

AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO (rs3775291) C>T DO GENE *TLR3* EM PACIENTES COM COVID-19

Mariana Akemi Sonoda Shiga (PIBIC/CNPq/UEM), Matheus Braga (Coorientador), Joana Maira Valentini Zacarias, Sérgio Grava, Andrea Name Colado Simão, Jeane Eliete Laguila Visentainer (Orientador),

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas, Imunologia, Imunogenética

Palavras-chave: TLR3; polimorfismo genético; COVID-19.

RESUMO

Uma nova doença surgiu em dezembro de 2019 em Wuhan, na China, causada pelo vírus SARS-CoV-2, a COVID-19. O receptor de tipo *Toll-like receptor* (TLR), o qual reconhece RNA de fita dupla, foi relatado no desencadeamento da resposta imunológica contra o coronavírus. Das mutações no gene *TLR3*, uma mutação não sinônima no éxon 4 (rs3775291) C>T, a qual leva a uma troca de Leucina por Fenilalanina na proteína, demonstrou prejudicar a expressão de TLR3 e influenciar a cascata de sinalização subsequente. Variações em genes da resposta imune podem influenciar o desenvolvimento de diversas patologias. Assim, esse estudo objetiva investigar uma possível associação do SNP rs3775291 no gene *TLR3* com a gravidade da COVID-19, em uma população do Sul do Brasil. Foi realizado um estudo caso-controle, com pacientes leves e graves diagnosticados com COVID-19 pelo Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina e Hospital Paraná, Paraná/Brasil, no período de março de 2020 a abril de 2021. No total, 100 pacientes foram selecionados para o estudo, 50 com a forma leve da doença e 50 com a forma grave. Não houve associação entre polimorfismos de *TLR3* com gravidade e evolução da doença em pacientes moderados/graves para genótipos e alelos. Podemos concluir, que os SNPs rs3775291 no gene *TLR3* não foram fatores contribuintes para a gravidade da COVID-19 independente de sexo, idade, hipertensão e diabetes nesta população brasileira.

INTRODUÇÃO

A nova doença do coronavírus (COVID-19) surgiu em dezembro de 2019 em Wuhan, na China, e o vírus foi oficialmente chamado de SARS-CoV-2. Os sintomas causados, na maioria dos casos, variam de leves a moderados. Inicialmente, os infectados apresentam febre, tosse seca, dor de cabeça, mialgia e outros sintomas comuns em síndromes respiratórias, no entanto, em alguns casos o quadro clínico

pode evoluir para grave, e o paciente pode apresentar pneumonia grave, síndrome do desconforto respiratório agudo e falência de órgãos (HU *et al.*, 2020).

O TLR3, o qual reconhece RNA de fita dupla, tem sido relatado no envolvimento do desencadeamento da resposta imunológica contra coronavírus. Em modelos de camundongos, níveis crescentes de transcrição de TLR3 após infecções por coronavírus foram relatados já no 2º dia pós-infecção (TOTURA *et al.*, 2015). Das várias mutações no gene *TLR3*, uma mutação não sinônima no éxon 4 (*rs3775291*) C>T a qual leva uma troca de uma Leucina por uma Fenilalanina na proteína demonstrou prejudicar a expressão de TLR3 e influenciar a cascata de sinalização subsequente (RANJITH-KUMAR *et al.*, 2007). Dessa maneira, este estudo objetiva avaliar uma possível associação do polimorfismo (*rs3775291*) C>T do gene *TLR3* com a gravidade da COVID-19.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes e Controles

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

Coleta das Amostras e Extração de DNA

Amostras de sangue total foram coletadas em tubos contendo anticoagulante EDTA no momento de internamento do paciente e encaminhadas ao Laboratório de Imunogenética da UEM (LIG-UEM). O DNA genômico foi extraído de células do sangue total com o Kit de extração DNA BIOPUR® (Biometrix, Curitiba, Paraná, Brasil), de acordo com o fabricante, e a concentração do material obtido foi avaliada por densidade óptica em equipamento Nanodrop 2000® (Wilmington, USA).

Genotipagem do SNP (*rs3775291*) C>T do gene *TLR3*

A genotipagem de variantes do gene foi realizada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) utilizando o ensaio TaqMan SNP Genotyping C___1731425_10 (Thermofisher®, Chicago, Estados Unidos).

Análise Estatística

A discriminação alélica foi realizada por meio do *software* que classifica as amostras em homozigotas para o alelo normal, homozigotas para o alelo mutado e heterozigotas. Para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg, assim como a associação entre o polimorfismo genético e a COVID-19, foi utilizado o *software* SNPStats (<https://www.snptest.net/start.htm?>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as características dos pacientes associadas à gravidade do COVID-19 neste estudo estão presentes na **Tabela 1**. Observou-se que houve diferença entre sexo e a comorbidade diabetes entre pacientes leves e graves, enquanto as comorbidades como hipertensão e obesidade não demonstraram diferenças estatísticas dentre os casos leves e graves de pacientes acometidos pela COVID-19. Houve diferença entre a média de idade entre pacientes leves e graves, motivo pelo qual essa variável foi incluída na análise de regressão linear.

Tabela 1. Características de pacientes leves e graves com COVID-19.

CARACTERÍSTICAS	LEVES N = 50	GRAVES N = 50	p valor
SEXO (F/M)	32 / 18	20 / 30	$p < 0,05^b$
IDADE	49,74 ± 15,84 ^a	61,68 ± 17,03 ^a	$p < 0,05^c$
COMORBIDADES			
HIPERTENSÃO	9	16	$p > 0,05^b$
DIABETES	3	11	$p < 0,05^b$
OBESIDADE	14	18	$p > 0,05^b$

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

As distribuições de frequência dos genótipos e alelos de *TLR3* estavam de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). Não houve associação entre os polimorfismos de *TLR3* e gravidade da doença com genótipo e alelo, conforme a **Tabela 2**.

Tabela 2. Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo (*rs3775291*) C>T no gene *TLR3* de acordo com a gravidade dos casos de COVID-19.

SNP	LEVES N = 50	GRAVES N = 50	OR (95% IC)	p valor
<i>rs3775291</i> C>T	n (f)	n (f)		
C/C	20 (0,40)	21 (0,42)	1,00	0,82 ^a
C/T	25 (0,50)	24 (0,48)	1,03 (0,39 - 2,74)	
T/T	5 (0,10)	5 (0,10)	1,60 (0,35 - 7,25)	
Alelos				
C	65 (0,65)	66 (0,66)	1,00	$p > 0,99^b$
T	35 (0,35)	34 (0,34)	0,95 (0,53 - 1,71)	

Abreviaturas: N, tamanho da população; n, número de indivíduos com o alelo ou genótipo; OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; SNP, polimorfismo de nucleotídeo único; a - A análise estatística foi realizada pelo *software* SNPStats com base em um modelo estatístico Codominante. b - A análise estatística foi realizada pelo OpenEpi tabela dois por dois.

Nossos resultados demonstraram que não houve associação entre o polimorfismo *rs3775291* com os quadros leves e graves de pacientes com COVID-19. Um estudo em escala populacional mostrou associação entre o alelo T e o risco de mortalidade em pacientes com COVID-19 (DHANGADAMAJHI, 2021), porém esses dados foram contestados em carta ao editor onde mostraram a não associação (PATI *et al.*, 2021). No entanto, até onde se tem conhecimento, nenhum estudo de caso controle avaliando uma possível associação entre essa variação e a gravidade da COVID-19 foi realizado. Embora não tenhamos encontrado uma associação entre o polimorfismo *rs3775291* com a gravidade da COVID-19, para comprovarmos esses resultados, um número maior de pacientes devem ser genotipados.

CONCLUSÃO

O polimorfismo (*rs3775291*) do gene *TLR3* não foi associado com a gravidade da COVID-19 entre os pacientes diagnosticados com quadros leves e graves, uma vez que não houve uma diferença genotípica e alélica significativa para os diferentes quadros da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

DHANGADAMAJHI, Gunanidhi; ROUT, Ronnaly . Association of TLR3 functional variant (*rs3775291*) with COVID-19 susceptibility and death: a population-scale study. **Springer Nature**, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7897730/>.

HU, Ben *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7>.

PATI, Abhijit *et al.* TLR3 (*rs3775291*) variant is not associated with SARS-CoV-2 infection and related mortality: a population-based correlation analysis. **Springer Nature**, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8039498/>.

RANJITH-KUMAR, C. T. *et al.* Effects of single nucleotide polymorphisms on toll-like receptor 3 activity and expression in cultured cells. **Journal of Biological Chemistry**, 2007. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)69074-3/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)69074-3/fulltext).

TOTURA, Allison L *et al.* Toll-Like Receptor 3 Signaling via TRIF Contributes to a Protective Innate Immune Response to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. **MBio**, 2015. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.00638-15?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed.