

INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO *rs8192917* (Q48R) DO GENE *GZMB* NO PROGNÓSTICO DA COVID-19

Laís Fernandes Gabriel (PIBIC/FA), Taynara Magali Ghuidotti Lorenzian, Matheus Braga, Sérgio Grava, Jeane Eliete Laguila Visentainer, Bruna Karina Banin Hirata (orientadora). E-mail: bkbhirata2@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Imunologia/Imunogenética.

Palavras-chave: Granzima B; Polimorfismo de nucleotídeo único; Imunogenética.

RESUMO

O vírus SARS-CoV-2, causador da COVID-19, é um patógeno de elevada transmissibilidade e taxa de mutação, capaz de desencadear quadros sintomáticos de diversos níveis de gravidade entre os infectados. A apoptose induzida por granzimas e perforinas é a principal via empregada pelos linfócitos T CD8+ e células NK no combate à infecções virais, sendo a granzima B uma enzima capaz de induzir a morte celular por diversas vias. É sabido que alguns polimorfismos do gene da granzima B, como o *rs8192917*, afetam sua função. A análise da frequência genotípica e alélica do polimorfismo *rs8192917* foi realizada em indivíduos acometidos pela COVID-19, a fim de verificar seu potencial como marcador genético de prognóstico da doença. Foram analisadas amostras de 150 pacientes, classificados em estágios não severo, severo ou crítico de desenvolvimento da doença. A genotipagem do polimorfismo Q48R foi realizada por qPCR. Sua associação com o prognóstico da doença foi determinada por regressão logística binária, ajustada para fatores confundidores como sexo, idade e comorbidades. Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre os genótipos da granzima B para o polimorfismo investigado e a gravidade dos casos de COVID-19 estudados (TC [$p=0,14$], CC [$p=0,06$] e TC+CC [$p=0,23$]). Da mesma forma, nenhuma correlação foi observada entre as variantes genéticas e a evolução dos pacientes para óbito (TC [$p=0,88$], CC [$p=0,99$] ou TC+CC [$p=0,89$]). Portanto, os resultados obtidos indicam não haver associação entre o polimorfismo Q48R e o prognóstico da COVID-19.

INTRODUÇÃO

A apoptose induzida por granzimas e perforinas é a principal via empregada pelos linfócitos T CD8 (linfócitos T citotóxicos, CTLs) e células NK no combate à infecções virais (Trapani e Smyth, 2002). A granzima B (GzmB) pode induzir a morte celular através de diversas vias, destacando-se a ativação da cadeia apoptótica das caspases. Ela também é capaz de agir diretamente sobre vírus e células infectadas,

controlando a infecção de maneira não citotóxica. A expressão de GzmB (em nível de intensidade e número de células com expressão ativa) em uma doença está relacionada ao prognóstico e chances de sobrevivência do indivíduo acometido (Wang *et al.*, 2021). Em 2003, McIlroy e colaboradores associaram a ocorrência de três polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), no gene *GZMB*, ao desenvolvimento de autoimunidade, rejeição de transplantes e imunidade antitumoral. O polimorfismo *rs8192917*, correspondente à substituição de um nucleotídeo de adenina por outro de guanina, causa a modificação do aminoácido glutamina (Q) para arginina (R) na posição 48 da proteína traduzida (Q48R). Neste estudo, o SNP descrito é representado da seguinte forma: o genótipo TT (variante de referência) indica ausência de polimorfismo em ambos os alelos do gene, o TC em apenas um deles e o CC em ambos.

A COVID-19 é uma síndrome respiratória aguda desencadeada pela infecção do vírus SARS-CoV-2, um patógeno de alta taxa de transmissão, especialmente pelas vias respiratórias superiores através do contato próximo com pessoas contaminadas. Sabidamente, os linfócitos T citotóxicos e as células NK são importantes agentes da defesa antiviral. A perda da atividade citotóxica da GzmB, associada à ocorrência dos SNPs descritos, pode ter impacto significativo na eficiência da resposta imunológica dos indivíduos portadores contra diversos tipos de patógenos, como por exemplo o vírus da COVID-19. Conforme o guia elaborado pelo The BMJ (2020) a severidade da COVID-19 pode ser elencada em três diferentes níveis: não severo (sem sinais associados aos demais estágios), severo (indivíduos com saturação de oxigênio no sangue inferior à 90%, pneumonia ou intensa dificuldade respiratória) e crítico (indivíduos com necessidade de uso equipamentos de suporte à vida/intubação, síndrome respiratória aguda grave, sepse ou choque séptico). A análise proposta neste estudo busca esclarecer o papel do polimorfismo Q48R na imunopatogênese e curso clínico da COVID-19, avaliando seu potencial como marcador genético de prognóstico da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo faz parte do projeto de pesquisa intitulado “Marcadores imunológicos da síndrome respiratória aguda grave causada pelo novo coronavírus” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá, pareceres números 4.357.896 (Aprovado em 14/10/2020) e 4.508.676 (Aprovado, com modificação e emenda, em 18/12/2020).

Foram analisadas amostras de 150 pacientes diagnosticados com COVID-19, coletadas em três diferentes hospitais de Maringá, no Paraná. O grupo amostral contava com indivíduos em diferentes estágios de evolução da doença, distribuídos em três categorias: não severo, severo e crítico. Os critérios utilizados para a formação dos grupos foram orientados com base nos parâmetros determinados pelo The BMJ (2020), em um guia elaborado de acordo com a classificação oficial da Organização Mundial de Saúde. A genotipagem das amostras foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real (qPCR) utilizando sondas fluorescentes TaqMan específicas para o polimorfismo genético

rs8192917 da granzima B. Para sua amplificação, foram utilizados 5µL de volume total de reagentes, sendo 2 µL de DNA e 3µL do Mix da reação. O sistema utilizado para medir a fluorescência foi o termociclador StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific, 2013). A investigação da associação do SNP com a gravidade e o desfecho da doença (sobrevivência/óbito) foi realizada por meio de regressão logística binária, ajustada para potenciais fatores de confusão (sexo, idade, doença cardiovascular, tabagismo, diabetes e obesidade) utilizando o software IBM SPSS Statistics versão 31.0 (IBM Corp., 2024). Para todas as análises o nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela abaixo, encontram-se descritos os resultados para a análise de correlação entre os três diferentes genótipos do SNP Q48R da granzima B e a classificação do nível de gravidade do quadro clínico de pacientes com COVID-19. As classificações “severo” e “crítico” foram agrupadas em uma única categoria, a fim de viabilizar a realização da análise apesar da baixa ocorrência do genótipo CC.

Tabela 1. Associação do polimorfismo Q48R com a gravidade da COVID-19.

Genótipo	Não severo	Severo/Crítico	OR	IC (95%)	Valor de <i>p</i>
TT	47 (31,3%)	42 (28%)	1,00	-	-
TC	23 (15,3%)	33 (22%)	1,89	0,81 - 4,42	0,14
CC	4 (2,6%)	1 (0,6%)	0,06	0,004 - 1,17	0,06
TC+CC	27 (17,9%)	34 (22,6%)	1,59	0,73 - 3,48	0,23

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre o prognóstico da COVID-19 e os genótipos TC e CC. A escolha de inclusão do modelo dominante (TC+CC) na análise foi realizada a fim de aumentar seu poder estatístico, uma vez que a prevalência do genótipo CC foi muito baixa com relação aos demais. Apesar disso, o resultado obtido para este grupo também não foi significativo. De modo semelhante, não foi encontrada relação entre a evolução do quadro dos pacientes à óbito aos genótipos TC ($p=0,88$), CC ($p=0,99$) ou TC+CC ($p=0,89$). É possível que a baixa frequência do genótipo CC esteja associada à composição étnica do grupo amostral (majoritariamente branca). Em 2003, McIlroy e colaboradores identificaram uma porcentagem consideravelmente superior de indivíduos portadores do alelo T dentre caucasianos quando em comparação à grupos de africanos e vietnamitas.

Evidenciando a dualidade dos efeitos imunológicos da GzmB, Wang e colaboradores (2021) relacionaram sua expressão à ocorrência e agravamento de doenças como inflamação e fibrose. Foram relatados também efeitos benéficos da inibição da granzima em doenças como asma humana e infarto agudo do miocárdio. O aumento dos níveis de GzmB é capaz de induzir uma resposta imune inespecífica, com impactos negativos na patogênese, risco e progressão de doenças. É plausível assumir, portanto, que sua expressão inadequada em indivíduos portadores do

genótipo CC possa ser responsável pelo desenvolvimento da forma mais leve da COVID-19. A tempestade de citocinas é um dos principais quadros responsáveis por ocasionar maior dano tecidual e, consequentemente, maior gravidade da doença (Land, 2021). A expressão normal da granzima B, associada aos genótipos TT e TC, pode estar relacionada à intensificação desse processo.

CONCLUSÕES

Não foi encontrada associação entre o polimorfismo Q48R e o prognóstico da COVID-19. O aparente caráter protetor do alelo C é um achado que sugere a necessidade da realização de estudos mais aprofundados no futuro. A clareza e qualidade dos resultados podem ser aprimoradas com o aumento do grupo amostral.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece à Fundação Araucária pelo auxílio financeiro despendido e ao Laboratório de Imunogenética pela infraestrutura e suporte técnico oferecidos.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A. *et al.* A living WHO guideline on drugs for covid-19. **The BMJ**, v. 370, art. m3379, set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmj.m3379>. Acesso em: 26 ago. 2025.

LAND, W. G. Role of DAMPs in respiratory virus-induced acute respiratory distress syndrome – with a preliminary reference to SARS-CoV-2 pneumonia. **Genes & Immunity**, v. 22, n. 3, p.141-160, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41435-021-00140-w>. Acesso em: 29 ago. 2025.

MCELLROY, D. *et al.* A triple-mutated allele of granzyme B incapable of inducing apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 5, p. 2562-2567, fev. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0437935100>. Acesso em: 14 ago. 2025.

TRAPANI, J., SMYTH, M. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 735–747, out. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri911>. Acesso em: 14 ago. 2025.

WANG, H. *et al.* Dual roles of granzyme B. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 94, n. 3, p. e13086, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/sji.13086>. Acesso em: 14 ago. 2025.