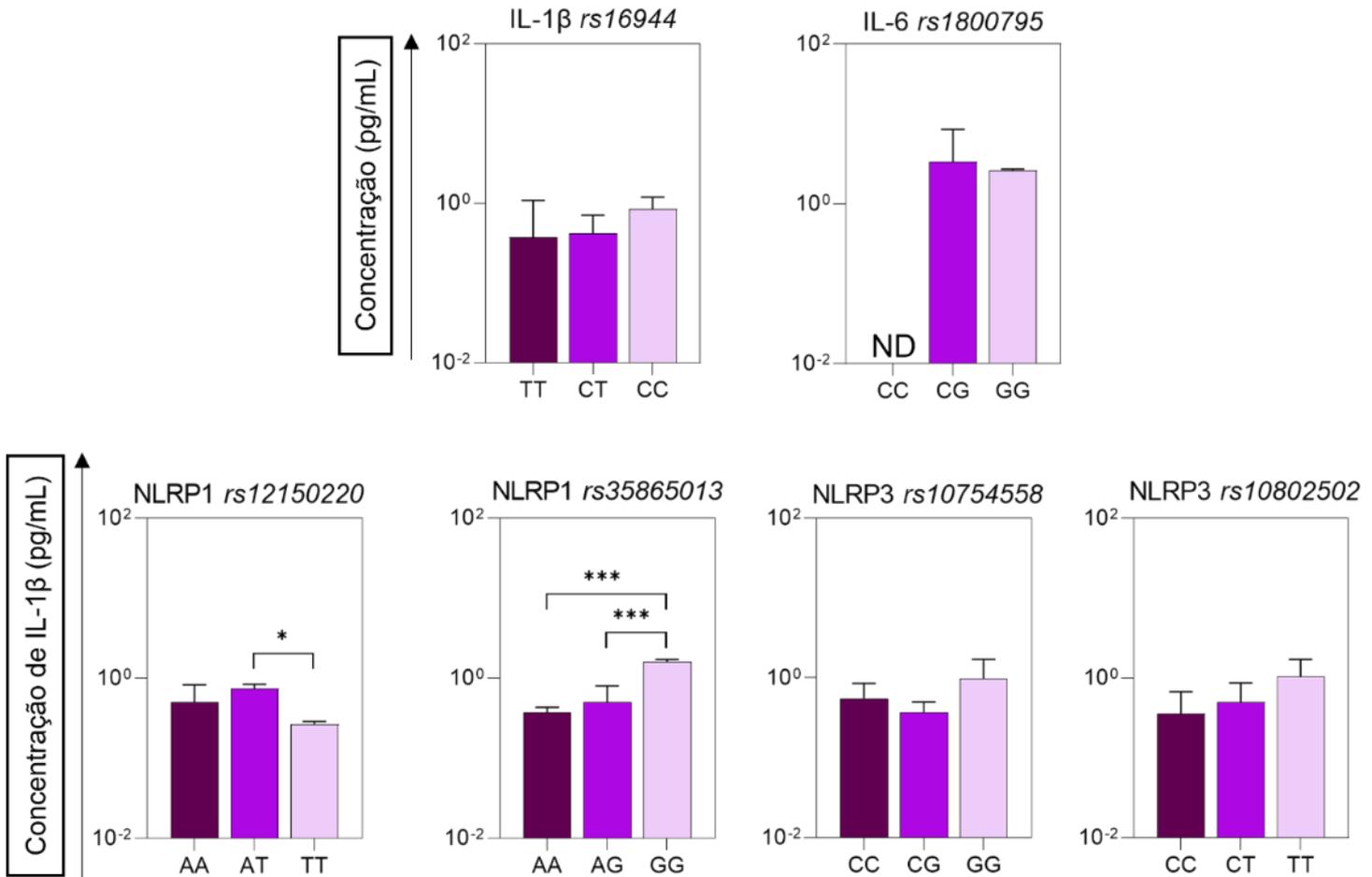
Gráfico 2: Concentrações dos mediadores solúveis IL1 β e IL6 em pg/ml. Comparação entre os grupos leve, grave e crítico/alta e óbito.



Legenda: (a), (b) e (*) valor $p < 0,05$

A citocina IL1 β apresentou aumento significativo no grupo de pacientes com COVID-19 Grave e Crítico quando comparado com o Leve vs Grave ($p=0.049$) e Grave vs Crítico ($p=0.015$). Diferenças estatísticas significantes foram observadas ainda nos grupos Alta e Óbito, destacando o aumento significativo da IL1 β ($p=0.030$) e IL6 ($p=0.034$) no grupo Óbito.

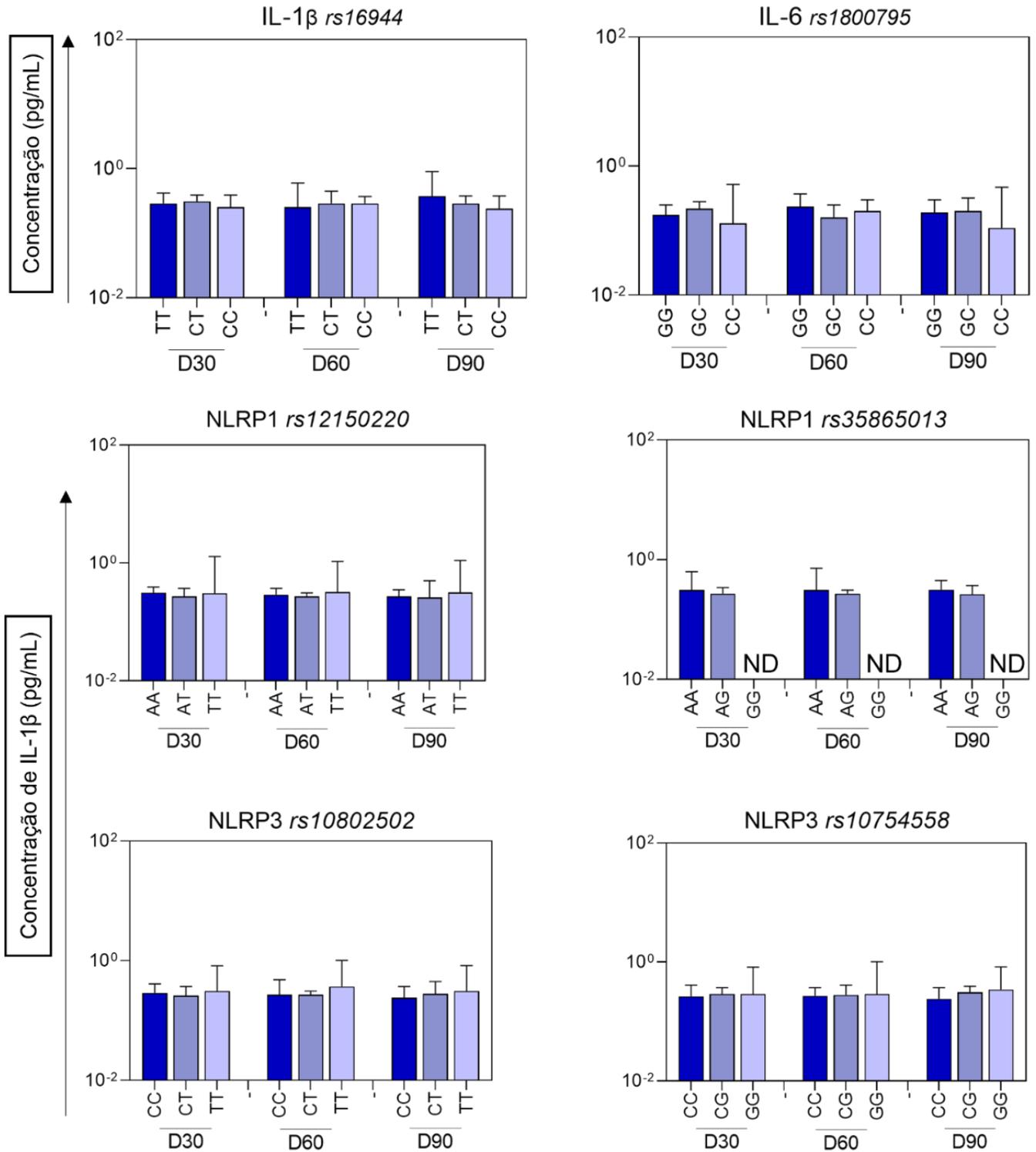
Gráfico 3: Concentrações dos mediadores solúveis IL1 β e IL6 em pg/ml para seus respectivos SNPs, e da concentração de IL1 β para os SNPs das variantes de NLRP1 e NLRP3 nos pacientes com COVID-19.



Legenda: (*/***) valor $p < 0,05$. **ND** (não detectado)

No gráfico 3, a concentração das citocinas IL1 β e IL6 foram associadas com os polimorfismos dos seus respectivos genes *IL1 β* e *IL6* dos quais não encontramos diferença estatisticamente significativa. Quando comparamos a concentração da IL1 β com os polimorfismos NLRP 1 e NLRP3, verificamos que os pacientes com COVID-19, o polimorfismo NLRP1 rs12150220 em heterozigose AT apresentaram maior concentração da citocina IL1 β em relação ao homozigoto TT com diferença estatisticamente significante ($p=0.039$). Diferença estatística foi demonstrada no NLRP1 rs35865013 tanto na comparação de AA com GG ($p=0.0002$), quanto na comparação de AG com GG ($p=0.0007$).

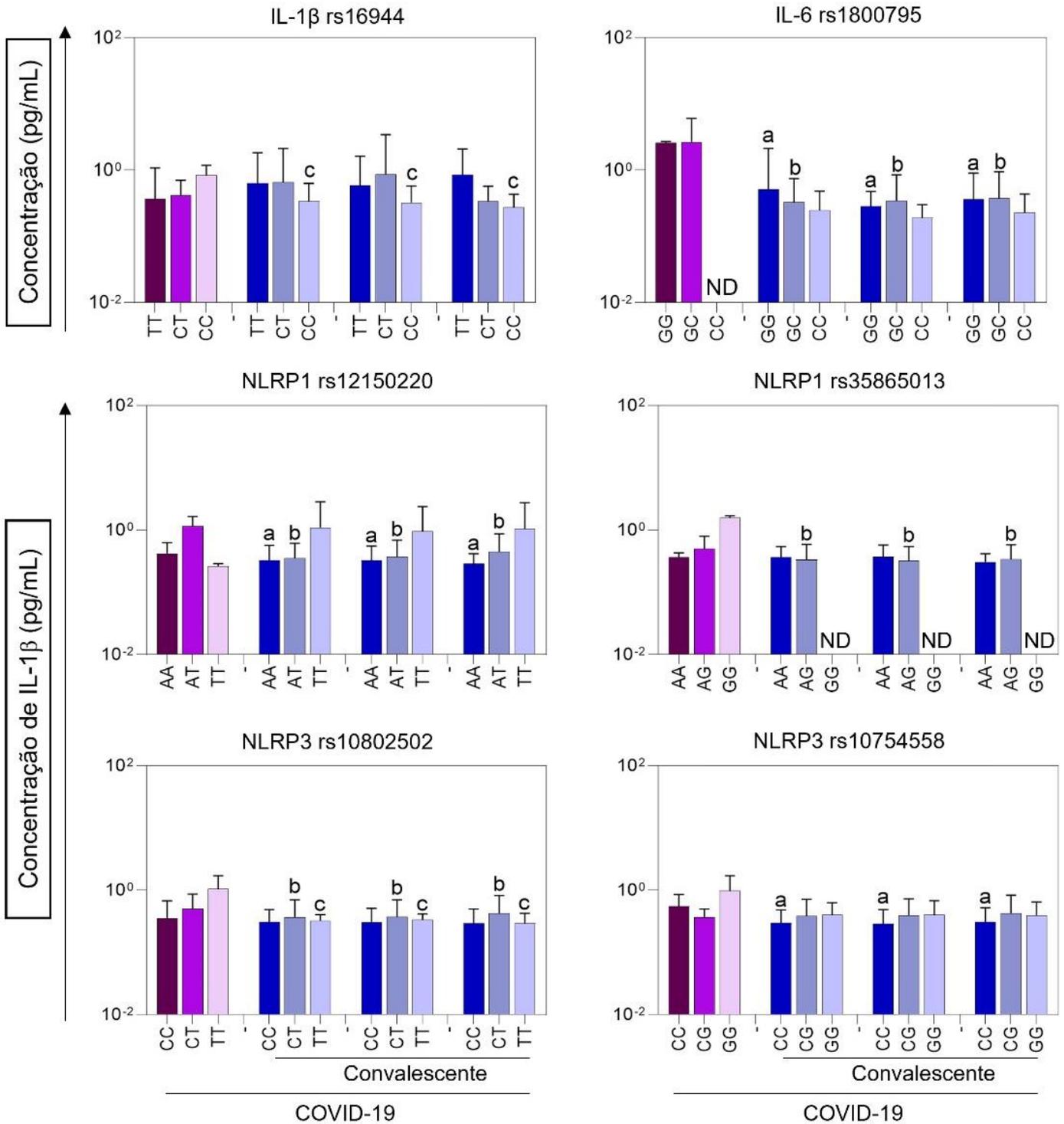
Gráfico 4: Concentrações dos mediadores solúveis IL1 β e IL6 em pg/ml para seus respectivos SNPs, e da concentração de IL1 β para os genótipos das variantes de NLRP1 e NLRP3 nos pacientes convalescentes da COVID-19 nos períodos D30, D60 e D90.



Legenda: ND (não detectado)

No gráfico 4 mostram que as concentrações da citocina IL1 β foram similares entre os grupos estudados, não havendo diferença estatística significativa. Na análise da citocina IL6, notou-se que houve diminuição na concentração sérica nos genótipos CC dos SNPs de IL6 dos pacientes em relação aos grupos D30 e D90. No entanto, diferenças estatísticas significantes não foram observadas.

Gráfico 5: Concentrações das citocinas IL1 β e IL6 em pg/ml para seus respectivos SNPs, e da concentração de IL1 β para os genótipos das variantes NLRP1 e NLRP3, nos pacientes com COVID-19 em comparação com pacientes convalescentes da COVID-19 nos períodos D30, D60 e D90.



Legenda: (a), (b) e (c) valor $p < 0,05$. ND (não)

No gráfico 5 a produção das citocinas IL1 β e IL6, foram associadas com os polimorfismos IL1 β (rs16944), IL6 (rs1800795), NLRP1 (rs12150220, rs35865013) e NLRP3 (rs10802502, rs10754558). A análise dos resultados demonstraram diferenças estatisticamente significantes quando comparamos os genótipos semelhantes entre os grupos dos pacientes com COVID-19 vs pacientes convalescentes nos períodos D30, D60 e D90, onde os polimorfismos IL1 β rs16944 “CC” (D30: p=0.0059; D60: p=0.0029; D90: p=0.0001), IL6 rs1800795 “GG” (D30: p<0.0001, D60: p<0.0001, D90: p<0.0001) e “GC” (D30: p<0.0001, D60: p<0.0001 e D90: p<0.0001), NLRP1 rs35865013 “GG” (D30: p<0.0001, D60: p=0.0001, D90: p=0.0037), NLRP1 rs12150220 “AA” (D30: p=0.0427, D60: p=0.0517, D90: p=0.0095) e “AT” (D30: p<0.0001, D60: p=0.0001, D90: p=0.0037), *NLRP3* rs10802502 “CT” (D30: p=0.0083, D60: p= 0,0126, D90: p=0.0384) e “TT” (D30: p=0.0449, D60: p=0.0467, D90: p=0.0549), NLRP3 rs10754558 “CC” (D30: p=0.0032, D60: p=0.0042, D90: p=0.0061) dos pacientes com COVID- 19 apresentaram maior concentração das citocinas IL1 β /IL6 em relação aos outros genótipos dos pacientes convalescentes em todos os diferentes períodos (D30, D60 e D90).

6. DISCUSSÃO

A doença do coronavírus-19 (COVID-19) é uma doença respiratória altamente contagiosa e às vezes fatal causada pelo SARS-CoV-2. Os sintomas do COVID-19 incluem febre, calafrios, tosse, dor de garganta, dor de cabeça, congestão nasal (coriza), problemas no olfato ou no paladar, e uma pequena porcentagem de pacientes podem desenvolver a forma mais grave da doença, uma síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). Sabe-se que a inflamação pode induzir uma resposta imune envolvendo células da imunidade inata, e esse processo contribui para inflamação excessiva e um pior desfecho clínico na COVID-19 (Chen, N. et al., 2020).

O recrutamento de células imunes para os pulmões de indivíduos infectados leva à liberação excessiva de citocinas (tempestade de citocinas), que causam danos estruturais aos pulmões (Xu et al., 2020). Devido a essa interação celular, extremamente importante para a ativação e regulação do processo inflamatório, optamos por avaliar os polimorfismos dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e verificar sua possível influência na gravidade ou na convalescência da COVID-19.

Os coronavírus geram intermediários de RNA de fita dupla (ds) durante seu ciclo de replicação, e recentemente foi demonstrado que o inflamassoma NLRP1 humano é um sensor para dsRNA, mais especificamente, foi demonstrado que o vírus *Semliki Forest*, um vírus de RNA de fita positiva semelhante aos coronavírus, é um potente ativador de NLRP1 humano (BAUERNFRIED et al., 2021).

Este estudo pesquisou no gene *NLRP1*, as possíveis contribuições genéticas para a COVID-19 através de seus polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Quando analisamos a frequência dos SNPs do grupo controle e convalescente com outras populações do mundo, verificamos que todos os indivíduos com NLRP1 rs12150220 AT ($p=0,1436$) expressaram frequências (alelos A: 65% e T: 35%) semelhantes a população nativa americana (alelos A: 63% e T: 37%). Os indivíduos do grupo convalescente apresentaram frequências (alelos A: 70% e T: 30%) semelhantes especificamente a população de Porto Rico (A: 72% e T: 28%). Enquanto o NLRP1 rs35865013 AG ($p=0,8608$) expressou frequência (A: 57% e G: 43%) semelhante a população do sul da Ásia (A: 60% e G: 40%) (ENSEMBL.ORG, 2022). Estudos apresentam que essa semelhança com a população nativa americana é devido a colonização portuguesa onde havia cerca de 2,5 milhões de americanos vivendo no Brasil. Desta forma, a

ascendência e miscigenação nativa americana é estatisticamente significativa maior na região Norte comparados com as regiões Nordeste, Sul e Sudeste, (DE SOUZA et al., 2019).

Estudos recentes realizados por Robinson (2020) e Tsu (2021), apresentaram que o NLRP1 humano também pode ser ativado por vírus, especificamente da família *Picornaviridae*, responsáveis por doenças como poliomielite, hepatite A e resfriado comum. Relatam que o NLRP1 humano é altamente expressa no epitélio das vias aéreas, sendo ativado através da clivagem feita pela protease 3C de enterovírus, como o rinovírus humano (HRV), desencadeando várias funções imunológicas como o recrutamento de outras proteínas formando o inflamassoma, resultando na ativação da caspase-1 levando a morte celular e secreção de citocinas inflamatórias como IL18, através das células epiteliais das vias aéreas infectadas. A partir disso, indicaram que o NLRP1 pode contribuir para doenças inflamatórias das vias aéreas, como é o caso da COVID-19 (ROBINSON et al., 2020; TSU et al., 2021a).

Pesquisa de Lucas (2021) apresentou que a elevação precoce nos níveis de citocinas como IL1 β e IL18 em pacientes com COVID-19 moderado e grave estão associadas aos piores resultados da doença, sugerindo que a via do inflamassoma pode contribuir para o desenvolvimento da doença nesses pacientes (LUCAS et al., 2021). Diferente das pesquisas de Plenéz (2022) que demonstra ao menos em células epiteliais que o NLRP1 possui uma função protetora contra o Sars-Cov-2 (PLANÈS et al., 2022a). Assim como, um estudo feito por Dadmanesh (2020) demonstrou que os inflamassomas, principalmente o NLRP1, NLRP3 e NLRP12 contribuíram significativamente no estímulo da resposta imune viral, induzindo especificamente a imunidade humoral (DADMANESH; MEHDI; GHORBAN, 2020). No nosso estudo encontramos diferença estatisticamente significativa nos polimorfismos de IL18 quando comparamos nosso grupo controle com pacientes com COVID-19, em GG vs CC (p=0.0483) e (p=0.0083) nos grupos leve e grave respectivamente. No grupo grave GG+GC vs CC (p=0.0186) e alelos C vs G (p=0.0185). Isso pode ser um indicativo que esses polimorfismos estão envolvidos nessa resposta à COVID-19.

De acordo com essas informações, a ativação do inflamassoma de NLRP1 tanto nos estudos feitos em camundongos quanto da infecção por SARS-CoV-2 nas células epiteliais *in vitro* sugerem que a inflamação causada pelo NLRP1 pode ser benéfica e prejudicial em pacientes com COVID-19, ou seja, isto irá depender do estado do paciente (PLANÈS et al., 2022a), pois estudos feitos com pacientes com síndromes periódicas associadas à criopirina relatam que a taxa de produção *in vivo* de IL1 β é cinco vezes maior em indivíduos doentes em comparação com indivíduos saudáveis (LACHMANN et al., 2009).

Desta forma, não foram encontrados estudos que associasse o polimorfismo rs35865013 de NLRP1 com a COVID-19. No entanto, o SNP 12150220 de NLRP1 está associado principalmente a doenças autoimunes como diabetes tipo 1 (MAGITTA et al., 2009), vitiligo (JIN et al., 2007), doença celíaca (PONTILLO et al., 2011), doença autoimune da tireoide (ALKHATEEB; JARUN; TASHTOUSH, 2013), lúpus eritematoso sistêmico (PONTILLO et al., 2012a), doenças inflamatórias intestinais (DE IUDICIBUS et al., 2011) e em um estudo recente com COVID-19 grave (LEAL et al., 2023).

Quando comparamos os resultados da frequência alélica de NLRP3 dos pacientes convalescentes verificamos que o rs10802502 “CT” apresentam frequências alélicas (C: 58%; T: 42%) que mais se aproxima da população americana (C: 63%; T: 37%) e com frequência diferente dos Europeus (C: 43%; T: 57%). Sendo a frequência do grupo controle (C: 63%; T: 37%) se iguala a frequência alélica dos americanos. Quando analisamos o rs10754558 “CG” dos pacientes convalescentes exprimem frequências (C: 75%; G: 25%) que é semelhante a população americana e africana (C: 75%; G: 25%) (ENSEMBL, 2022), quando comparados com nosso grupo controle (C: 77%; G:33%) encontramos os resultados estatisticamente significantes (OR: 2.009 [IC 95%: 1.429-2.826, p=0.00005) na comparação desses alelos.

A ativação do NLRP3 em doenças virais se dá através do reconhecimento dos sinais citosólicos de perigo, como lesão mitocondrial, proteínas agregadas e outros danos que o vírus causa na célula (ALLEN et al., 2009). Uma resposta imune efetiva colabora para a eliminação de vírus invasores, entretanto, alguns vírus desenvolveram habilidades capazes de suprimir a ativação de NLRP3, como por exemplo o vírus *Morbillivirus* que causa o sarampo e em outros casos há vírus que induzem a ativação aumentada deste inflamassoma, como o vírus Zika (ZKV). Neste caso, estudo de Wang (2018) demonstrou a proteína NS5 facilitou a entrada do vírus no cérebro causando a morte dos camundongos utilizados no estudo ao ativar o NLRP3 (VANAJA; RATHINAM; FITZGERALD, 2015; WANG et al., 2018a; ZHENG et al., 2018).

Um estudo realizado por Rodrigues (2020) indica que a resposta inflamatória exacerbada decorrente da ativação do inflamassoma NLRP3 é visto pelo sistema imune como sinal de perigo, esse alerta reforça a resposta imune e, portanto, retroalimenta a inflamação impedindo que tenha um processo anti-inflamatório causando a tempestade de citocinas. Foi observado também que o NLRP3 pode estar associado ao resultado do COVID-19. Os níveis elevados de IL18, como produto do inflamassoma, foram encontrados em pacientes que precisaram de ventilação mecânica e naqueles que faleceram em decorrência da doença (RODRIGUES et al., 2020a). Em pacientes de COVID-19, foi observado a presença de morte

celular e produtos proveniente de NLRP3, como IL1 β , IL18 e LDH (lactado desidrogenase) em soros de pacientes indicando seu envolvimento com este evento (CHI et al., 2020; HUANG et al., 2020; RODRIGUES et al., 2020a).

Estudos realizados com SARS-CoV, vírus também pertencente à família *Coronaviridae*, indicam que o vírus codifica 3 proteínas de canal iônico: a E, a ORF3a e ORF8a, sendo as duas últimas proteínas acessórias, tanto a E quanto a ORF3a são necessárias para a replicação e virulência viral, sendo que a proteína E é capaz de ativar o NLRP3 (CASTAÑO-RODRIGUEZ et al., 2018; NIETO-TORRES et al., 2015; WILSON et al., 2004). Logo, o RNA viral promove a ativação do NLRP3 através de efluxo de potássio e produção de espécies reativas de oxigênio mitocondriais (CHEN et al., 2019). Já com relação ao SARS-CoV-2, não é claro como ocorre a ativação desse inflamassoma. Porém, um estudo publicado por Pan (2021) indica que a proteína N promove a ativação de NLRP3 através de uma ligação direta, além de agravar a lesão pulmonar levando a SDRA. Este trabalho indica que a inibição do NLRP3 pode reduzir a tempestade de citocinas e a lesão pulmonar causada pelo SARS-CoV-2 (PAN et al., 2021).

Com relação aos polimorfismos estudados neste trabalho, Maes (2022) observou que o genótipo GG do polimorfismo rs10758554 é fundamental na COVID-19 crítica (MAES et al., 2022a). Este polimorfismo também está relacionado com diabetes tipo 2, doença arterial coronária, obesidade e entre outros, essas doenças citadas são fatores de risco para a COVID-19 (GRANT; DIXIT, 2013; WAN et al., 2019; ZHOU et al., 2016). Isso se comprova no estudo de Lopes-Reyes (2020) que concluiu que a infecção por SARS-CoV-2 pode agravar o estado inflamatório sistêmico em pessoas obesas (LÓPEZ-REYES et al., 2020). Com isso, pode-se supor que os polimorfismos de NLRP3 associados a doenças inflamatórias podem agravar o resultado do COVID-19 (MAES et al., 2022b). No grupo convalescente encontramos uma associação significativa (OR: 3.383 [IC 95%: 1.482-7.719, p=0.0026) quando comparamos o genótipo GG vs CC com nosso grupo controle, podendo este resultado concordar com os estudos descritos acima e relacionar o polimorfismo de NLRP3 rs10758554 com COVID-19.

Estudos recentes relataram que mediadores inflamatórios como IL1 β , IL6 e LDH estão intimamente associados a casos graves de COVID-19 (WU et al., 2020). A sinalização do inflamassoma é necessária para a defesa contra a infecção viral, no entanto, ela contribui para a resposta hiper inflamatória e a ativação do inflamassoma NLRP3, que provou desempenhar um papel fundamental na gravidade da infecção por SARS-CoV-2 (RODRIGUES et al., 2020b).

Os níveis elevados de IL1 β aumentam a expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias, como o próprio TNF- α e IL6, e ativam os inflamassomas, podendo contribuir para a tempestade de citocinas na COVID-19 (RODRIGUES et al., 2020b). Um outro estudo evidenciou a associação do polimorfismo rs10754558 do gene NLRP3 com risco para quadros mais severos da COVID-19 (MAES et al., 2022), corroborando com nossos achados, que nos pacientes com COVID-19 apresentaram uma diferença estatisticamente significativa da concentração dos mediadores IL1 β e IL6 quando comparados com as concentrações dos pacientes convalescentes, nos diferentes estágios da convalescença.

Em nossos resultados foram observados aumento significativo na concentração dos mediadores solúveis IL1 β e IL6 nos pacientes com COVID-19 que vieram a óbito. Resultados similares foram observados por Bergamaschi (2021), que encontrou uma diferença estatística entre as dosagens da IL1 β e IL6 nos grupos de pacientes Grave/Óbitos quando comparados com o grupo Assintomáticos/Leve, associando-se os altos níveis das citocinas IL1 β e IL6 com a progressão da gravidade da COVID-19 (BERGAMASCHI et al., 2021). Dados descritos por Gong (2020) e Keddíe (2020), divergem dos observados em nosso estudo, pois não encontraram diferença significativa da IL1 β nos grupos de pacientes estudados, porém nos mesmos estudos comprovaram que o aumento IL6 está relacionada com a gravidade da COVID-19 (GONG et al., 2020; KEDDIE et al., 2020).

O SNP rs16944 CT no gene IL1 β está relacionado à região promotora, e tem sido associado ao aumento da produção de IL1 β , consequentemente aumentando o risco do desenvolvimento de doenças inflamatórias (DINARELLO, 2018). Em um estudo feito por Balzanelli (2022) demonstrou que os portadores de IL1 β rs16944 com genótipo CT têm sido associados ao aumento da produção de IL1 β e ao grau de inflamação, como também foram observados com maior incidência de infecção por COVID-19 (IC 95%, $p > 0,05$) (BALZANELLI et al., 2022). Este resultado difere do nosso estudo que apresentou um aumento significativo na concentração de IL1 β nos pacientes com COVID-19 que possuem o genótipo CC, quando comparamos com os mesmos genótipos CC dos pacientes convalescentes.

O polimorfismo IL6 rs1800795 demonstrou estar altamente relacionado a padrões inflamatórios e neuropáticos em diversas doenças, como diabetes mellitus tipo 2, aterosclerose, doença cardiovascular e COVID-19. No estudo de Kouhpayeh (2022) e Rokni (2022) mostraram que o genótipo GG deste polimorfismo é responsável pela alta expressão do gene IL6, e quando comparados entre os grupos estudados, verificaram diferenças significativas entre os dois grupos (COVID-19 vs saudáveis) (IC 95%, $p < 0,005$), por outro lado, o GC

pareceu exercer uma atividade mais protetora (IC 95%, $p < 0,05$) (KOUHPAYEH, 2022; ROKNI et al., 2022). Em nosso estudo, indivíduos com genótipos GC e GG do polimorfismo IL6 rs1800795, apresentaram risco de gravidade significativamente maior, com alta concentração da citocina IL6 nos pacientes com COVID-19 que possuíam esse genótipo, em comparação com o grupo convalescente pareando os mesmos genótipos. Não encontramos o genótipo CC nos pacientes com COVID-19, esse resultado corrobora com o estudo de Verma (2023) que em 97 pacientes com COVID-19 severa não apresentaram o genótipo CC (VERMA et al., 2023).

Leal (2023), descreveu que inflamassoma NLRP1 poderia estar envolvido com a suscetibilidade genica para gravidade da COVID-19, em termos de insuficiência respiratória e internação na UTI. Ele detectou uma associação significativa de NLRP1 variante (rs12150220) e COVID-19 grave (LEAL et al., 2023). Este SNP está localizado na região ligante entre o PYD amino-terminal e o domínio NACHT central, muito próximo da chamada região “*tripwire*”, que é o alvo de proteases virais (TSU et al., 2021b), incluindo o Coronavírus 3CL protease NSP5 (PLANÈS et al., 2022b). O efeito funcional conhecido diz respeito ao aumento da ativação do inflamassoma NLRP1 e da liberação de IL-1 β nas células mononucleares do sangue periférico (LEAL et al., 2023). Fundamentando o resultado do nosso estudo, onde observamos um aumento significativo na concentração de IL1 β em pacientes com COVID-19 com os genótipos AA e AT do rs12150220, quando comparados com pacientes convalescentes, e essa alteração se manteve nos períodos D30, D60 e D90.

Em nossos resultados foram observados também que nos pacientes com COVID-19 houve um aumento significativo de produção de IL1 β no SNP do NLRP1 rs35865013 com genótipo AG quando comparado com os convalescentes. Diferente do estudo de Alves (2021) que não encontrou diferença significativa quando relacionou os genótipos desse polimorfismo rs35865013 nos pacientes com leucemia linfoblástica aguda pediátrica (LLA) e indivíduos saudáveis (ALVES et al., 2021a).

O polimorfismo rs10754558 do gene NLRP3 é um SNP que está envolvido em uma maior estabilidade do mRNA e expressão mais estável do NLRP3 (SHEN et al., 2019). Já foi visto que mutações na região 3'-UTR, onde ele está localizado, podem alterar a atividade da via do inflamassoma (HITOMI et al., 2009). Observamos no nosso estudo que o genótipo GG do polimorfismo rs10754558 do gene NLRP3 apresentou dosagem da concentração de IL1 β aumentado no grupo de pacientes com COVID-19, porém não encontramos diferença estatística significantes nessa alteração.

Quando comparamos os genótipos CC, CG e GG do rs10754558 NLRP3 desses pacientes com COVID-19 e os pacientes convalescentes nos diferentes estágios da convalescência, verificamos que o CC está relacionado com um aumento significativo de produção de IL1 β nos pacientes com COVID-19. Esse resultado corrobora a outros trabalhos, onde a presença do alelo G deste mesmo polimorfismo foi associado a um papel protetivo contra a COVID-19 (NEIRA-GOULART et al., 2023), infecção pelo HIV (PONTILLO et al., 2012b), assim como este mesmo alelo G exibiu um efeito protetor na redução dos riscos de doenças autoimunes, principalmente em populações latino-americanas (WU; WU; LIANG, 2021).

Estudo recente de Goulart (2023) demonstrou que os polimorfismos genéticos do inflamassoma estão associados com o tempo de progressão para desfechos graves (uso de ventilação mecânica ou óbito), mostrando que os polimorfismos rs10754558 do gene NLRP3, rs6509365 do gene CARD8, rs1101996 do gene IFI16 e rs1143634 do gene *IL1 β* foram associados com a progressão mais lenta/rápida para o uso de suporte ventilatório mecânico (SVM) ou óbito (NEIRA-GOULART et al., 2023). Demonstrando a importância de estudar os polimorfismos genéticos dos inflamassomas e das citocinas na COVID-19.

Referente ao rs10802502 de NLRP3, não há evidências que o relacionem com o COVID-19, há um estudo sobre diabetes mellitus gestacional que envolve esse SNP, mas nenhuma relação foi encontrada (WANG et al., 2018b). Outro estudo realizado com esse polimorfismo verificou a influência dos polimorfismos no prognóstico clínico em pacientes com leucemia linfoblástica aguda, mas nenhum resultado relacionado ao rs10802502 foi encontrado (ALVES et al., 2021b). No presente estudo quando verificamos esse polimorfismo, e não encontramos resultados significantes comparando os alelos e genótipos do nosso grupo controle e pacientes convalescentes. Já nos pacientes com COVID-19 com o genótipo CT e TT do polimorfismo NLRP3 rs10802502, produziram mais citocinas IL1 β em comparação com os pacientes convalescentes, com resultado estatisticamente significativo.

No presente estudo foram observados resultados heterogêneos na associação das variantes genéticas de NLRP1 e NLRP3, como também, das variantes genéticas das citocinas IL1 β , IL6 e IL18, com a suscetibilidade e gravidade da COVID-19. Portanto, outros estudos com um maior número de indivíduos deverão ser desenvolvidos para entender estes eventos na COVID-19.

7. CONCLUSÃO

A patogênese relacionada à infecção pelo SARS-CoV-2 tem sido muito estudada nos últimos 4 anos, no entanto, o papel de cada componente proposto na resposta imune ao vírus ainda permanece pouco compreendido na COVID-19. Portanto, a partir dos objetivos propostos, dos resultados obtidos e das análises realizadas neste estudo, foi possível concluir:

- Foi possível observar diferenças estatísticas entre os genótipos e alelos do NLRP1 (rs35865013), NLRP3 (rs10754558), IL6 (rs1800795) e IL18 (rs1872384) dos grupos controle e convalescente, o que poderia ter alguma relação com a proteção/risco a infecção da COVID-19;
- Os genótipos AA e AG NLRP1 rs35865013 e o genótipo CG da IL18 dos pacientes com COVID-19 podem estar relacionados com proteção à doença. No entanto, o genótipo GG e GC da IL6 está relacionada com o risco dessa doença;
- As citocinas IL1 β e IL6 apresentou maior concentração sérica nos pacientes com COVID-19, e quando separados entre grupos Alta e Óbito, verificamos que os pacientes que vieram a Óbito apresentaram uma alta produção dessas citocinas. Sendo provável que este aumento significativo de IL1 β e IL6 levou ao desfecho final desses pacientes;
- Os pacientes com COVID-19 com genótipo AT NLRP1 rs12150220 apresentaram maior concentração de IL1 β quando comparados aos pacientes com genótipo TT. Sugerindo que os pacientes com genótipo AT liberam maior concentração de IL1 β , conseqüentemente, uma melhor resposta da imunidade inata contra a COVID-19;
- Na comparação dos genótipos AA/AT NLRP1 rs12150220, GG NLRP1 rs35865013, CT/TT NLRP3 rs10802502, CC NLRP3 rs10754558, CC IL1 β rs16944 e GG/GC IL6 rs1800795 dos pacientes com COVID-19 e os pacientes convalescentes nos períodos D30, D60 e D90, foi observado diferenças estatísticas na produção de IL1 β e IL6, onde os com COVID-19 apresentaram uma maior concentração nos diferentes genótipos;

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este foi o primeiro estudo que descreveu a frequência de SNPs nos genes inflamassomas NLRP1 e NLRP3 em pacientes com COVID-19 no Estado do Amazonas. Porém, estudos devem ser realizados a fim de melhor elucidar a influência desses SNPs nesta doença.

Sobretudo nosso trabalho ressalta a importância da análise de variações genéticas nos genes das citocinas IL1 β , IL6 e IL18, nos inflamassoma NLRP1 e NLRP3 como possíveis fatores de risco/proteção na evolução clínica da COVID-19.

REFERÊNCIAS

- ALKHATEEB, A.; JARUN, Y.; TASHTOUSH, R. Polymorphisms in NLRP1 gene and susceptibility to autoimmune thyroid disease. **Autoimmunity**, v. 46, n. 3, p. 215–221, 2013.
- ALLEN, I. C. et al. The NLRP3 Inflammasome Mediates In Vivo Innate Immunity to Influenza A Virus through Recognition of Viral RNA. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 556–565, abr. 2009.
- ALOSAIMI, B. et al. MERS-CoV infection is associated with downregulation of genes encoding Th1 and Th2 cytokines/chemokines and elevated inflammatory innate immune response in the lower respiratory tract. **Cytokine**, 2020.
- ALVES, F. S. et al. Genetic polymorphisms of inflammasome genes associated with pediatric acute lymphoblastic leukemia and clinical prognosis in the Brazilian Amazon. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021a.
- ALVES, F. S. et al. Genetic polymorphisms of inflammasome genes associated with pediatric acute lymphoblastic leukemia and clinical prognosis in the Brazilian Amazon. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2021b.
- AN, P. et al. Regulatory polymorphisms in the interleukin-18 promoter are associated with hepatitis C virus clearance. **Journal of Infectious Diseases**, 2008.
- AN, P. JIAO; ZHU, Y. Z.; YANG, L. PING. **Biochemical indicators of coronavirus disease 2019 exacerbation and the clinical implications. Pharmacological Research**, 2020a.
- AN, P. JIAO; ZHU, Y. Z.; YANG, L. PING. **Biochemical indicators of coronavirus disease 2019 exacerbation and the clinical implications. Pharmacological Research**, 2020b.
- ANDERSEN, K. G. et al. **The proximal origin of SARS-CoV-2. Nature Research**, 2020.
- BADAWI, S.; ALI, B. R. **ACE2 Nascence, trafficking, and SARS-CoV-2 pathogenesis: the saga continues. Human Genomics**, 2021.
- BALKHAIR, A. A. **Covid-19 pandemic: A new chapter in the history of infectious diseases. Oman Medical Journal**, 2020.
- BALZANELLI, M. G. et al. Analysis of Gene Single Nucleotide Polymorphisms in COVID-19 Disease Highlighting the Susceptibility and the Severity towards the Infection. **Diagnostics**, v. 12, n. 11, 2022.
- BAUERNFRIED, S. et al. Human NLRP1 is a sensor for double-stranded RNA. **Science**, 2021.
- BERGAMASCHI, L. et al. Longitudinal analysis reveals that delayed bystander CD8+ T cell activation and early immune pathology distinguish severe COVID-19 from mild disease. **Immunity**, v. 54, n. 6, 2021.

BLANCO-MELO, D. et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. **Cell**, 2020.

BOUROS, D. et al. The clinical significance of serum and bronchoalveolar lavage inflammatory cytokines in patients at risk for Acute Respiratory Distress Syndrome. **BMC Pulmonary Medicine**, 2004.

BRASIL. **COVID-19, Painel Coronavírus**. [s.l: s.n.].

BRASIL. **COVID-19, Painel Coronavírus**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>.

CASTAÑO-RODRIGUEZ, C. et al. Role of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Viroproins E, 3a, and 8a in Replication and Pathogenesis. **mBio**, v. 9, n. 3, jul. 2018.

CHANNAPPANAVAR, R. et al. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. **Cell Host and Microbe**, 2016.

CHEN, I.-Y. et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Viroporin 3a Activates the NLRP3 Inflammasome. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, jan. 2019.

CHEN, L. et al. Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2012.

CHEN, L. et al. Analysis of clinical features of 29 patients with 2019 novel coronavirus pneumonia. **Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases**, 2020.

CHI, Y. et al. Serum Cytokine and Chemokine Profile in Relation to the Severity of Coronavirus Disease 2019 in China. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 222, n. 5, p. 746–754, ago. 2020.

CRUZ, M. et al. The TGF-B1 and IL-10 gene polymorphisms are associated with risk of developing silent myocardial ischemia in the diabetic patients. **Immunology Letters**, 2013.

CUI, H.; ZHANG, L. Key Components of Inflammasome and Pyroptosis Pathways Are Deficient in Canines and Felines, Possibly Affecting Their Response to SARS-CoV-2 Infection. **Frontiers in Immunology**, 2021.

DA SILVA, G. A. V. et al. A polymorphism in the IL1B gene (rs16944 T/C) is associated with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania guyanensis* and plasma cytokine interleukin receptor antagonist. **Cytokine**, 2019.

DADMANESH, M.; MEHDI, M.; GHORBAN, K. Inflammasomes and their roles in the pathogenesis of viral hepatitis and their related complications: An updated systematic review. n. January, 2020.

DE IUDICIBUS, S. et al. Genetic Predictors of Glucocorticoid Response in Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Diseases. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 45, n. 1, p. e1–e7, 2011.

DE SÁ, N. B. R. et al. Inflammasome Genetic Variants Are Associated with Protection to Clinical Severity of COVID-19 among Patients from Rio de Janeiro, Brazil. **BioMed Research International**, v. 2022, 2022.

DE SOUZA, A. M. et al. A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population. **Genetics and Molecular Biology**, v. 42, n. 3, p. 495–508, 2019.

DINARELLO, C. A. **Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. Immunological Reviews**, 2018.

ENSEMBL.ORG. **A deep catalog of human genetic variation**. Disponível em: <<https://www.ensembl.org/index.html>>.

FANG, F. et al. Association between interleukin 1 receptor antagonist gene 86-bp VNTR polymorphism and sepsis: A meta-analysis. **Human Immunology**, 2015.

FENRICH, M. et al. SARS-CoV-2 Dissemination Through Peripheral Nerves Explains Multiple Organ Injury. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2020.

FREEMAN, T. L.; SWARTZ, T. H. **Targeting the NLRP3 Inflammasome in Severe COVID-19. Frontiers in Immunology**, 2020.

FRICKE-GALINDO, I.; FALFÁN-VALENCIA, R. **Genetics Insight for COVID-19 Susceptibility and Severity: A Review. Frontiers in Immunology**, 2021.

FU, B.; XU, X.; WEI, H. **Why tocilizumab could be an effective treatment for severe COVID-19? Journal of Translational Medicine**, 2020.

FU, Y.; CHENG, Y.; WU, Y. **Understanding SARS-CoV-2-Mediated Inflammatory Responses: From Mechanisms to Potential Therapeutic Tools. Virologica Sinica**, 2020.

FUNG, S. Y. et al. **A tug-of-war between severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and host antiviral defence: lessons from other pathogenic viruses. Emerging Microbes and Infections**, 2020a.

FUNG, S. Y. et al. **A tug-of-war between severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and host antiviral defence: lessons from other pathogenic viruses. Emerging Microbes and Infections**, 2020b.

FVS-AM, F. D. V. E. S. D. A. **Perfil clínico e demográfico dos casos de Covid-19 no estado do Amazonas: uma análise comparativa entre 2020 e 2024**. [s.l.: s.n.].

GABRIELLA, M.; ANNALISA, C. SARS-Cov-2 infection: Response of human immune system and possible implications for the rapid test and treatment. **International Immunopharmacology**, v. 84, n. March, p. 106519, 2020.

GANTER, M. T. et al. Interleukin-1 β causes acute lung injury via α v β 5 and α v β 6 integrin-dependent mechanisms. **Circulation Research**, 2008.

GASSE, P. et al. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. **Journal of Clinical Investigation**, 2007.

GONG, J. et al. Correlation analysis between disease severity and inflammation-related parameters in patients with COVID-19: a retrospective study. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, 2020.

GRANT, R. W.; DIXIT, V. D. Mechanisms of disease: inflammasome activation and the development of type 2 diabetes. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013.

HE, L. et al. Expression of elevated levels of pro-inflammatory cytokines in SARS-CoV-infected ACE2+ cells in SARS patients: Relation to the acute lung injury and pathogenesis of SARS. **Journal of Pathology**, 2006a.

HE, L. et al. Expression of elevated levels of pro-inflammatory cytokines in SARS-CoV-infected ACE2+ cells in SARS patients: Relation to the acute lung injury and pathogenesis of SARS. **Journal of Pathology**, 2006b.

HITOMI, Y. et al. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 4, 2009.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, 2020.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 15 fev. 2020.

IVASHKIV, L. B.; DONLIN, L. T. **Regulation of type i interferon responses**. **Nature Reviews Immunology**, jan. 2014.

JIN, Y. et al. NALP1 in Vitiligo-Associated Multiple Autoimmune Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 12, p. 1216–1225, 2007.

JIN, Y. et al. **Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of covid-19**. **Viruses**, 2020.

KEDDIE, S. et al. Laboratory biomarkers associated with COVID-19 severity and management. **Clinical Immunology**, v. 221, 2020.

KIM, J. S. et al. **Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19. Theranostics**, 2020a.

KIM, K. S. et al. Induction of interleukin-1 beta (IL-1 β) is a critical component of lung inflammation during influenza A (H1N1) virus infection. **Journal of Medical Virology**, 2015.

KIM, S. Y. et al. Characterization of heparin and severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike glycoprotein binding interactions. **Antiviral Research**, 2020b.

KOUHPAYEH, H. Clinical features predicting COVID-19 mortality risk. **European Journal of Translational Myology**, v. 32, n. 2, 2022.

LACHMANN, H. J. et al. In vivo regulation of interleukin 1 β in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 5, p. 1029–1036, 2009.

LAU, S. K. P. et al. Delayed induction of proinflammatory cytokines and suppression of innate antiviral response by the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus: Implications for pathogenesis and treatment. **Journal of General Virology**, 2013.

LEAL, V. N. C. et al. A common variant close to the “tripwire” linker region of NLRP1 contributes to severe COVID-19. **Inflammation Research**, v. 72, n. 10–11, 2023.

LI, G. et al. **Coronavirus infections and immune responses. Journal of Medical Virology** John Wiley and Sons Inc. 1 abr. 2020a.

LI, X. et al. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 19, n. xxxx, p. 1–7, 2020b.

LI, X. et al. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 19, n. xxxx, p. 1–7, 2020c.

LIAO, M. et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. **Nature Medicine**, 2020.

LÓPEZ-REYES, A. et al. NLRP3 Inflammasome: The Stormy Link Between Obesity and COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 11, out. 2020.

LUCAS, C. et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. v. 584, n. 7821, p. 463–469, 2021.

MAES, M. et al. In COVID-19, NLRP3 inflammasome genetic variants are associated with critical disease and these effects are partly mediated by the sickness symptom complex: a nomothetic network approach. **Molecular Psychiatry**, v. 27, n. 4, p. 1945–1955, abr. 2022a.

MAES, M. et al. In COVID-19, NLRP3 inflammasome genetic variants are associated with critical disease and these effects are partly mediated by the sickness symptom complex: a nomothetic network approach. **Molecular Psychiatry**, v. 27, n. 4, p. 1945–1955, abr. 2022b.

MAGITTA, N. F. et al. A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. **Genes and Immunity**, v. 10, n. 2, p. 120–124, 2009.

MANGALMURTI, N.; HUNTER, C. A. **Cytokine Storms: Understanding COVID-19. Immunity**, 2020.

MAO, L. et al. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients with Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. **JAMA Neurology**, 2020.

MARCHETTI, C. et al. Targeting of the NLRP3 Inflammasome for early COVID-19. **bioRxiv**, 2021.

MEDURI, G. U. et al. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS: Plasma IL-1 β and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. **Chest**, 1995.

MERAD, M.; MARTIN, J. C. **Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. Nature Reviews Immunology**, 2020.

MORAVEJ, A. et al. IL-1 β (-511T/C) gene polymorphism not IL-1 β (+3953T/C) and LT- α (+252A/G) gene variants confers susceptibility to visceral leishmaniasis. **Molecular Biology Reports**, 2012.

MUKHERJEE, S.; MAHATA, P. Computational investigation for endocytosis of CoVID-19 virus SARS-CoV-2 in cell membrane. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part C: Journal of Mechanical Engineering Science**, 2021.

NEIRA-GOULART, M. et al. Inflammasome genes polymorphisms are associated with progression to mechanical ventilation and death in a cohort of hospitalized COVID-19 patients in a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Gene**, v. 865, 2023.

NIETO-TORRES, J. L. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. **Virology**, v. 485, p. 330–339, nov. 2015.

NOGUEIRA, L. G. et al. Functional IL18 polymorphism and susceptibility to Chronic Chagas Disease. **Cytokine**, 2015.

NOVICK, D. et al. **Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. Seminars in Immunology**, 2013.

ORELLANA, J. D. Y. et al. Excess deaths during the COVID-19 pandemic: underreporting and regional inequalities in Brazil. **Cadernos de Saude Publica**, 2021.

OU, X. et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. **Nature Communications**, 2020.

PAN, P. et al. SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 4664, dez. 2021.

PAULES, C. I.; MARSTON, H. D.; FAUCI, A. S. **Coronavirus Infections-More Than Just the Common Cold. JAMA - Journal of the American Medical Association.** American Medical Association. 25 fev. 2020.

PEDERSEN, S. F.; HO, Y.-C. SARS-CoV-2: A Storm is Raging. **Journal of Clinical Investigation**, 2020.

PHELAN, A. L.; KATZ, R.; GOSTIN, L. O. **The Novel Coronavirus Originating in Wuhan, China: Challenges for Global Health Governance. JAMA - Journal of the American Medical Association**, 2020.

PICOS, A. et al. Interleukin-1A and interleukin-1B gene polymorphisms in gastroesophageal reflux disease. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 2020.

PLANÈS, R. et al. Human NLRP1 is a sensor of pathogenic coronavirus 3CL proteases in lung epithelial cells. **Molecular Cell**, p. 2385–2400, 2022a.

PLANÈS, R. et al. Human NLRP1 is a sensor of pathogenic coronavirus 3CL proteases in lung epithelial cells. **Molecular Cell**, v. 82, n. 13, 2022b.

PONTILLO, A. et al. The missense variation Q705K in CIAS1/NALP3/NLRP3 gene and an NLRP1 haplotype are associated with celiac disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 106, n. 3, p. 539–544, 2011.

PONTILLO, A. et al. Polimorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v. 45, n. 4, p. 271–278, 2012a.

PONTILLO, A. et al. Polymorphisms in inflammasome' genes and susceptibility to HIV-1 infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 59, n. 2, 2012b.

QIN, C. et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, 2020.

RANZANI, O. T. et al. Characterisation of the first 250 000 hospital admissions for COVID-19 in Brazil: a retrospective analysis of nationwide data. **The Lancet Respiratory Medicine**, 2021.

ROBINSON, K. S. et al. Enteroviral 3C protease activates the human NLRP1 inflammasome in airway epithelia. **Science**, 2020.

RODRIGUES, T. S. et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-cov-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. **Journal of Experimental Medicine**, 2020a.

RODRIGUES, T. S. et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-cov-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. **Journal of Experimental Medicine**, 2020b.

ROKNI, M. et al. Single nucleotide polymorphisms located in TNFA, IL1RN, IL6R, and IL6 genes are associated with COVID-19 risk and severity in an Iranian population. **Cell Biology International**, v. 46, n. 7, 2022.

ROTHER, C. et al. Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. **New England Journal of Medicine**, 2020.

SHARMA, M.; DE ALBA, E. Structure, activation and regulation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021.

SHEN, C. et al. Genetic association between the NLRP3 gene and acne vulgaris in a Chinese population. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 44, n. 2, 2019.

SHIRANI, K. et al. **A narrative review of COVID-19: The new pandemic disease. Iranian Journal of Medical Sciences**, 2020.

SONG, P. et al. **Cytokine storm induced by SARS-CoV-2. Clinica Chimica Acta**, 2020a.

SONG, P. et al. **Cytokine storm induced by SARS-CoV-2. Clinica Chimica Acta**, 2020b.

STRAFELLA, C. et al. Investigation of genetic variations of il6 and il6r as potential prognostic and pharmacogenetics biomarkers: Implications for covid-19 and neuroinflammatory disorders. **Life**, 2020.

SWANSON, K. V.; DENG, M.; TING, J. P. Y. **The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. Nature Reviews Immunology**, 2019.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. TRIzol Reagent User Guide. **User Guide**, 2016.

TSU, B. V. et al. Diverse viral proteases activate the nlrp1 inflammasome. **eLife**, v. 10, p. 1–76, 2021a.

TSU, B. V. et al. Diverse viral proteases activate the nlrp1 inflammasome. **eLife**, v. 10, 2021b.

VAN DEN BERG, D. F.; TE VELDE, A. A. **Severe COVID-19: NLRP3 Inflammasome Dysregulated. Frontiers in Immunology**, 2020.

VANAJA, S. K.; RATHINAM, V. A. K.; FITZGERALD, K. A. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 5, p. 308–315, maio 2015.

VELAVAN, T. P.; MEYER, C. G. The COVID-19 epidemic. **Tropical Medicine and International Health**, v. 25, n. 3, p. 278–280, 2020.

VERMA, S. et al. Genetic polymorphisms of IL6 gene –174G > C and –597G > A are associated with the risk of COVID-19 severity. **International Journal of Immunogenetics**, v. 50, n. 1, 2023.

VILLOUTREIX, B. O. et al. In silico investigation of the new UK (B.1.1.7) and South African (501y.v2) SARS-CoV-2 variants with a focus at the ace2–spike rbd interface. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021.

VIRALZONE. **SARS coronavirus 2 (SARS-CoV-2) proteome**.

WAN, S. et al. Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP). **medRxiv**, 2020.

WAN, Z. et al. NLRP3 inflammasome promotes diabetes-induced endothelial inflammation and atherosclerosis. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. Volume 12, p. 1931–1942, set. 2019.

WANG, D. et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, 2020a.

WANG, D. et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, 2020b.

WANG, F. et al. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. **The Journal of Infectious Diseases**, 2020c.

WANG, H. et al. **Association between the IL-6 gene polymorphism and tuberculosis risk: A meta-analysis. Infection and Drug Resistance**, 2017.

WANG, L. et al. Association between IL1B gene and cervical cancer susceptibility in Chinese Uygur Population: A Case–Control study. **Molecular Genetics and Genomic Medicine**, 2019.

WANG, W. et al. Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1 β secretion. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 106, dez. 2018a.

WANG, X. et al. Micro-ribonucleic acid-binding site variants of type 2 diabetes candidate loci predispose to gestational diabetes mellitus in Chinese Han women. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 9, n. 5, p. 1196–1202, set. 2018b.

WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard Global Situation. **WHO**, 2022.

WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard Global Situation. **WHO**, 2024.

WILDE, A. H. et al. Host factors in coronavirus replication. Em: **Current Topics in Microbiology and Immunology**. [s.l: s.n.].

WILSON, L. et al. SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. **Virology**, v. 330, n. 1, p. 322–331, dez. 2004.

WU, C. et al. Risk Factors Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients with Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA Internal Medicine**, v. 180, n. 7, 2020.

WU, Z.; WU, S.; LIANG, T. **Association of NLRP3 rs35829419 and rs10754558 Polymorphisms With Risks of Autoimmune Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis**. **Frontiers in Genetics**, 2021.

XAVIER, A. R. et al. COVID-19: manifestações clínicas e laboratoriais na infecção pelo novo coronavírus COVID-19: clinical and laboratory manifestations in novel coronavirus infection. **J Bras Patol Med Lab**, 2020.

YAP, J. K. Y.; MORIYAMA, M.; IWASAKI, A. Inflammasomes and Pyroptosis as Therapeutic Targets for COVID-19. **The Journal of Immunology**, 2020.

YESUDHAS, D.; SRIVASTAVA, A.; GROMIHA, M. M. **COVID-19 outbreak: history, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics**. **Infection**, 2021.

YU, C. H. et al. **Mechanisms of NLRP1-Mediated Autoinflammatory Disease in Humans and Mice**. **Journal of Molecular Biology**, 2018.

ZHANG, J. JIN et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2020a.

ZHANG, J. JIN et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2020b.

ZHANG, Q.; FRIEDMAN, P. A. **Receptor-loaded virion endangers gpcr signaling: Mechanistic exploration of sars-cov-2 infections and pharmacological implications**. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021.

ZHANG, Y.-Z. **Novel 2019 coronavirus genome** Shanghai Public Health Clinical Center & School of Public Health. [s.l: s.n.].

- ZHENG, D.; LIWINSKI, T.; ELINAV, E. **Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms.** *Cell Discovery*, 2020.
- ZHENG, Y. et al. Zika virus elicits inflammation to evade antiviral response by cleaving cGAS via NS1-caspase-1 axis. **The EMBO Journal**, v. 37, n. 18, set. 2018.
- ZHENG, Z. et al. **Risk factors of critical & mortal COVID-19 cases: A systematic literature review and meta-analysis.** *Journal of Infection*, 2020.
- ZHOU, D. et al. The NLRP3 rs10754558 Polymorphism Is Associated with the Occurrence and Prognosis of Coronary Artery Disease in the Chinese Han Population. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–9, 2016.
- ZHOU, F. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The Lancet**, 2020a.
- ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, 2020b.
- ZHU, H. et al. Clinical analysis of 10 neonates born to mothers with 2019-nCoV pneumonia. **Translational Pediatrics**, 2020.
- ZHU, L. et al. Associations between Polymorphisms in the IL-1 Gene and the Risk of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Evidence from a Meta-Analysis. **International Archives of Allergy and Immunology**, 2021.

ANEXOS

Anexo 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA -CEP-HEMOAM (CAAE: 30975020.9.0000.0009).

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de Biomarcadores Imunológicos em pacientes Convalescentes da infecção pelo Vírus SARS-CoV-2 (COVID-19).

Pesquisador: Adriana Malheiro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30975020.9.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.126.784

Apresentação do Projeto:

Este estudo será composto por três grupos. O grupo 1, pacientes convalescentes candidatos à doação de plasma, o G2 doadores de sangue saudáveis (grupo controle) e G3 pacientes internados em enfermaria ou UTI dos hospitais que atendem pacientes com Covid-19 e que aceitarem participar da pesquisa.

Os pacientes convalescentes serão incluídos por demanda espontânea à medida que forem recrutados pelo Hemoam para doação de plasma convalescente. Estima-se estudar 200 pacientes. O Hemoam, através da Secretaria de Saúde e da Fundação de Vigilância em Saúde, terá acesso à lista de pacientes convalescentes, de acordo com o projeto “ aprovado pelo CEP”. Estes candidatos à doação de plasma serão contactados pelo serviço social do Hemoam. Pacientes que voluntariamente procurarem a equipe do projeto ou o Hemoam também poderão ser incluídos no projeto. Para o grupo controle também serão inseridos 200 doadores de sangue saudável, que serão abordados pela equipe do projeto no momento da doação. Para o G3, serão incluídos pacientes internados em enfermarias ou UTIs de Covid-19, do HUGV que anuiu sua participação ao projeto. Estes pacientes serão contactados pela equipe de enfermagem/residentes/equipe médica (médica responsável Dra Alena Mileo), do hospital para aplicação do TCLE, para o paciente ou seus familiares. Estimamos estudar neste grupo 200 pacientes, que serão incluídos por demanda espontânea, no período de julho a dezembro de 2020.

O presente projeto visa avaliar o perfil de resposta imune na infecção pelo SARS-COVI-2,

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)

Bairro: Chapada

CEP: 69.050-002

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-0114

Fax: (92)3655-0112

E-mail: cephemoam@gmail.com

Continuação do Parecer: 4.126.784

considerando principalmente fatores que estejam relacionados à cura. No entanto, como uma parte dos pacientes evoluem para sintomas de moderado à grave, torna-se interessante traçar um perfil de possíveis fatores imunológicos envolvidos neste quadro, de forma comparativa com os pacientes com sintomas leves, que se curaram no período de 30 dias. Para tanto, neste estudo propomos coletar amostras de pacientes graves, internados em hospitais de referência no tratamento da Covid-19. Este grupo, tratado como grupo 3, terá um papel de controle positivo da infecção ou do desenvolvimento da doença e será estudado comparativamente aos demais grupos propostos (G1 e G2). Portanto, este G3 será composto por pacientes internados em enfermarias ou UTIs dos hospitais que aderirem ao projeto. A coleta de material destes pacientes será feita pela equipe de enfermagem do hospital, previamente autorizado pelo paciente ou sua família, pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Para estes pacientes será feito um corte transversal, ou seja, a coleta será feita uma única vez, durante o período de internação.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral. Descrever potenciais biomarcadores imunológicos e inflamatórios em Doadores de Plasma Convalescentes da infecção pelo Vírus SARS-CoV-2 (COVID-19) e associar com a cura e produção de anticorpos nestes indivíduos, assim como comparar estes dados com pacientes graves e indivíduos controles saudáveis.

Objetivos específicos:

1. Analisar a produção de citocinas no soro dos pacientes convalescentes 30, 60 e 90 dias após a infecção e em indivíduos dos grupos (G2) e (G3).
2. Determinar, por espectrometria de massas de alta resolução (LC-MS/MS), o perfil de produção de eicosanoides, esfingolipídios/ ceramidas e seus derivados metabólitos ativos em plasma de indivíduos convalescentes de SARS-COV2 30, 60 e 90 dias após a infecção e em indivíduos dos grupos (G2) e (G3).
3. Descrever polimorfismos da IL-6 e inflamassomas nesta população e em indivíduos e em indivíduos dos grupos (G2) e (G3)
4. Analisar a produção da molécula HLA-G em indivíduos convalescentes de SARS-CoV-2 e em indivíduos dos grupos (G2) e (G3).
5. Analisar a produção de marcadores envolvidos na coagulação, D-dímero e anticorpos anti-fosfolipídeos nos três grupos.
6. Associar os perfis de resposta imunológica e inflamatória com os títulos de anticorpos

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cephemoam@gmail.com

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.126.784

presentes nos pacientes convalescentes nos diferentes tempos estudados e em indivíduos dos grupos (G2) e (G3).

7. Relacionar as variáveis sócio-demográficas, clínicas, antropométricas, comportamentais e de risco com os parâmetros imunológicos, bioquímicos e metabólicos analisados, através da análise de dados obtidos no momento da consulta no HEMOAM e nos hospitais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Critérios de inclusão dos doadores de plasma convalescentes:

Os critérios de inclusão para a triagem de potenciais doadores de PC apresentam as seguintes diretrizes:

- a) Indivíduos com resultado de RT PCR positivo para SARS-Cov-2;
- b) Assintomático há pelo menos 14 dias;
- c) Sexo masculino ou feminino;
- d) Idade entre 18 e 60 anos;
- e) Qualquer raça ou cor;
- f) Que durante a infecção por Covid-19, apresentaram comprometimento clínico com internação ou não;
- g) Que esteja apto nas triagens clínica, hematológica, sorológica e molecular conforme portaria de consolidação 5 do Ministério da Saúde de 2017;
- h) Que não utilizem medicamentos inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA);
- i) Que possua anticorpos ou não anticorpos específicos anti-SARS-Cov-2 detectáveis;
- j) Que esteja com teste RT-PCR para SARS -Cov-2 de controle negativo;
- k) Não apresente anticorpos anti-eritrocitários;
- l) De qualquer grupo ABO.

Critérios de exclusão dos doadores de plasma convalescentes:

- a) Candidatos com doença sintomática no momento de sua inclusão no estudo;
- b) Que ainda apresentem teste RT PCR para SARS-Cov-2 positivo;
- c) Doadores que não estejam aptos em alguma das triagens: clínica ou hematológica ou sorológica ou molecular conforme portaria de

Critérios de inclusão de pacientes internados com Covid-19

Serão incluídos indivíduos doentes, do sexo masculino ou feminino, com infecção confirmada por SARS-COV2, por diagnóstico molecular, com COVID-19 estabelecida, em qualquer faixa etária, atendidos no HUGV, em tratamento da Covid-19.

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cephemoam@gmail.com

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.126.784

Critérios de exclusão de pacientes internados com Covid-19 (G3):

Para os pacientes atendidos no HUGV, o critério de exclusão será o resultado negativo para o diagnóstico molecular pelo SARS-COV-2.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Em parecer anterior emitido por este colegiado, foram elencadas adequações a serem realizadas pelo pesquisador responsável. Seguem descritas abaixo as alterações em atendimento à nossa solicitação e que constam na "Carta Resposta" enviada ao CEP/HEMOAM:

1. Quanto ao comentário sobre o título do projeto e a referência sobre o G3 (pacientes internados).

R. Acrescentamos mais dados no projeto em relação a este grupo. Não alteramos o título do projeto, uma vez que os pacientes centrais da pesquisa são os convalescentes, ou seja, estudar o paciente que cura, nos fará entender e possivelmente identificar um biomarcador de resposta imune relacionado à cura e a memória imunológica, enquanto o paciente grave, nos trará uma possível comparação com para auxiliar na identificação deste biomarcador. O G3, comporá um grupo controle positivo para Covid-19.

Pendências encontradas no projeto:

1. Do TCLE

- a) Foi apresentado 2 outros TCLEs que estavam faltando ao projeto.
- b) Os TCLEs foram adequados as normas da Resolução 466/2012, quanto a confidencialidade.
- c) Os TCLEs foram adequados a coleta de sangue e ressarcimento de despesas.

2. Casuística e Métodos:

Para este questionamento, foi adicionado um item no projeto, que descreve que os pacientes serão recrutados pelo Serviço Social do HEMOAM, as amostras serão coletadas pela equipe da aférese e a equipe do projeto irá posteriormente retirar os tubos de sangue a que competem ao projeto e levados para o laboratório de genômica. Nas coletas de 60 e 90 dias após os sintomas. O serviço socila do Hemoam também fará o agendamento e as amostras serão coletadas pelo LAC, juntamente com a equipe do projeto. Para o grupo 3 (G3), as amostras serão coletadas pela equipe do HUGV e transportadas para o Labgen pela equipe do projeto. O LAC do HUGV se comprometeu

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cephemoam@gmail.com

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.126.784

a tal procedimento e o mesmo foi autorizado pelo Hospital.

3. Objetivo: Foram acrescentados os grupos G2 e G3.

4. Devido a grande dificuldade de se estudar pacientes receptores de plasma, optamos por substituir este grupo, pelo grupo apenas de pacientes graves internados na enfermaria ou UTI do HUGV, como efeito de grupo controle positivo, como descrito no projeto. Desta forma, neste projeto NÃO estudaremos os pacientes receptores de plasma.

Quanto a pergunta: Que garantia o pesquisador terá da adesão dos hospitais ao projeto?

Ressaltamos, como descrito na questão 4, que alteramos grupo estudado e para o G3, apresentamos a carta de anuência do HUGV e dos pesquisadores daquela instituição envolvidos na equipe do projeto.

5. Folha de rosto: Apresentado a assinada

6. Anuências: Apresentado a anuência de todos os pesquisadores (arquivo único)

7. Anuências das instituições: Apresentadas do HEMOAM, UFAM e HUGV. (arquivo único)

8. Orçamento: Apresentado:

9. Acrescentado os critérios de inclusão e exclusão de todos os grupos estudados.

10. Apresentado anuência do HUGV. (arquivo único)

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória relacionados na Resolução do CNS 466/12 foram apresentados e estão de acordo com legislação vigente.

Recomendações:

Vide conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cephemiam@gmail.com

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.126.784

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências relacionadas em parecer anterior foram sanadas em atendimento à legislação ética vigente, não existindo, portanto, motivos que impeçam o início da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1544735.pdf	25/06/2020 17:27:03		Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	25/06/2020 17:19:40	Adriana Malheiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Fichadeavaliacao.doc	25/06/2020 17:12:21	Adriana Malheiro	Aceito
Outros	carta_resposta.docx	25/06/2020 17:07:33	Adriana Malheiro	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_pesquisadores.pdf	25/06/2020 17:02:24	Adriana Malheiro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracoes_instituicoes.pdf	25/06/2020 16:57:25	Adriana Malheiro	Aceito
Brochura Pesquisa	brochurapesquisa.doc	25/06/2020 16:46:09	Adriana Malheiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	23/04/2020 21:06:33	Adriana Malheiro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_COVID_HEMOAM.pdf	23/04/2020 20:55:47	Adriana Malheiro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cephemoam@gmail.com

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.126.784

MANAUS, 01 de Julho de 2020

Assinado por:
Allyson Guimarães da Costa
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cephemoam@gmail.com

Página 07 de 07

Anexo 2: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA -CEP-HEMOAM (CAAE:49652815.8.0000.0009).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE PEPÍTIdeos MIMÉTICOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES HCV+ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA IN VITRO

Pesquisador: ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49652815.8.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.406.965

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE PEPÍTIdeos MIMÉTICOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES HCV+ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA IN VITRO

Trata-se de um estudo descritivo, transversal constituindo subprojeto de um estudo maior da linha de pesquisa sobre Biotecnologia & Saúde

intitulado: "Desenvolvimento de tecnologias aplicadas ao diagnóstico e terapia de doenças infecciosas tropicais", que será desenvolvido pelos grupos de Pesquisa "Virologia" da Universidade Federal do Pará – UFPA, em parceria com os grupos "Imunologia Básica e Aplicada" da

Universidade Federal do Amazonas e "Nanotecnologia" da Universidade Federal de Uberlândia- UFU. Ainda teremos apoio das Universidade da

Califórnia (UCDAVIS) e da Universidade de Miami(UM). Aprovado pelo Edital Pró-Amazônia n. 047/2012,

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Determinar a reatividade em soro de indivíduos HCV+ para peptídeos miméticos ao HCV identificados pela técnica phage display e caracterizar o

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 B.D Dir Ens Pesq			
Bairro: Chapéada		CEP: 69.050-002	
UF: AM	Município: MANAUS		
Telefone: (92)3655-0114	Fax: (92)3655-0112	E-mail: cep@hemoam.am.gov.br	

Continuação do Parecer: 1.408.965

perfil de citocinas envolvidas no desenvolvimento de fibrose hepática em cultura de células

Objetivo Secundário:

- Selecionar e identificar peptídeos miméticos reativos a soros de pacientes HCV+ com fibrose hepática;
- Sequenciar os clones isolados e realizar análises de bioinformática;
- Descrever o perfil de citocinas envolvidos no desenvolvimento da fibrose em cultura de células mesenquimais e hepatócitos;
- Pré-validar os clones selecionados através de ensaios de Phage-ELISA utilizando proteínas totais de pacientes com fibrose hepática;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco de contaminação dos colaboradores da pesquisa com sangue contaminado com o vírus da Hepatite C

Benefícios: Conseguir desenvolver peptídeos que possam ser utilizados posteriormente em biossensores capazes de detectar proteínas presente em soro de

pacientes que possam prever e servir de biomarcadores para diagnóstico de fibrose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa Relevante que busca detectar marcadores que auxiliem na detecção de peptídeos miméticos ao vírus da hepatite C capazes de prever fibrose utilizando tecnologias combinadas em engenharia genética, como Phage Display com o intuito de gerar estratégias direcionadas para a investigação do processo do desenvolvimento da fibrose.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P	09/09/2015	-	Aceito

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

Continuação do Parecer: 1.408.965

perfil de citocinas envolvidas no desenvolvimento de fibrose hepática em cultura de células

Objetivo Secundário:

- Selecionar e identificar peptídeos miméticos reativos a soros de pacientes HCV+ com fibrose hepática;
- Sequenciar os clones isolados e realizar análises de bioinformática;
- Descrever o perfil de citocinas envolvidos no desenvolvimento da fibrose em cultura de células mesenquimais e hepatócitos;
- Pré-validar os clones selecionados através de ensaios de Phage-ELISA utilizando proteínas totais de pacientes com fibrose hepática;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco de contaminação dos colaboradores da pesquisa com sangue contaminado com o vírus da Hepatite C

Benefícios: Conseguir desenvolver peptídeos que possam ser utilizados posteriormente em biossensores capazes de detectar proteínas presente em soro de

pacientes que possam prever e servir de biomarcadores para diagnóstico de fibrose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa Relevante que busca detectar marcadores que auxiliem na detecção de peptídeos miméticos ao vírus da hepatite C capazes de prever fibrose utilizando tecnologias combinadas em engenharia genética, como Phage Display com o intuito de gerar estratégias direcionadas para a investigação do processo do desenvolvimento da fibrose.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P	09/09/2015		Aceito

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq
 Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.408.965

Básicas do Projeto	ETO_579290.pdf	15:35:04		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/09/2015 15:32:42	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/09/2015 15:30:02	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	09/09/2015 15:26:05	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.pdf	09/09/2015 15:21:14	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.docx	09/09/2015 14:46:19	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 12 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Elisa Brosina de Leon
(Coordenador)

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

Anexo 3: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA -CEP-HEMOAM (CAAE:0024.0.112.000-10).



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
CAAE- 0024.0.112.000-10 - VERSÃO 002/10**

IDENTIFICAÇÃO	
Título:	Avaliação do perfil celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na cidade de Manaus.
Instituição:	Fundação HEMOAM
Pesquisador:	Laura Patricia Viana Maia
Data da Reapresentação:	06.10.2010

OBJETIVOS	
Geral:	Avaliar o perfil celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na cidade de Manaus.
Específico:	Avaliar a soroprevalência de doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B, através dos marcadores HBsAg e/ou anti-HBc; Analisar o perfil celular dos linfócitos T CD3+/CD4+ e CD3+/CD8+; Analisar a sub-população de leucócitos ativadas através do marcador CD69+ (linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos); Analisar a sub-população linfócitos T reguladores através do marcador CD25+; Avaliar o perfil de citocinas TH1 (IL-12 e IFN- γ); citocinas Th2 (IL-4); citocina supressora (IL-10) e citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8 e TNF - α); f - Caracterizar os genótipos virais na população de doadores e correlacionar com a resposta imune encontrada.

SUMÁRIO DO PROJETO	
Metodologia:	Trata-se de um estudo observacional descritivo do tipo não-probabilístico que será realizado com doadores de sangue com sorologia positiva para HBsAg e/ou anti-HBc no período de novembro de 2010 a abril de 2011, com uma amostra de 123 doações reativas.
Caracterização da Amostra:	Trata-se de um estudo observacional descritivo do tipo não-probabilística que será realizado com todos os doadores de sangue com sorologia positiva para HBsAg e/ou anti-HBc do vírus da hepatite B no período de setembro de 2010 a setembro de 2011, totalizando 1.396 doadores (valor estimado).
Crítérios de Inclusão	Doadores de sangue com sorologia positiva para HBsAg e/ou anti-HBc, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos e os que apresentarem

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS – HEMOAM
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
AV. CONSTANTINO NERY, 4397 – CHAPADA – CEP 69050-002 – MANAUS/AMAZONAS
FONE (92) 3655-0113 FAX (92) 3655-0112
E-mail: cep_hemoam@hotmail.com



	co-infecção (sífilis, doença de chagas, HCV, HIV e HTLV).
Critérios de Exclusão	Doadores que apresentarem resultados negativos para ambos os marcadores da hepatite B na segunda amostra de sangue.

COMENTÁRIOS DO CEP FRENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E RESOLUÇÕES COMPLEMENTARES

Na análise do protocolo observou-se que os autores responderam aos questionamentos descritos no parecer anterior.

PARECER DO CEP

Projeto Aprovado. Conforme determinado pela resolução CNS 196/96 os pesquisadores deverão apresentar a este CEP relatórios parcial e/ou final, ficando determinado desde então, o prazo para apresentação de relatório: 27/04/2011. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem se apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. O termo de Consentimento deverá ser aplicado em duas vias sendo que uma delas ficará com o sujeito da pesquisa.

SITUAÇÃO	DATA DO PARECER
APROVADO	26.10.2010