

INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO *rs5743836* DO *TLR9* NO DESFECHO DA INFECÇÃO POR SARS-COV-2

Caroline Tavares Moreno (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Matheus Braga (Coorientador), Sérgio Grava, Jeane Eliete Laguila Visentainer, Larissa Danielle Bahls Pinto (Orientador). Email: ldbpinto2@uem.br

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

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

Palavras-chave: TLR9; polimorfismo genético; COVID-19.

RESUMO

A infecção por SARS-CoV-2 (do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome-related coronavirus 2*) pode se manifestar de forma distinta em diferentes indivíduos. O sistema imune desempenha um papel essencial no controle e eliminação da infecção viral, seja por ação da imunidade inata ou adaptativa. Neste contexto, o receptor de reconhecimento de padrões, conhecido como TLR9 (*Toll-like receptor 9*), presente em células imunes inatas e células epiteliais, pode participar tanto da fase de combate ao vírus, quanto da fase inflamatória da doença. Assim, foi realizado um estudo caso-controle com o objetivo de genotipar o polimorfismo *rs5743836* no gene *TLR9* em 80 pacientes diagnosticados com COVID-19, internados nos Hospitais Universitários de Maringá e de Londrina, sendo 40 casos graves e 40 casos leves, através da técnica de PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction Sequence-Specific Primer*). Nossos resultados mostraram que houve associação de proteção do alelo C com a gravidade da doença. Podemos concluir que o polimorfismo *rs5743836* do gene *TLR9* está associado com a gravidade da doença.

INTRODUÇÃO

A infecção por SARS-CoV-2 apresenta um amplo espectro de possibilidades de evolução clínica, desde casos assintomáticos até o desenvolvimento de uma síndrome respiratória aguda grave e morte em alguns casos (OMS, 2022). Apesar de alguns fatores de risco para o desenvolvimento das formas graves de COVID-19 já estarem bem estabelecidos, a ocorrência de quadros clínicos mais severos em pacientes jovens e sem comorbidades evidencia a influência de fatores intrínsecos ao hospedeiro na progressão da doença, tais como fatores imunogenéticos (GAO, Y-D. et al., 2020). O sistema imune desempenha um papel essencial no controle e eliminação da infecção viral, seja por ação da imunidade inata ou da imunidade adaptativa. No entanto, uma resposta inflamatória descontrolada, conhecida como

“tempestade de citocinas”, leva a complicações associadas ao pior prognóstico da doença.

O receptor de reconhecimento de padrões, conhecido como TLR9, presente em células imunes inatas e células epiteliais, pode participar tanto da fase de combate ao vírus, quanto da fase inflamatória da doença. O engajamento do TLR9 ao seu ligante, induz uma série de reações bioquímicas intracelulares que culminam na ativação de fatores de transcrição relacionados a expressão de moléculas, como interferons (IFN) do tipo I, que promovem o estado antiviral e conduzem à ativação de células NK e de células T CD4⁺ e CD8⁺, bem como ao recrutamento de linfócitos Th1 (HALL, S. C. et al., 2016). Uma maior frequência do alelo C do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) *rs5743836* (-1237T>C) foi associada a várias doenças autoimunes e inflamatórias crônicas (CARVALHO, A. et al., 2011). Ainda, uma vez que as frequências dos alelos C e T do SNP *rs5743836* variam dependendo da etnia, estudos de associação envolvendo este SNP poderiam explicar o maior risco de algumas doenças observado em indivíduos de uma determinada ancestralidade (CARVALHO, A. et al., 2011).

Tais estudos sugerem que este SNP pode estar relacionado com casos mais graves de COVID-19. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar a influência dos polimorfismos *rs5743836* localizado no promotor do gene *TLR9* no desfecho da infecção por SARS-CoV-2.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo caso-controle foi realizado com 80 amostras de pacientes internados nos Hospitais Universitários de Maringá e Londrina, com diagnóstico laboratorial de Covid-19. Foram selecionados 40 pacientes graves e como controles 40 pacientes que manifestaram quadros leves da doença. O projeto foi conduzido de acordo com as normas preconizadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá CAAE: 38095420.5.0000.0104.

As amostras de sangue total foram coletadas em tubos contendo EDTA. O DNA genômico foi extraído utilizando o Kit de extração DNA BIOPUR® (Biometrix, Curitiba, Paraná, Brasil), de acordo com o fabricante, e a concentração e pureza do material obtido foram mensuradas utilizando o equipamento Nanodrop 2000® (Wilmington, USA).

A genotipagem do SNP foi realizada por PCR-SSP utilizando os iniciadores (*primers*) sequência-específica. A visualização do produto amplificado foi feita por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com *Syber Green* (ThermoFisher®).

As análises estatísticas e o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) foram avaliados utilizando o software SNPStats (disponível em: <https://www.snpstats.net/start.htm>), que também foi utilizado para detecção da razão de chances equilíbrio, com intervalo de confiança (IC) de 95% pelo teste do χ^2 e regressão logística. O programa OpenEpi foi utilizado para calcular a análise estatística dos alelos e diferenças nas características dos pacientes pelo teste χ^2 e teste T. (https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as características dos pacientes associadas à gravidade do COVID-19 neste estudo estão presentes na Tabela 1. Em relação à idade dos pacientes, o Teste T mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre pacientes leves (50 ± 14) e graves (62 ± 15), observou-se também que houve diferença entre sexo e a comorbidade diabetes, motivo pelo qual essas variáveis foram incluídas na análise de regressão logística ($p < 0,05$).

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

CARACTERÍSTICAS	LEVES N = 40	GRAVES N = 40	p valor
SEXO (F/M)	30 / 10	20 / 20	$p < 0,05^b$
IDADE	50 ± 14^a	62 ± 15^a	$p < 0,05^c$
COMORBIDADES			
HIPERTENSÃO	6	14	$p > 0,05^b$
DIABETES	3	11	$p < 0,05^b$
OBESIDADE	14	13	$p > 0,05^b$

a - Média \pm 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 *TLR9* estavam de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). Não houve associação entre os diferentes genótipos relativos ao polimorfismo *rs5743836* e a gravidade da doença. Na análise das frequências alélicas, o alelo C foi associado com proteção para gravidade da doença. Os dados estão presentes na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo (*rs5743836*) no gene *TLR9* de acordo com a gravidade dos casos de COVID-19.

SNP	LEVES N = 40	GRAVES N = 40	OR (95% IC)	p valor
rs5743836	n (%)	n (%)		
T/T	26 (65)	34 (85)	1,00	
T/C	13 (32,5)	6 (15)	0,44 (0,12 - 1,57) ^a	0,22
C/C	1 (2,5)	0 (0)	0,00 (0,00 - NA) ^a	
T/C – C/C	14 (35)	6 (15)	0,40 (0,11 – 1,39) ^b	0,14
Alelos				
T	65 (81)	74 (92)	1,00	0,03
C	15 (19)	6 (8)	0,35 (0,12 – 0,95) ^c	

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 software SNPStats com base em um modelo estatístico Dominante; c - A análise estatística foi realizada pelo OpenEpi tabela de contingência.

Nossos resultados mostraram que houve associação de proteção do alelo C com a gravidade da doença. Um recente estudo mostrou associação entre o alelo C do polimorfismo *rs5743836* e um maior risco de infecção por COVID-19 e também com a gravidade da doença (ALHABIBI, A. M. et al., 2023). Embora verifique-se divergência entre os resultados, uma possível explicação pode ser as diferenças étnicas entre as populações, além da influência de outros genes na imunopatogênese da doença. Para comprovarmos esses resultados, um número maior de pacientes devem ser genotipados.

CONCLUSÕES

O polimorfismo *rs5743836* (-1237T>C) do gene *TLR9* foi associado com proteção para o desenvolvimento de COVID-19 grave.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos professores e colaboradores do Laboratório de Imunogenética da UEM e ao apoio financeiro do Laboratório de Imunogenética - UEM (Projeto nº 00639/99-DEG-UEM), da Fundação Araucária do Estado do Paraná, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

REFERÊNCIAS

ALHABIBI, A. M; et al. Impact of Toll-Like Receptor 2 and 9 Gene Polymorphisms on COVID-19: Susceptibility, Severity, and Thrombosis, **Journal of Inflammation Research**, 16:, 665-675, 2023.

CARVALHO, A; et al. The C allele of *rs5743836* polymorphism in the human *TLR9* promoter links IL-6 and *TLR9* up-regulation and confers increased B-cell proliferation. **PloS one**. v. 6 (11). 2011.

GAO, Y-D; et al. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 76, p. 428-455, nov. 2020.

HALL, S. C; AGRAWAL, D. K. Toll-like receptors, triggering receptor expressed on myeloid cells family members and receptor for advanced glycation end-products in allergic airway inflammation. **Expert review of respiratory medicine**. v.10 (2), p. 171–184, 2016.

32º Encontro Anual de Iniciação Científica
12º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



23 e 24 de Novembro de 2023

Organização Mundial da Saúde. (2022). **Coronavirus disease (COVID-19).**