



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS
LABORATÓRIO DE FARMACOGENÉTICA

JEAN BRENO SILVEIRA DA SILVA

**ESTRATIFICAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE
POLIMORFISMOS DE *ACE2* E *TMPRSS2* NO PROGNÓSTICO DA COVID-19**

FORTALEZA

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

JEAN BRENO SILVEIRA DA SILVA

**ESTRATIFICAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE
POLIMORFISMOS DE *ACE2* E *TMPRSS2* NO PROGNÓSTICO DA COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro

Coorientadora: Profa. Dra. Caroline Aquino Moreira Nunes

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D11e Da Silva, Jean Breno Silveira.
Estratificação molecular e avaliação da influência de polimorfismos de ACE2 e TMPRSS2 no prognóstico da COVID-19 / Jean Breno Silveira Da Silva. – 2023.
105 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro.
Coorientação: Prof. Dr. Profa. Dra. Caroline Aquino Moreira Nunes.
1. COVID-19. 2. SARS-CoV-2. 3. Variação genética. 4. Polimorfismo de nucleotídeo único. I. Título.
CDD 615.1
-

JEAN BRENO SILVEIRA DA SILVA

ESTRATIFICAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE
POLIMORFISMOS DE *ACE2* E *TMPRSS2* NO PROGNÓSTICO DA COVID-19

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Farmacologia

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Francisca Andréa da Silva Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Antônio José de Jesus Evangelista
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

in memoriam de todas as vítimas da COVID-19,
em especial de meu amado tio Pedro Paulo da Silveira.

AGRADECIMENTOS

À cada uma das pessoas que estiveram ao meu lado durante o meu mestrado, tornando o percurso mais leve e contribuindo para que eu chegasse até aqui. Ao meu marido, Igor Câmara, por estar ao meu lado enfrentando todas as circunstâncias adversas pelas quais tivemos que passar e por ter me feito acreditar que era possível superar o medo e lutar.

À minha querida mãe, Marta Silveira, por ter sido tão forte e vencido todas as suas batalhas com muita coragem, obrigado por continuar comigo. Aos meus sobrinhos amados: Ariely, Clara, Cecília, Heitor, Júlia, Ághata e Henrique; o amor de vocês me deixou a cada dia mais forte.

Aos meus amigos mais próximos, Neto e Pedro, por não terem desistido de mim e terem tentado ao máximo manter nosso vínculo forte ao longo desses anos. Aos queridos amigos que fiz durante o mestrado: Nayana, Cássia, Flávia, Sarah, Karen, Vicente, Landerson, Patrick, Morgana, Victor e muitos outros, com quem compartilhei diversos momentos na jornada acadêmica.

Agradeço a todos os membros do laboratório de Farmacogenética (FARMAGEN) pois, ainda que indiretamente, todos contribuíram para a realização deste trabalho. Agradeço em especial Luina, por todas as técnicas e conhecimentos práticos que me ensinou, e Islay, por ser sempre solícita em ajudar. Obrigado também aos professores Pedro e Felipe, que me ajudaram imensamente com este trabalho, sem a ajuda de vocês, não seria possível.

À minha orientadora Professora Raquel Montenegro por ter me dado a oportunidade de ser seu orientando e por todo aprendizado que me proporcionou. Meu muito obrigado também a minha coorientadora, Professora Caroline Nunes, por sua grandiosidade e generosidade e por todo o suporte que me forneceu.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) e ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e toda a coordenação pelo zelo e qualidade do ensino ofertado. À cada professor que tive a oportunidade de ser aluno, aos membros da banca de qualificação Professores Carlos Paier e Felipe Pantoja, bem como os membros da banca de defesa: Professor Antônio José Evangelista, Professora Deysi Wong e Professora. Andréa Oliveira, além de cada professor que contribuiu para minha formação. Por fim, gostaria de

agradecer também as instituições de fomento, sobretudo à CAPES, pelo financiamento dessa pesquisa através da manutenção de bolsa de auxílio.

ESTRATIFICAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DE *ACE2* E *TMPRSS2* NO PROGNÓSTICO DA COVID-19

RESUMO

Nos primeiros meses da pandemia por COVID-19, estudos científicos demonstraram diferenças nas frequências alélicas de variantes do gene *TMPRSS2* (rs2070788) entre asiáticos e italianos, revelando que níveis de expressão mais altos de *TMPRSS2* são mais frequentes na população da Itália, país fortemente atingido pela pandemia, do que na população do leste asiático. Além disso, foi reportado que o SNP rs35803318 (*ACE2*) apresentou maior frequência na população italiana, quando comparada às frequências do continente africano e sul asiático. Vale ressaltar que ambos os genes originam proteínas fundamentais para a ligação do vírus *SARS-CoV-2* à membrana da célula do hospedeiro e, por isso, polimorfismos em diferentes populações podem influenciar a virulência e a gravidade da doença. Além disso, o produto do gene *TMPRSS2* (uma serino-protease transmembranar) é um potencial alvo farmacológico na COVID-19. Portanto, o objetivo deste trabalho foi a caracterização e estratificação genética das frequências alélicas variantes do gene *TMPRSS2* e *ACE2* de pacientes com diferentes apresentações clínicas da COVID-19. Para isso, realizou-se o diagnóstico molecular da infecção por *SARS-CoV-2* por RT-qPCR. No total, 148 pacientes com resultado positivo foram submetidos às análises de genotipagem por PCR em Tempo Real (qPCR). Todos os resultados da genotipagem foram analisados em comparação com 3.115 amostras de 26 populações diferentes concentradas em cinco grupos continentais: África, Américas, Ásia Oriental, Europa, e Sul da Ásia. Para *ACE2* (rs35803318) os resultados encontrados foram de 92,6% para o genótipo CC, 3,4% para o genótipo CT e 4,0% de portadores do genótipo TT. Para *TMPRSS2* (rs2070788), as frequências genotípicas foram de 22,3% do genótipo GG, 50,7% do genótipo AG e 27% de portadores do genótipo AA. A distribuição dos genótipos e frequências dos alelos para os polimorfismos humanos de *TMPRSS2* (rs2070788) e *ACE2* (rs35803318) variaram significativamente entre as populações mundiais e a coorte de Fortaleza (Ceará, Brasil). Foi evidenciado que os polimorfismos da *ACE2* e *TMPRSS2* estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) na maioria das populações (valor de $p > 0,05$), exceto para o SNP rs35803318 (*ACE2*) na população de Fortaleza (valor de $p < 0,05$). Uma análise de locus de traço quantitativo de expressão (eQTL do inglês: *expression quantitative trait loci*) revelou que o SNP rs35803318 está associado a uma expressão alterada do gene *PIR*, enquanto para o SNP rs2070788 foi encontrada apenas associação de eQTLs com o tecido pulmonar. A análise conjunta dos resultados de genotipagem com os dados clínicos de pacientes gravemente doentes por COVID-19 revelou, ainda, não haver associação entre a distribuição de alelos e genótipos de *ACE2* e *TMPRSS2* com as variáveis categóricas (desfecho, ocorrência de sepse e necessidade de ventilação mecânica) e intervalares (escala de *Glasgow*, frequência respiratória, frequência cardíaca, pressão diastólica e sistólica, contagem de leucócitos, plaquetas e níveis de creatinina) disponíveis.

Palavras-chaves: COVID-19. SARS-CoV-2. Variação genética. Polimorfismo de nucleotídeo único.

MOLECULAR STRATIFICATION AND EVALUATION OF THE INFLUENCE OF ACE2 AND TMPRSS2 POLYMORPHISMS ON THE PROGNOSIS OF COVID-19

ABSTRACT

In the first months of the COVID-19 pandemic, scientific studies showed differences in the allele frequencies of variants of the *TMPRSS2* gene (rs2070788) between Asians and Italians, revealing that higher levels of *TMPRSS2* are more frequent in the population of Italy, a country hit hard by the pandemic, than in the East Asian population. In addition, it was reported that the SNP rs35803318 (*ACE2*) was more frequent in the Italian population, when compared to the frequencies of the African continent and South Asia. It is noteworthy that both genes originate proteins that are essential for binding the *SARS-CoV-2* virus to the host cell membrane and, therefore, polymorphisms in different populations can influence the virulence and severity of the disease. Furthermore, the *TMPRSS2* gene product (a transmembrane serine protease) is a potential pharmacological target in COVID-19. Therefore, the objective of this work was the characterization and genetic stratification of the variant allele frequencies of the *TMPRSS2* and *ACE2* gene of patients with different clinical presentations of COVID-19. For this, molecular diagnosis of *SARS-CoV-2* infection was carried out by RT-qPCR. A total of 148 patients with a positive result underwent Real Time PCR (qPCR) genotyping analysis. All genotyping results were analyzed against 3,115 samples from 26 different populations concentrated in five continental groups: Africa, Americas, East Asia, Europe, and South Asia. For *ACE2* (rs35803318) the results found were 92.6% for the CC genotype, 3.4% for the CT genotype and 4.0% of TT genotype carriers. For *TMPRSS2* (rs2070788), the genotype frequencies were 22.3% of the GG genotype, 50.7% of the AG genotype and 27% of AA genotype carriers. The distribution of genotypes and allele frequencies for the human *TMPRSS2* (rs2070788) and *ACE2* (rs35803318) polymorphisms varied significantly between world populations and the Fortaleza (Ceará, Brazil) cohort. It was shown that the *ACE2* and *TMPRSS2* polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in most populations (p -value >0.05), except for the SNP rs35803318 (*ACE2*) in the population of Fortaleza (p -value <0.05). A quantitative expression trait locus (eQTL) analysis revealed that the SNP rs35803318 is associated with an altered expression of the *PIR* gene, while for the SNP rs2070788 only association of eQTLs with lung tissue was found. The joint analysis of the genotyping results with the clinical data of critically ill patients due to COVID-19 also revealed that there was no association between the distribution of *ACE2* and *TMPRSS2* alleles and genotypes with the categorical variables (outcome, occurrence of sepsis and need for mechanical ventilation) and intervals (Glasgow scale, respiratory rate, heart rate, diastolic and systolic pressure, white blood cell and platelet count and creatinine levels) available.

Keywords: COVID-19. SARS-CoV-2. Genetic variation, polymorphisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Árvore filogenética dos coronavírus (CoVs).....	20
Figura 2 - Principais proteínas estruturais de SARS-CoV-2	23
Figura 3 - Organização genômica de SARS-CoV-2.....	24
Figura 4 - Mecanismos de Infecção do SARS-CoV-2 em uma célula da via respiratória	27
Figura 5 - Representação esquemática do delineamento do estudo	45
Figura 6 - Exemplo de desenho de placa de PCR em Tempo Real	49
Figura 7 - Representação gráfica dos dados estatísticos da análise de SAPS3	55
Figura 8 - eQTLs associados ao polimorfismo rs2070788 (<i>TMPRSS2</i>) em diferentes tecidos.....	59
Figura 9 - eQTLs associados ao polimorfismo rs35803318 (<i>ACE2</i>) em diferentes tecidos.....	60
Figura 10 - Representação gráfica da análise conjunta do polimorfismo de <i>TMPRSS2</i> (rs2070788) e os dados clínicos do grupo “UTI”.	63
Figura 11 - Representação gráfica da análise conjunta do polimorfismo de <i>ACE2</i> (rs35803318) e os dados clínicos do grupo “UTI”.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências contexto de primers e sondas TaqMan® utilizadas.....	49
Tabela 2 - Programação utilizada no equipamento de PCR em Tempo Real.....	50
Tabela 3 - Volume de reagentes para preparo da mistura de reação	51
Tabela 4 - Volume de reagentes para preparo de uma única reação	51
Tabela 5 - Dados clínicos pacientes com COVID-19.....	53
Tabela 6 - Características clínicas dos pacientes positivos para COVID-19 admitidos nas UTIs dos hospitais incluídos neste estudo.....	54
Tabela 7 - Distribuição de alelos e genótipos na coorte de pacientes com COVID-19	56
Tabela 8 - Equilíbrio de Hardy-Weinberg e comparação das frequências alélicas do SNP rs35803318 de <i>TMPRSS2</i> na população Fortaleza (FOR) e outras populações continentais (AFR, AMR, LA, EUR, SA).....	57
Tabela 9 - Equilíbrio de Hardy-Weinberg e comparação das frequências alélicas do SNP rs35803318 de <i>ACE2</i> na população Fortaleza (FOR) e outras populações continentais (AFR, AMR, LA, SA, EUR).....	58
Tabela 10 - Associação das características clínicas com genótipo e distribuição alélica do polimorfismo rs2070788 (<i>TMPRSS2</i>)	61
Tabela 11 - Associação das características clínicas com genótipo e distribuição alélica do polimorfismo rs35803318 (<i>ACE2</i>)	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1000G	<i>1000 Genomes Phase 3</i>
ACE2	Enzima conversora de Angiotensina 2
ALT	Alanina aminotransferase
ANG II	Angiotensina 2
ANG I-VII	Angiotensina 1-7
APN	Aminopeptidase N
AST	Aspartato aminotransferase)
ATP	Adenosina trifosfato
BKO	<i>Bcl-2-related ovarian killer</i>
CN	Controle negativo
CoVs	Coronavírus
Cq	Ciclo de quantificação
CQ	Cloroquina
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DPP4	Dipeptidil peptidase 4
dsDNA	DNA de dupla fita
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHW	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>
eQTL	<i>Expression quantitative trait loci</i>
FR	Frequência respiratória
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
gRNA	RNA genômico
HCoV	Coronavírus humanos
HCQ	Hidroxicloroquina
IFN-1	Interferon tipo 1
IL-6	Interleucina 6
JAKINIBS	Inibidores da Janus quinase
LDH	Lactato desidrogenase

ng	Nanogramas
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open reading frame.</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RBD	<i>Receptor-binding domain</i>
RBM	<i>Receptor-binding motif</i>
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SPO2	Saturação de oxigênio
SRAA	Renina-angiotensina-aldosterona
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
TMPRSS2	<i>Transmembrane protease, serine 2</i>
TTSP	<i>Type II transmembrane serine proteases</i>
TVP	Trombose venosa profunda
μL	Microlitros
VHS	Taxa de sedimentação de eritrócitos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	Pandemia por <i>SARS-CoV-2</i>	18
2.2	Coronavírus	19
2.2.1	Aspectos gerais dos coronavírus	19
2.2.2	SARS-CoV-2	22
2.2.3	Principais proteínas estruturais de SARS-CoV-2	24
2.2.4	Ciclo viral de SARS-CoV-2	26
2.3	Doença por coronavírus 2019 (COVID-19).....	27
2.4	Terapia farmacológica na COVID-19	30
2.5	Reposicionamento de fármacos para COVID-19	32
2.6	Susceptibilidade genética do hospedeiro à COVID-19	35
2.6.1	Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2)	36
2.6.2	Serino-protease Transmembranar tipo II (TMPRSS2)	38
3	JUSTIFICATIVA.....	42
4	OBJETIVOS.....	43
4.1	Objetivo Geral	43
4.2	Objetivos Específicos.....	43
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
5.1	Delineamento do estudo	44
5.2	Aspectos Éticos	45
5.3	Coleta de amostras biológicas	46
5.4	Detecção de <i>SARS-CoV-2</i>	46
5.5	Processamento de amostras de sangue total e extração de DNA genômico	47

5.6	Genotipagem de amostras de DNA	48
5.7	Expressão de <i>locus</i> de características quantitativas (eQTL).....	51
5.8	Análise estatística	52
6	RESULTADOS	53
6.1	Análise de dados clínicos.....	53
6.2	Genotipagem dos Polimorfismos de <i>TMPRSS2</i> e <i>ACE2</i>	55
6.3	Comparação de frequências genótípicas e frequências alélicas entre diferentes populações	56
6.4	Análise de Expressão de <i>locus</i> de características quantitativas	58
6.5	Análise conjunta entre dados clínicos e de genotipagem dos pacientes da UTI.	61
7	DISCUSSÃO	65
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
	REFERÊNCIAS	76
	ANEXO I – CARTA DE CONCORDÂNCIA EM PARTICIPAÇÃO INSTITUTO DR. JOSÉ FROTA	94
	ANEXO II – CARTA DE CONCORDÂNCIA EM PARTICIPAÇÃO HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECCIOSAS	94
	ANEXO III – CARTA DE CONCORDÂNCIA EM PARTICIPAÇÃO LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICOS DO BRASIL (DASA)	96
	ANEXO IV – RELATÓRIO DE VISITA TÉCNICA – LACEN	97
	ANEXO V – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) ..	99
	ANEXO VI – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA PROJETO BIOMARCADORES GENÉTICOS	102
	ANEXO VII – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA PROJETO BIORREPOSITÓRIO	104

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros relatos caracterizando a infecção por *SARS-CoV-2* observaram, curiosamente, que muitas pessoas infectadas pelo vírus eram assintomáticas para a doença. Em contraste, uma pequena parte dos pacientes acometidos apresentavam complicações e frequentemente morriam. De fato, a COVID-19, do inglês: possui caráter heterogêneo e um espectro variado de apresentações clínicas. Além disso, a ocorrência de doença grave, ainda que em menor frequência, em pacientes jovens e sem comorbidades, despertou o debate científico sobre a importância de aspectos genéticos nos hospedeiros capazes de torná-los vulneráveis à infecção e aos agravos da doença (WANG *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2022.)

Não surpreendentemente, evidências científicas bem estabelecidas relatam a importância da variabilidade genética na fisiopatologia de infecções por microrganismos. Dessa forma, muitas doenças infecciosas podem ter seu curso influenciado pela presença de variações genéticas do hospedeiro (CASANOVA; ABEL, 2007). Assim, iniciativas globais para investigar o papel dos genes humanos na COVID-19 ganharam força ao longo dos meses de pandemia. Como resultado, muitos marcadores genéticos foram apontados como relevantes na suscetibilidade ao *SARS-CoV-2* (ZHANG *et al.*, 2022; CAPPADONA *et al.*, 2023).

Certamente, entre os genes com maior destaque, pode-se evidenciar aqueles responsáveis pela produção de duas proteínas fundamentais no ciclo infeccioso do coronavírus: a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), que atua como receptor para o *SARS-CoV-2*, e a serino-protease transmembranar tipo 2 (TMPRSS2), responsável por promover a ativação da proteína de superfície viral (proteína S ou *Spike*) do novo coronavírus e facilitar a infecção das células do hospedeiro. Desse modo, o papel dessas proteínas no estabelecimento da infecção por *SARS-CoV-2* e outros agentes virais, as coloca como potenciais alvos para o tratamento farmacológico da COVID-19 (CHENG *et al.*, 2015; HOFFMANN *et al.*, 2020).

Todavia, o gene *ACE2*, responsável por dar origem a ECA2, desempenha importante papel fisiológico, sobretudo na manutenção da pressão arterial sistêmica, tornando mais provável o surgimento de efeitos adversos a partir do seu bloqueio (CRACKOWER *et al.*, 2002). Por outro lado, o gene *TMPRSS2* não possui papel fisiológico claro. Ainda assim, sua desregulação genética, especialmente o aumento de sua expressão em múltiplos tecidos, está associada ao

desenvolvimento de uma variedade de doenças, principalmente infecções virais e neoplasias malignas (WANG *et al.*, 2023)

No começo da pandemia, polimorfismos dos genes *ACE2* e *TMPRSS2* foram observadas em uma variedade de populações em todo o mundo, corroborando que diferenças na infecção e gravidade por COVID-19 podem ser influenciadas por antecedentes genéticos do hospedeiro (ASSELTA *et al.*, 2020; IRHAM *et al.*, 2020). Nesse contexto, existem dois SNPs constantemente descritos na literatura com significado clínico em doenças infecciosas. O rs35803318 é uma variante sinônima (C>T) no exon 18 do gene *ACE2*, enquanto o rs2070788 é uma variante intrônica (G>A) de *TMPRSS2* que não afeta a proteína produzida pelo gene (CHENG *et al.*, 2015; ASSELTA *et al.*, 2020; KEHDY *et al.*, 2021; TORRE-FUENTES *et al.*, 2021).

Dessa forma, a caracterização do perfil molecular de pacientes com diferentes quadros clínicos da COVID-19 pode ser útil, não somente para seleção de um alvo farmacológico, mas também para uma melhor estratificação dos pacientes em relação ao risco genético de desenvolver doença grave (GORDON *et al.*, 2020). Ademais, ainda há na literatura a existência de dados conflitantes sobre variantes genéticas de *ACE2* e *TMPRSS2*. Portanto, é urgente a necessidade de se obter maior clareza acerca do impacto dessas variantes na infecção por *SARS-CoV-2* (BENETTI *et al.*, 2020; VELAVAN *et al.*, 2021).

Portanto, neste estudo foram investigados os polimorfismos de nucleotídeo único dos genes *ACE2* (rs35803318) e *TMPRSS2* (rs2070788) em pacientes com COVID-19 na cidade de Fortaleza, estado do Ceará, por meio da genotipagem de polimorfismos por PCR em Tempo Real (qPCR) e a associação dos resultados de frequência alélica e genotípica com parâmetros clínicos de pacientes com doença grave. Além disso, uma análise de *Expression Quantitative Trait Locus* (eQTL) para esses SNPs também foi realizada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Pandemia por SARS-CoV-2

Os primeiros registros de COVID-19, doença causada pelo coronavírus *SARS-CoV-2*, do inglês *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, foram reportados pela China em dezembro de 2019 e poucas semanas após o anúncio do potencial de disseminação do vírus, diversas cidades ao redor do mundo passaram a registrar casos da doença. Em março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou oficialmente o estabelecimento de uma pandemia e passou a emitir recomendações aos países para reduzir o contágio (MAHASE, 2020; MALLAH *et al.*, 2021).

Ainda em março de 2020, o continente europeu passou a registrar um aumento exponencial no número de novas infecções por *SARS-CoV-2*. Rapidamente, esse número ultrapassou aqueles reportados pela China. Logo, uma crise de saúde global se instaurou e demandou a colaboração entre a comunidade científica especializada de centros de pesquisa de todo o mundo. Assim, em poucos meses, centenas de dados caracterizando o novo coronavírus estavam disponíveis, fornecendo ferramentas para o estabelecimento de medidas de prevenção e abordagem terapêutica da doença (GRAMMES *et al.*, 2020; MALLAH *et al.*, 2021).

O potencial dos coronavírus de causarem surtos e cenários de disseminação descontrolados, como os observados na pandemia recente, já era reconhecido pelos pesquisadores. Em 2002, um vírus da mesma família, *SARS-CoV*, também foi responsável pelo estabelecimento de uma pandemia por Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG). Cerca de 10 anos depois, outro coronavírus, *MERS-CoV*, do inglês: *Middle East respiratory syndrome coronavirus*, gerou preocupação ao causar doença respiratória grave em humanos. Além dos coronavírus, em 2009 o mundo enfrentou uma pandemia por gripe A, causada por uma cepa de *Influenza*, o H1N1 (CUI *et al.*, 2019; STANDL *et al.*, 2021).

No entanto, nenhuma das pandemias mencionadas tomou a proporção atingida pela pandemia do novo coronavírus, cujo número de mortos em maio de 2023 - conforme dados disponibilizados pela *Johns Hopkins University* - ultrapassa 6 milhões em todo o mundo. Dentre os aspectos que possibilitaram o estabelecimento desse cenário, está a rápida capacidade de transmissão interpessoal do *SARS-CoV-2*. Em um mundo globalizado e com alto fluxo de pessoas dentre os países, o agente viral encontrou ambiente favorável para sua disseminação. Ademais, a

dificuldade em estabelecer medidas de contenção e prevenção homogêneas em todo o mundo se configurou em um grande desafio no controle da pandemia (STANDL *et al.*, 2021).

Evidentemente, três anos após o início da pandemia atual, muitos avanços foram alcançados, seja no manejo dos pacientes ou na prospecção de tratamentos farmacológicos, sobretudo advindos do reposicionamento de medicamentos. A vacinação em massa também progrediu ao longo dos anos de pandemia e como resultado houve uma redução substancial no número de casos graves da doença. Recentemente, a Organização mundial da Saúde decretou o fim da emergência em saúde global por COVID-19. Entretanto, o vírus *SARS-CoV-2* continua a circular, causando novas infecções e mortes em todo o mundo (BARTOLETTI *et al.*, 2022; WHO, 2023).

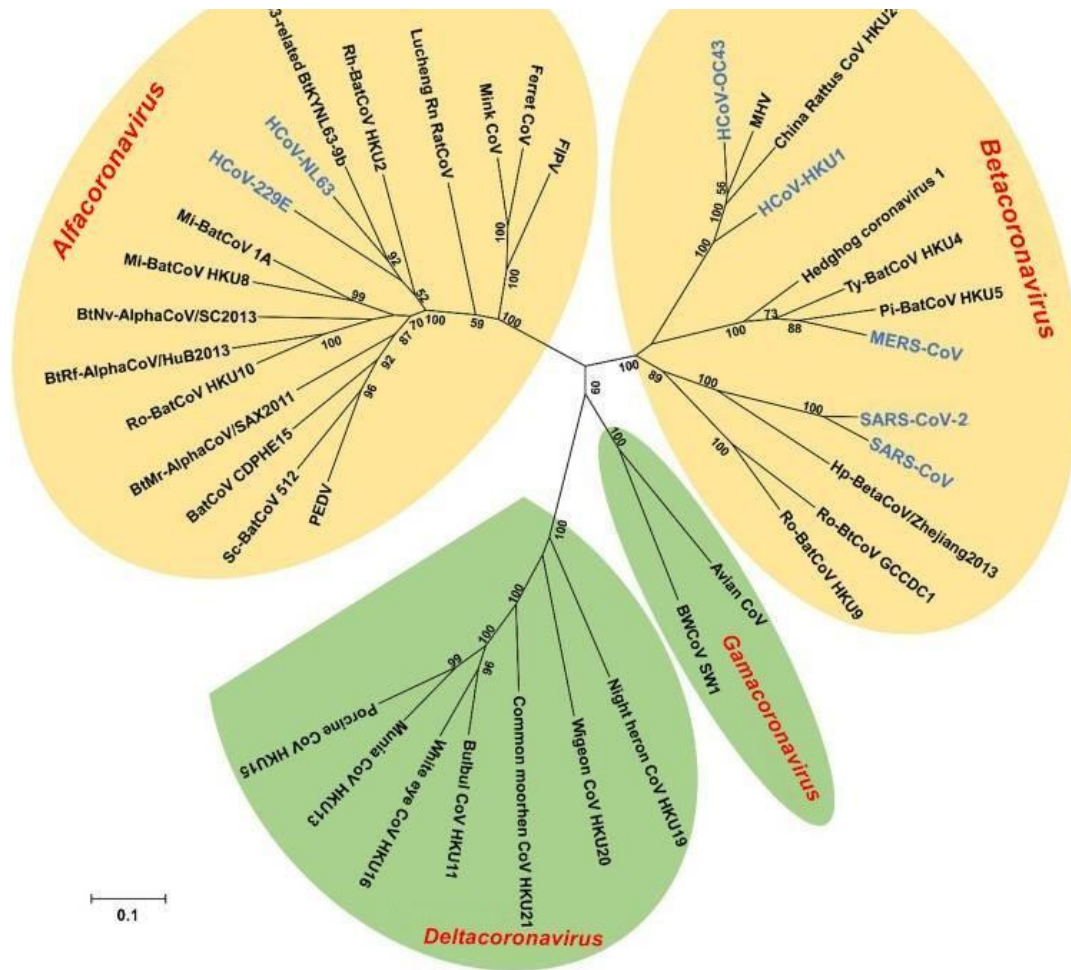
Assim, frequentemente, após períodos de queda no número de casos e óbitos, novas ondas da doença surgem e voltam a causar preocupação. Esse quadro se deve principalmente à alta taxa de mutação do coronavírus *SARS-CoV-2* amplamente disseminado, gerando novas variantes capazes de escapar da imunidade por infecção prévia e, inclusive, da imunidade adquirida por meio de vacinação. Possivelmente, a COVID-19 se tornará endêmica, exigindo a adoção de constantes medidas de prevenção e promoção de saúde pelas autoridades globais. Novos surtos sazonais da doença podem representar maiores danos a populações vulneráveis socioeconomicamente, principalmente em países em desenvolvimento, com limitações de recursos para adoção de campanhas de vacinação, além de sistemas de saúde pública inexistentes ou deficitários (BURKI *et al.*, 2022; MULLIN *et al.*, 2022).

2.2 Coronavírus

2.2.1 Aspectos gerais dos coronavírus

Os coronavírus (CoVs) fazem parte de uma subfamília de vírus chamada *Coronavirinae*, pertencente à família *Coronaviridae* e ordem *Nidovirales*. Filogeneticamente, existem quatro gêneros de coronavírus dentro da subfamília *Coronavirinae*: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamacoronavirus* e *Deltacoronavirus* (Figura 1). Atualmente, cerca de 7 membros são conhecidos por infectar e causar doenças em humanos (destacados em azul na Figura 1). A maioria deles provoca doença branda, contudo, agentes como o *SARS-CoV*, *MERS-CoV* e, mais recentemente, o *SARS-CoV-2* são capazes de desencadear doença respiratória grave e morte (WOO *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2022).

Figura 1 - Árvore filogenética dos coronavírus (CoVs)



Fonte: Adaptada de Wang e colaboradores (2020).

Os CoVs são conhecidos desde 1932, todavia, por muitas décadas esses vírus permaneceram sem despertar grande interesse da comunidade científica. Nos anos 60, foram identificados os coronavírus humanos (HCoVs) *HCoV-229* e *HCoV-OC43*, capazes de causar infecções respiratórias e gastrointestinais no homem. Ainda assim, devido ao caráter leve da maioria das infecções, não houve grande repercussão. Estima-se que no começo do século XXI menos de 10 coronavírus possuíam seu material genético totalmente sequenciado. Em 2002, esse cenário sofreu fortes modificações com a descoberta do coronavírus *SARS-CoV* (PEIRIS et al., 2003; (WOO *et al.*, 2010).

O *SARS-CoV* foi responsável pelo estabelecimento da primeira pandemia por coronavírus registrada. Em 2004/2005, foram identificados outros dois HCoVs: *HCoV-NL63* e *HCoV-HKU1*, todavia, ambos relacionados à doença leve em humanos. Anos mais tarde, em 2012, um surto de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) no Oriente Médio levou à descoberta de outro HCoV: o *MERS-CoV*. Esse último, ainda que tenha apresentado baixa capacidade de transmissibilidade, trouxe preocupação pelo alto índice de mortalidade dos doentes (cerca de 36%) (PYRC *et al.*, 2007; ZAKI *et al.*, 2012).

Conforme estudos bem aceitos, os CoVs possuem estreita relação genética com vírus oriundos de morcegos. Por isso, esses animais são considerados hospedeiros naturais dos coronavírus (Li *et al.*, 2005). Porém, para o estabelecimento da infecção em humanos, evidências apontam a existência de hospedeiros intermediários. Desse modo, os vírus originários, presentes em morcegos, sofreram modificações genéticas contínuas no interior de outros organismos até finalmente serem capazes de infectar seres humanos (LI, 2008). O *SARS-CoV* e *MERS-CoV* possuem como hospedeiros intermediários o Civeta e o Dromedário, respectivamente. Para o *SARS-CoV-2*, a hipótese melhor aceita defende o pangolim como organismo intermediário (CUI *et al.*, 2019; XIAO *et al.*, 2020).

Para que ocorra o ciclo de infecção pelos HCoVs é imprescindível a interação entre as proteínas de superfície virais (proteínas S ou *Spike*) e uma molécula receptora no hospedeiro. A interação entre vírus e hospedeiro depende das proteínas de superfície (S) virais e irá variar de acordo com o tipo de HCoV. Assim, em humanos, para infecções por *HCoV-229E* a interação da proteína S será com a enzima aminopeptidase N (APN), enquanto para *HCoV-OC43* e *HCoV-HKU1* serão receptores contendo ácido siálico. Em *MERS-CoV*, a interação ocorre com a enzima Dipeptidil peptidase 4 (DPP4). Por fim, os HCoVs *SARS-CoV*, *HCoV-NL63* e *SARS-CoV-2* terão a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) como alvo da proteína de superfície viral (YEAGER *et al.*, 1992; GE *et al.*, 2013).

Atualmente, a pandemia causada pelo *SARS-CoV-2* continua em curso. O *SARS-CoV-2* é um vírus geneticamente próximo do *SARS-CoV* que, no entanto, desenvolveu alta capacidade de transmissão interpessoal. Como consequência da ampla circulação viral, muitas variantes do novo coronavírus foram originadas e contribuíram para a perpetuação do ciclo de infecções. Hoje, existem vacinas contra o *SARS-CoV-2* e algumas alternativas farmacológicas têm sido utilizadas

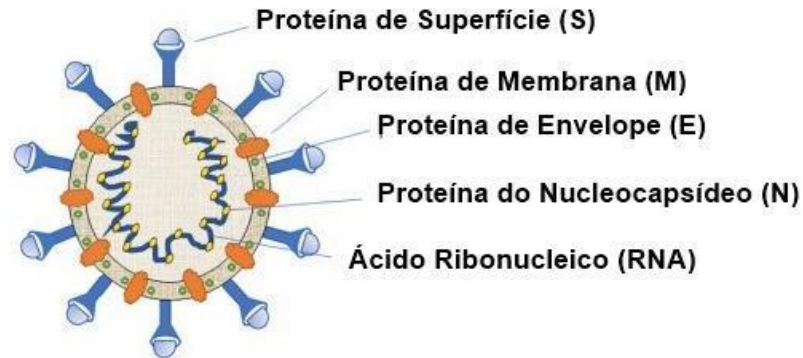
no tratamento dos pacientes. Entretanto, a vacinação não é totalmente eficaz e as medicações são pouco acessíveis e/ou possuem restrições de uso (BURKI *et al.*, 2022).

2.2.2 SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é um coronavírus de origem zoonótica que pertence à subclasse dos *Sarbecovirus* e ao gênero *Betacoronavirus*. O novo HCoV compartilha mais 79% de similaridade genética com SARS-CoV e cerca de 51% com MERS-CoV. No entanto, a análise do genoma viral revelou que o SARS-CoV-2 compartilha ainda mais semelhanças com o coronavírus *RatGI3* (96% de similaridade), encontrado em morcegos (*Rhinolophus affinis*) (LU *et al.*, 2020). Essa descoberta apoia a teoria de que o vírus apareceu pela primeira vez nesses animais. Além disso, porções significativas da proteína de superfície viral (S) em CoVs encontrados em pangolins (*Manis Javanica*) compartilham semelhanças genéticas com SARS-CoV-2, corroborando a hipótese de hospedeiros intermediários para o novo coronavírus (ZHOU *et al.*, 2020; REN *et al.*, 2020; XIAO *et al.*, 2020).

As partículas virais do coronavírus SARS-CoV-2 possuem tamanho variando entre 118 e 140 nm (nanômetros) e formato esférico. O virion é composto principalmente por quatro proteínas estruturais, sendo estas as proteínas de superfície (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N) (Figura 2). Seu material genético é formado por uma fita simples de RNA genômico (gRNA), com comprimento entre 25 e 32 quilobases (kb). O gRNA de SARS-CoV-2 possui sentido positivo (+ssRNA) e a presença de estruturas 5'- cap e 3'- cauda poli-A. Essa característica confere ao seu gRNA a capacidade de atuar como RNA mensageiro (mRNA) e recrutar ribossomos do hospedeiro para produzir proteínas virais, como a replicase (WU, F *et al.*, 2020; YADAV *et al.*, 2021).

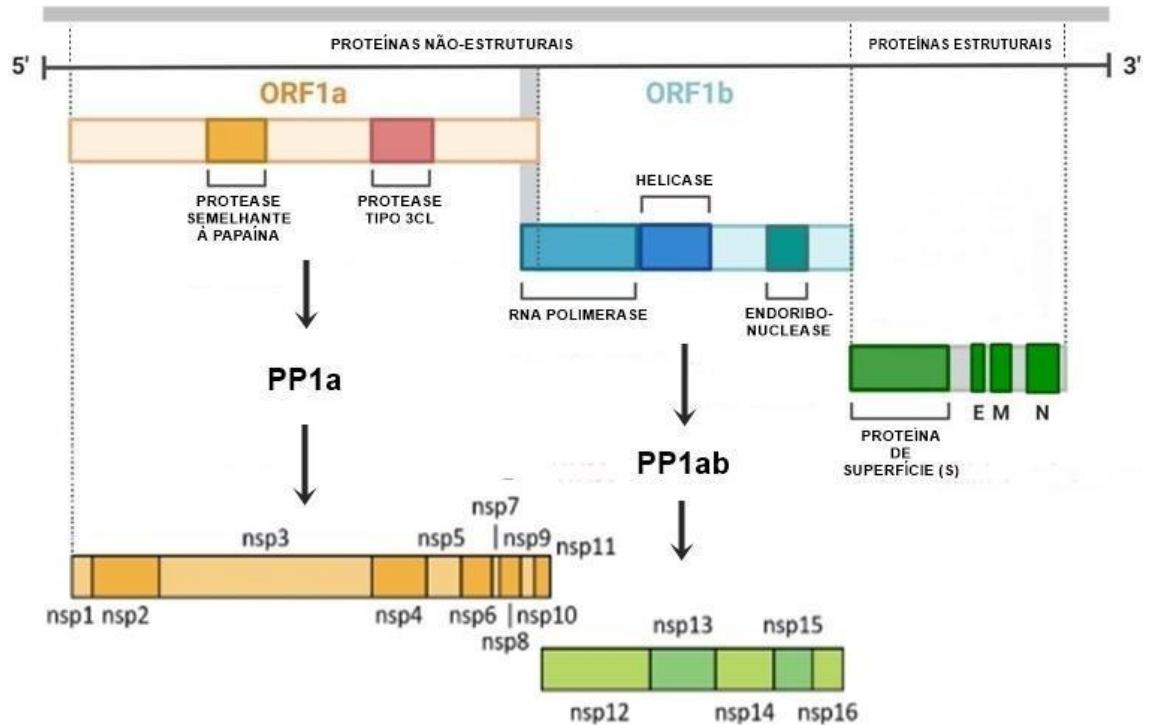
Figura 2 - Principais proteínas estruturais de SARS-CoV-2



Fonte: Adaptada de Naqvi e colaboradores (2020)

Tipicamente, o genoma dos CoVs codifica pelo menos seis janelas de leitura aberta ou *ORFs*, do inglês: *Open reading frame*. O *SARS-CoV-2* possui pelo menos 13 *ORFs*, responsáveis pela codificação de 27 proteínas. Os genes *ORF1a* e *ORF1b*, que compreendem cerca de dois terços do genoma viral, codificam respectivamente as proteínas pp1a e pp1ab. Essas últimas são poliproteínas que originam outras 16 proteínas não estruturais (nsp1-16) envolvidas na replicação e transcrição viral. Os demais *ORFs* codificam as quatro principais proteínas estruturais (S, E, M e N) e proteínas acessórias importantes na montagem da partícula viral (Figura 3) (WU, F *et al.*, 2020; WU, A *et al.*, 2020).

Figura 3 - Organização genômica de SARS-CoV-2



Fonte: Adaptada de Chilamakuri e Agarwal (2021) e Kim e colaboradores (2021)

2.2.3 Principais proteínas estruturais de SARS-CoV-2

As proteínas S são glicoproteínas transmembranares responsáveis por realizarem a interação do agente viral (CoV) com as células do hospedeiro, interagindo com receptores específicos no organismo. Por isso, a maioria das proteínas S dos coronavírus está distribuída na superfície do envelope viral. Sua estrutura é formada por cerca de 1273 aminoácidos, conferindo a ela um peso molecular de 180-200 kDa (kiloDalton), e compreende duas subunidades proteicas funcionais denominados de S1 e S2 (WALLS *et al.*, 2020; YADAV *et al.*, 2021).

Enquanto a subunidade S1, após ser ativada por meio de clivagem proteolítica por proteases como a TMPRSS2, atua na interação direta com os receptores do hospedeiro, a subunidade S2 promove a estabilidade da ligação proteína-receptor e tem papel crucial na fusão do envelope viral com as membranas da célula-alvo. A subunidade S1 é composta de três domínios: o domínio N-terminal (NTD), o domínio de ligação ao receptor, do inglês: *receptor-binding domain* (RBD), que contém o motivo de ligação ao receptor, do inglês: *receptor-binding motif* (RBM), e dois

subdomínios estruturalmente conservados (CTD1 e CTD2) (WRAPP *et al.*, 2020; HOFFMANN *et al.*, 2020).

As proteínas do envelope (E) são um dos quatro tipos de proteínas estruturais do *SARS-CoV-2* e são altamente conservadas entre os CoVs. Elas são as menores proteínas estruturais dos coronavírus, com aproximadamente 75 aminoácidos (SURYA *et al.*, 2018). Em suma, as proteínas E atuam influenciando a replicação viral, montagem de novas partículas do virion, além de brotamento no retículo endoplasmático e complexo de golgi. Além disso, são importantes na patogênese da doença por *SARS-CoV-2* (ZHOU *et al.*, 2023).

Uma das principais características das proteínas de envelope (E) é a formação de canais iônicos na membrana do vírus, denominados de viporinas. Recentemente, Guarnieri e colaboradores (2023) descreveram um mecanismo de disfunção mitocondrial e ativação do inflamassoma NLPR3 pelas viporinas de *SARS-CoV-2*. Outros agentes virais, como o vírus da *influenza e o SARS-CoV*, apresentam mecanismos semelhantes, indicando a relevância das proteínas E no processo infeccioso e patogênese da doença por coronavírus (NIETO-TORRES *et al.*, 2014).

As proteínas de membrana (M) são proteínas transmembranares formadas por 221 aminoácidos. Seu grau de conservação também é elevado entre os CoVs. Dentre as quatro proteínas estruturais de *SARS-CoV-2*, a proteína M é a que está em maior abundância nas partículas virais. Essas proteínas são responsáveis por realizar a curvatura da membrana viral e formar uma ligação entre as estruturas internas do envelope e o nucleocapsídeo. Desse modo, as proteínas M interagem com todas as proteínas estruturais, possuindo importante papel na formação de novas partículas virais, além na de canais iônicos formados por proteínas E (DE HAAN *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2022).

Yang e colaboradores (2021) sugerem em estudo recente o papel das proteínas M na patogênese da COVID-19. Assim como as proteínas E, as proteínas de membrana (M) parecem implicadas em um mecanismo de disfunção mitocondrial e ativação de vias apoptóticas por meio da indução de proteínas do tipo BKO, do inglês: *Bcl-2-related ovarian killer*, em modelos murinos. Essa ativação resultou em aumento da permeabilidade de capilares alveolares em camundongos e foi suprimida em modelos *knockdown* para BOK (GUARNIERI *et al.*, 2023).

Por fim, as proteínas estruturais do nucleocapsídeo (N) possuem cerca de 419 aminoácidos e têm como principal função regular os processos de transcrição e replicação do material genético do *SARS-CoV-2*. Ademais, atuam na degradação de RNAs da célula hospedeira e são capazes de inibir os interferons tipo 1 (IFN-1), modulando a resposta imune antiviral. As proteínas N também são potentes antígenos virais, por isso, assim como as proteínas S, funcionam como importantes marcadores diagnósticos da infecção viral (LI, *et al.*, 2020; BAI *et al.*, 2021).

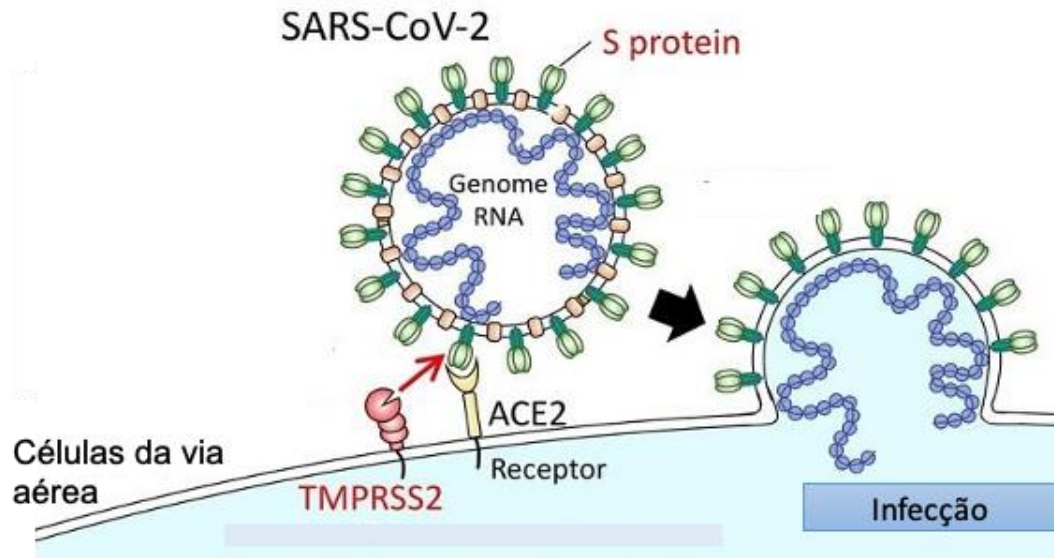
2.2.4 Ciclo viral de SARS-CoV-2

O *SARS-CoV-2*, ao contrário de outros HCoVs, como o *MERS-CoV* e *SARS-CoV*, alcançou alta eficiência na transmissão sustentada entre os indivíduos. Ganhos genéticos, aumento da afinidade proteína-receptor e mecanismos aprimorados para escape da imunidade inata do hospedeiro contribuíram para esse processo. Além disso, o coronavírus *SARS-CoV-2* pode ser transmitido por indivíduos assintomáticos ou em estágios precoces da infecção, facilitando a circulação viral e impedindo a limitação do contágio (YAN *et al.*, 2020; WEISS; MCLEAN, 2005; RICE *et al.*, 2022).

O novo coronavírus pode ser transmitido pelo contato direto entre pessoas por meio de secreções do trato respiratório humano, sobretudo gotículas expelidas através de tosse, espirros e respiração. Partículas ainda menores, denominadas aerossóis, oriundas de fluidos contaminados ou liberadas durante a fala de indivíduos infectados pelo *SARS-CoV-2*, carregam o vírus e ficam suspensas no ar. Quando inalados, os aerossóis podem infectar novos hospedeiros (ONG *et al.*, 2020; NOORIMOTLAGH *et al.*, 2021).

A entrada viral nas células hospedeiras para o efetivo estabelecimento da infecção depende da ligação da proteína S do *SARS-CoV-2* ao receptor ECA2 (Enzima Conversora de angiotensina 2) humano. Uma serina protease transmembranar tipo 2 do hospedeiro, chamada TMPRSS2, facilita a iniciação da proteína S (*spike*), resultando na fusão das membranas (Figura 4). Uma vez dentro da célula, poliproteínas virais são sintetizadas e o vírus sintetiza o RNA via sua RNA polimerase. As proteínas estruturais são sintetizadas levando à conclusão da montagem e liberação de partículas virais (HOFFMANN *et al.*, 2020; TAKEDA *et al.*, 2022).

Figura 4 - Mecanismos de Infecção do SARS-CoV-2 em uma célula da via respiratória



Fonte: Adaptada de Tokyo University (2020).

2.3 Doença por coronavírus 2019 (COVID-19)

O agente viral *SARS-CoV-2* é responsável pelo estabelecimento de infecção respiratória em humanos e por frequentemente provocar doença nos indivíduos. A doença causada por esse coronavírus é a COVID-19, comumente caracterizada por quadros clínicos de leve intensidade. Entretanto, em uma parcela menor dos infectados, sua apresentação clínica pode variar consideravelmente, evoluindo com a pioria persistente dos sinais e sintomas como dispneia, hipóxia e insuficiência respiratória. Por fim, desfechos desfavoráveis incluem choque e falência múltipla dos órgãos (LAI *et al.*, 2020; (HUANG *et al.*, 2020; CASCELLA *et al.*, 2022).

De acordo com os primeiros relatos obtidos a partir de pacientes com COVID-19 tratados em Wuhan, na China, características como febre, tosse, fadiga, mialgia e artralgia estavam presentes na maioria dos doentes nos primeiros dias de infecção. Os quadros clínicos presentes na COVID-19 mostraram-se similares aos observados em outras infecções virais conhecidas, como a causada pelo vírus *influenza*. Todavia, na infecção por *SARS-CoV-2* há maior risco da ocorrência de complicações respiratórias e aumento da mortalidade (HUANG *et al.*, 2020; PIROTH *et al.*, 2021; PORMOHAMMAD *et al.*, 2021).

No início da pandemia, a ocorrência frequente de anosmia (perda de olfato) e ageusia (perda do paladar) em pacientes com COVID-19 possibilitou minimamente a triagem clínica dos doentes. No entanto, além desses sintomas estarem presentes em outras condições patológicas, nas infecções causadas por novas variantes do *SARS-CoV-2*, como Delta e Ômicron, alterações de olfato e paladar não são sintomas comuns, sendo mais frequentes sintomas como rinorreia, faringite e espirros. Por isso, tendo em vista o aumento de novas variantes em detrimento da cepa inicial de Wuhan, não é razoável considerar anosmia e ageusia para prever a infecção pelo novo coronavírus atualmente (VARGAS-GANDICA *et al.*, 2020; BOSCOLO-RIZZO *et al.*, 2022).

O *SARS-CoV-2* é um vírus transmitido através das vias aéreas e possui considerável tropismo pelos pneumócitos do tipo 2, células presentes no epitélio pulmonar. Na doença branda não há comprometimento pulmonar grave, geralmente porque a infecção está limitada ao trato respiratório superior. Porém, quando existe acometimento do trato respiratório inferior pelo vírus, quadros de pneumonia podem se estabelecer, variando de pneumonia leve à grave (AL-QAHTANI *et al.*, 2022). Um dos principais achados radiológicos observados nos pulmões de pacientes com COVID-19 são sinais de “opacidade em vidro fosco”. Além disso, conforme demonstrado por Yoon e colaboradores (2023), os aspectos de lesão pulmonar são influenciados pelo tipo de variante de *SARS-CoV-2*. Na infecção pela variante Ômicron, por exemplo, há menos comprometimento do sistema vascular dos pulmões e menores danos ao parênquima pulmonar quando comparada à variante Delta (HUANG *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2020).

A dispneia (sensação de falta de ar) costuma atingir cerca de 20% dos pacientes com COVID-19, pode indicar hipóxia e, por isso, representa um alerta de agravo da doença, porque sugere comprometimento pulmonar grave. É importante ressaltar, no entanto, que os níveis de oxigenação sanguínea podem cair sem a presença de dispneia, caracterizando hipóxia silenciosa. Nesse caso, o monitoramento do nível de saturação de oxigênio (SpO₂) é fundamental para identificar o agravamento da doença (COUZIN-FRANKEL *et al.*, 2020; EVANS, 2022).

Em quadros críticos de COVID-19, quando há o desenvolvimento de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), frequentemente há danos causados pela infecção em grande parte do tecido pulmonar. Além disso, pode ocorrer a formação de edema na região com conseqüente prejuízo à hematose sanguínea. Por isso, os níveis de oxigenação sanguínea estão reduzidos, há aumento da frequência respiratória (FR) e piora progressiva do desconforto

respiratório nos pacientes. O aparecimento de cianose central também pode acontecer, além de confusão mental e perda de consciência (RICHARDSON *et al.*, 2020; EVANS, 2022).

Na COVID-19, a SRAG é resultado principalmente de uma resposta imunológica do hospedeiro de forma desregulada. Os principais agentes desse processo são as citocinas - principalmente a interleucina 6 (IL-6) - moléculas fundamentais para o estabelecimento da resposta imunológica e atuantes na sinalização bioquímica da imunidade. Ao que parece, em alguns indivíduos infectados, o *SARS-CoV-2* é capaz de provocar a liberação exacerbada dessas moléculas, ampliando exageradamente a resposta do hospedeiro ao vírus e causando lesão tecidual grave nos pulmões. Esse fenômeno foi denominado de tempestade de citocinas (PRICE *et al.*, 2020; GUSTINE; JONES, 2021).

As coinfeções por patógenos oportunistas podem provocar um aumento substancial na mortalidade de pacientes com COVID-19. No manejo de pacientes hospitalizados, principalmente em Unidade de Tratamento Intensivo (UTI), a incidência de infecções secundárias é uma preocupação. Esses indivíduos são mais vulneráveis a coinfeções por fungos e bactérias de origem nosocomial devido à exposição prolongada ao ambiente hospitalar, ao comprometimento imunológico em decorrência da infecção por *SARS-CoV-2* e do tratamento farmacológico. Pacientes críticos possuem maiores chances de evoluírem para quadros de sepse e choque séptico. Esse risco é ainda maior em indivíduos portadores de comorbidades como diabetes, hipertensão e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (DE BRUYN *et al.*, 2022; PANDEY *et al.*, 2022).

Embora a COVID-19 seja frequentemente indicada como uma doença pulmonar, atualmente, sabe-se que outros órgãos podem ser comprometidos pela infecção. Consideráveis estudos demonstram que na doença grave há ocorrência de danos sistêmicos ao organismo do hospedeiro, com o acometimento de órgãos como coração, rins, fígado, intestinos e cérebro, por exemplo. O *SARS-CoV-2* possui tropismo por tecidos que expressam grande quantidade de *ACE2* e *TMPRSS2*. Tendo em vista a expressão de *ACE2* e *TMPRSS2* em variados compartimentos biológicos, o vírus pode infectar diretamente muitos tecidos, explicando as manifestações extrapulmonares da COVID-19 (DONG *et al.*, 2020; QI *et al.*, 2021).

Eventos tromboembólicos também são comumente relatados na COVID-19 grave. Diversas vezes, pacientes acometidos pela doença desenvolvem trombose venosa profunda (TVP) e/ou tromboembolismo pulmonar (TEP). De fato, a infecção por *SARS-CoV-2* demonstrou-se

fortemente relacionada ao estabelecimento de um estado de hipercoagulação. O exame laboratorial de D-dímero é frequentemente requerido para avaliar o risco de complicações tromboembólicas. Na COVID-19, os níveis desse marcador biológico estão bastante elevados. Alguns estudos demonstraram que pacientes com nível de D-dímero elevados possuem maiores chances de irem a óbito (WICHMANN *et al.*, 2020; POUDEL *et al.*, 2021).

Entre os principais achados laboratoriais que podem ser observados na infecção por SARS-CoV-2, pode-se destacar a redução no número de linfócitos, caracterizando uma linfopenia e o aumento de marcadores inflamatórios, como a proteína C reativa e a taxa de sedimentação de eritrócitos (VHS). Outras alterações importantes incluem a elevação dos níveis de lactato desidrogenase (LDH) e das enzimas hepáticas AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase). Além disso, pode-se observar frequentemente queda no número de plaquetas totais. Essas alterações, somadas a fatores de risco como ser do sexo masculino, possuir idade avançada e comorbidades, estão relacionadas a maior probabilidade de COVID-19 grave (CHEN *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020; MINH *et al.*, 2021).

2.4 Terapia farmacológica na COVID-19

Desde o início da pandemia, uma demanda crescente por um fármaco capaz de evitar o agravamento dos sintomas da COVID-19 ou, ainda, de prevenir a infecção pelo vírus se intensificou. Porém, atualmente, não existe nenhum novo medicamento antiviral específico, e que possa ser administrado por via oral, para tratar a COVID-19 comprovadamente eficaz. Por isso, a forma mais eficiente de evitar o contágio continua a ser a vacinação. Todavia, por meio da estratégia de reposicionamento de fármacos, algumas opções terapêuticas, inclusive anteriormente utilizadas contra outros coronavírus humanos, foram propostas nos últimos dois anos (BARTOLETTI *et al.*, 2022; WEN *et al.*, 2022).

Variadas classes de medicamentos que incluem antibióticos, como a Azitromicina, antiparasitários e antimaláricos, como a Ivermectina e a Hidroxicloroquina (HCQ), além de agentes antivirais, por exemplo o Remdesivir, têm sido investigadas em ensaios clínicos durante a pandemia. No entanto, evidências conflitantes acerca da verdadeira eficácia de muitas dessas moléculas continuam a ser barreiras no estabelecimento de uma intervenção farmacológica abrangente e segura para COVID-19 (WANG *et al.*, 2020; BARTOLETTI *et al.*, 2022).

O manejo de pacientes com COVID-19 possui diferentes recomendações. Aos pacientes com doença branda, no que se refere a administração de medicamentos, há a recomendação do uso de forma sintomática de analgésicos e antipiréticos para dor e febre, respectivamente. Além disso, os sintomas devem ser monitorados, priorizando o repouso e a hidratação. Contudo, em casos mais graves, como na Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), o uso de medicamentos como glicocorticoides e anticoagulantes tem demonstrado ser um importante aliado no tratamento desses pacientes (TOMAZINI *et al.*, 2020; MOUFFAK *et al.*, 2021; WHO, 2022).

A dexametasona, um glicocorticoide, é um exemplo de droga que vem sendo amplamente utilizada na prática clínica para tratar pacientes gravemente afetados pela resposta imune exacerbada ao vírus. A partir de dados do projeto britânico RECOVERY de 2021, que realizou um estudo randomizado multicêntrico em pacientes hospitalizados com COVID-19, foi demonstrado efeito significativo da dexametasona na redução da mortalidade em casos graves sem, contudo, indicações para situações de doença precoce ou leve (ZHAN *et al.*, 2021).

Portanto, ainda que não exista até o momento nenhum medicamento específico contra o SARS-CoV-2, algumas alternativas de fármacos podem ser úteis para o controle de sintomas brandos, além da gestão e prevenção dos quadros graves. Dessa forma, o tratamento da COVID-19 deve ser pensado considerando cada fase, ou ainda, cada forma de apresentação da doença (MOUFFAK *et al.*, 2021).

A fisiopatologia da COVID-19 compreende características que devem ser atentamente observadas durante o manejo dos pacientes e nas intervenções farmacológicas. De modo geral, as classes de medicamentos utilizados e/ou em análise possuem como principal objetivo atuar sobre três estágios que podem estar presentes durante a infecção por SARS-CoV-2: fase de infecção precoce, fase de comprometimento pulmonar e fase de desregulação imunológica. Em suma, há medicamentos direcionados ao controle de sintomas inespecíficos como febre, dor e tosse, medicamentos para impedir a replicação viral e aqueles geralmente indicados para pacientes graves, visando a modulação da resposta imunológica e controle da tempestade de citocinas (MOUFFAK *et al.*, 2021).

O incremento da vacinação em massa certamente modificou o cenário da pandemia, reduzindo drasticamente o número de novas infecções e mortes. Todavia, o declínio na imunidade dos vacinados ao longo dos meses, em um cenário no qual ainda há grande circulação de novas

variantes do *SARS-CoV-2*, capazes de provocar reinfecção, revela a urgência da prospecção de novas moléculas eficazes contra o vírus e aprimoramento da terapêutica na COVID-19 (TREGONING *et al.*, 2021; FEIKIN *et al.*, 2022).

2.5 Reposicionamento de fármacos para COVID-19

Idealmente, a prospecção de um agente farmacológico específico e de administração facilitada seria de grande impacto na recuperação da saúde dos pacientes infectados pelo novo coronavírus. Entretanto, para alcançar esse resultado faz-se necessário a realização de longas etapas de pesquisa científica e alto investimento financeiro, dificultando fortemente o cumprimento dessa demanda emergencial. Por isso, objetivando a agilidade requerida no atual momento, o redirecionamento de medicamentos representa uma alternativa valiosa no combate a pandemia por *SARS-CoV-2* (ANDRESEN; GJERTSEN, 2017; NG; SALIM; CHU, 2021).

Dessa forma, os ensaios laboratoriais e clínicos para testar fármacos anteriormente aprovados para outra finalidade impulsionam a pesquisa científica consideravelmente na esfera da terapêutica para COVID-19. Conforme previamente mencionado, medicamentos pertencentes a diferentes classes estão sendo ou foram em algum momento considerados como potenciais agentes contra o novo coronavírus (WANG *et al.*, 2020; FUJIMOTO *et al.*, 2022).

Nesse contexto, algumas dessas classes de medicamentos são inibidores da Janus quinase (Jakinibs), inibidores do receptor de interleucina 6 (IL-6), antidepressivos (sobretudo os inibidores da recaptação de serotonina), anticorpos monoclonais (Sotrovimab, Imdevimab, Casirivimab e Tocilizumab) e antivirais. Pode-se ainda mencionar fármacos como antiparasitários e os antimaláricos cloroquina (CQ) e hidroxicloroquina (HCQ), que ganharam destaque nos primeiros meses de pandemia (CORTI *et al.*, 2021; BARTOLETTI *et al.*, 2022).

Resultados *in vitro* demonstraram potencial antiviral da CQ contra o *SARS-CoV-2* evidenciando, ainda, efeitos imunomoduladores da HCQ (LIU *et al.*, 2020). Uma associação entre os antimaláricos e o antibiótico azitromicina também passou a ser defendida por alguns estudos (GAUTRET *et al.*, 2020). Tais constatações motivaram o uso *off label* e indiscriminado desses medicamentos por pacientes e profissionais da saúde.

O mesmo cenário se desenvolveu com o antiparasitário Ivermectina logo após pesquisadores revelarem seu enorme potencial antiviral *in vitro* (CALY *et al.*, 2020). Entretanto, com o avanço das pesquisas acerca da eficácia desses fármacos, muitas evidências conflitantes

surgiram. Esse fato gerou ainda mais demanda por investigações e culminou em estudos multicêntricos para avaliação criteriosa desses medicamentos (PAN *et al.*, 2022).

Ao longo dos meses, os dados obtidos foram desfavoráveis ao uso dessas medicações. Assim, ficou evidente a impossibilidade de se extrapolar os resultados antivirais da CQ, HCQ e Ivermectina obtidos *in vitro* para administração em pacientes. Além disso, tanto o uso dos antimaláricos, quanto do antiparasitário revelou-se perigoso em determinadas condições, podendo levar a agravos cardíacos, danos hepáticos e morte. Consequentemente, hoje, o uso dessas medicações é contraindicado por grande parte da comunidade científica e médica, inclusive pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (COCHIN *et al.*, 2022; ROMAN *et al.*, 2022).

A resposta imune disfuncional é uma característica da COVID-19, sendo fator determinante no agravamento do estado de saúde dos pacientes e desfecho fatal (TAY *et al.*, 2020). Nesse contexto, a modulação da resposta imunológica ao vírus se configura como essencial para a recuperação dos doentes. Fármacos que possuem atuação conhecida na inibição do sistema imunológico também se tornaram objeto de investigação na busca por uma terapêutica eficaz na infecção por SARS-CoV-2. A dexametasona pode ser considerada o fármaco melhor aceito atualmente nessa esfera. Seu uso é recomendado pela OMS em casos de SRAG por COVID (MAYENCE *et al.*, 2019; ZHAN *et al.*, 2021; OMS, 2022).

As citocinas são moléculas protagonistas durante a resposta imune. Elas são responsáveis por impulsioná-la e possuem papel conhecido em doenças autoimunes. Na COVID-19, estão relacionadas a tempestade de citocinas e dano tecidual quando produzidas em excesso (TAY *et al.*, 2020). Desse modo, fármacos capazes de modular o mecanismo de ação das citocinas, como os inibidores do receptor de interleucina 6 (IL-6) – citocina importante na resposta ao vírus SARS-CoV-2 – e os Jakinibs (SCHWARTZ *et al.*, 2017), têm se demonstrado úteis no tratamento dos pacientes. Atualmente, a OMS recomenda o uso apenas do anticorpo monoclonal Tocilizumab – bloqueador do receptor de IL-6 – e do Baricininib (Jakinib) (MARCONI *et al.*, 2021; OMS, 2022).

Alguns dos fármacos e moléculas atualmente testados para COVID-19, principalmente antivirais e anticorpos monoclonais, possuem histórico de terem sido investigadas e consideradas para o tratamento de outros vírus, incluindo o vírus causador do Ebola e o coronavírus SARS-CoV (TCHESNOKOV *et al.*, 2019). São exemplos de alguns fármacos adotados durante as pandemias por SARS-CoV e MERS-CoV os antivirais Lopinavir, Ritonavir além de alguns interferons. É

importante ressaltar, no entanto, que grande parte desses agentes não se comprovaram verdadeiramente eficazes (DE WIT *et al.*, 2016).

O Remdesivir, um análogo do nucleotídeo adenosina trifosfato (ATP), trata-se de um pró-fármaco inibidor da enzima transcriptase reversa. Dessa forma, possui ação ampla contra diferentes retrovírus. Seu potencial antiviral foi anteriormente testado para o vírus da hepatite C (HCV) – sem sucesso – e, também, utilizado contra o vírus do Ebola (EBV). Ademais, evidências da sua ação na inibição de outros coronavírus humanos (HCovs) fortaleceram a hipótese do Remdesivir como opção terapêutica na COVID-19 (TIMOTHY P *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2020).

Ainda em 2020, Wang e colaboradores conduziram um ensaio clínico randomizado testando o tratamento com Remdesivir em pacientes com COVID-19. Estatisticamente, seus resultados demonstraram pouco benefício clínico no uso do medicamento. No entanto, foi observada uma redução entre o tempo de recuperação do grupo controle e tratado, apontando ganhos aos pacientes (WANG *et al.*, 2020).

O *Food and Drug Administration* (FDA), nos Estados Unidos da América (EUA), tornou o Remdesivir o primeiro fármaco aprovado para o tratamento da COVID-19. Contudo, seu uso não é recomendado pela OMS, pois possui controvérsias acerca do real benefício aos pacientes. Apesar disso, a administração do antiviral se estendeu para outras localidades do mundo, tendo sido recentemente aprovada no Brasil pela Anvisa. Entretanto, ainda há ausência de medidas farmacológicas concretamente eficazes e permanente incidência de infecções. (PAN e al., 2022; OMS, 2022).

Em 22 de dezembro de 2021, o FDA também autorizou o uso emergencial de um tratamento para COVID-19 desenvolvido pela empresa farmacêutica Pfizer, o Paxlovid. Sua composição é resultado da combinação de dois antivirais, o Nirmatrelvir e o Ritonavir. Esse medicamento possui como uma vantagem a administração por via oral, possibilitando fácil distribuição em farmácias comunitárias e dispensando a necessidade de quaisquer equipamentos médicos, por exemplo seringas. Além disso, conforme os dados divulgados pela empresa americana, o Paxlovid foi capaz de reduzir em até 89% o risco de morte e necessidade de hospitalização em pacientes com risco de doença grave (MAHASE *et al.*, 2021; DAL-RÉ *et al.*, 2022).

Indiscutivelmente, a gigantesca proporção tomada pela pandemia do SARS-CoV-2 representou e ainda representa enorme desafio para as autoridades sanitárias de todo o mundo. Vale

ressaltar, contudo, que a extensão dos danos causados pela disseminação do vírus reverberou com ainda mais potência sobre as localidades mais vulneráveis economicamente. Considerando esse fato, é possível inferir que a distribuição global de novos tratamentos pode encontrar como principal barreira fatores sociais, resultando na dificuldade do acesso para países mais pobres. Esse problema tem sido relatado na distribuição de Paxlovid, por exemplo (CARDOSO *et al.*, 2020; ROCHA *et al.*, 2021).

Outra questão diz respeito a fisiopatologia da COVID-19, que pode assumir uma variedade de sinais e sintomas e é caracterizada por apresentar fases que requerem tratamento diferenciado. Por isso, a maioria das opções terapêuticas disponíveis possuem recomendação condicional da OMS, além de algumas terem controvérsias preocupantes acerca de sua eficácia. Dessa forma, a lacuna causada pela falta de um tratamento específico e eficaz permanece aberta. Portanto, a prospecção de novas alternativas farmacológicas, visando, inclusive outras vias envolvidas na doença, pode ser uma possibilidade de encontrar moléculas mais específicas para cada fase da doença e/ou de produção mais barata (MOUFFAK *et al.*, 2021; PAN *et al.*, 2022; OMS, 2022).

Posto isso, uma possibilidade de intervenção farmacológica na COVID-19 é o bloqueio da serino-protease TMPRSS2. Até então, seu papel fisiológico parece ser dispensável para os organismos. Modelos experimentais demonstraram não haver danos na ausência de TMPRSS2. Nesse contexto, o mesilato de nafamostatato (nome comercial: Fusan), medicamento usado para tratar a pancreatite aguda, pode bloquear a protease TMPRSS2. Esse fármaco pode impedir o processo de entrada viral utilizado pelo *SARS-CoV-2* para infectar células e causar a COVID-19, mostrando que esta protease é um potencial alvo farmacológico para uma possível terapia antiviral (HOFFMAN *et al.*, 2020).

2.6 Susceptibilidade genética do hospedeiro à COVID-19

O genoma humano possui similaridade superior a 99,9% entre os indivíduos. Todavia, cerca de 0,1% desse genoma apresenta variações que podem ser denominadas de mutação, quando possuem uma frequência rara, ou polimorfismos, quando apresentam uma frequência alélica igual ou superior a 1% na população. A identificação de variações genéticas interindividuais é uma ferramenta importante para compreensão do papel funcional de genes humanos. Além disso, esses dados podem fornecer informações acerca do componente genético de uma variedade de doenças (LEVY *et al.*, 2007; MCCLELLAN *et al.*, 2010).

Os polimorfismos genéticos representam importante fonte de variabilidade de características presentes nas mais diversas formas de vida. No passado, acreditava-se que a presença desse tipo de variação genética não possuía impacto negativo sobre a saúde dos indivíduos. No entanto, hoje, muitos estudos apontam a associação de polimorfismos genéticos com o surgimento e/ou agravamento de doenças, tornando-os importantes marcadores moleculares de patologias como neoplasias e disfunções imunológicas (MCCLELLAN *et al.*, 2010; NIKIC *et al.*, 2023).

As variantes genéticas humanas são alvo de estudo de áreas diversas, dentre elas, pode-se destacar a farmacogenômica e a farmacogenética, responsáveis por, em linhas gerais, estudarem o impacto da variabilidade genética populacional e individual na resposta aos fármacos. Essa resposta diferencial oriunda da presença ou ausência de determinada variante genética, também, está implicada na resistência ou suscetibilidade a doenças. Em seres humanos, os polimorfismos podem induzir o estabelecimento de cenários biológicos diferenciados na resposta a infecções por microrganismos. Assim, alguns indivíduos podem ser mais resistentes a determinadas patologias, enquanto outros apresentam maior suscetibilidade (ELHABYAN *et al.*, 2020; CASTAÑO-AMORES *et al.*, 2021).

Em março de 2020, a Itália se tornou o epicentro da pandemia e o número de mortes pela doença aumentou rapidamente. Inicialmente, conforme previsto pelos quadros anteriormente testados, compreensivelmente associada a esse fato (YUAN *et al.*, 2020; CAIMMI *et al.*, 2021).

Contudo, foram observadas diferenças na frequência alélica entre asiáticos e italianos, revelando que níveis de expressão mais altos do gene *TMPRSS2* são mais frequentes na população italiana do que na população do leste asiático, o que provavelmente facilita a entrada do *SARS-CoV-2* na célula do hospedeiro e pode influenciar no prognóstico dos pacientes. De maneira similar, polimorfismos do gene da *ACE2* são responsáveis pelo aumento da expressão dessa proteína. Além disso, algumas variantes polimórficas de *ACE2* têm sido associadas ao aumento de afinidade entre o receptor humano e o domínio RBD da proteína de superfície do *SARS-CoV-2*, elevando as chances de infecção (ASSELTA *et al.*, 2020; CALCAGNILE *et al.*, 2021).

2.6.1 Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2)

A ECA2 (Enzima conversora de Angiotensina 2) é uma versão homóloga da ECA (Enzima conversora de Angiotensina) e, em 2003, foi apontada como receptor para o *SARS-CoV*. Não

surpreendentemente, considerando seu histórico com outros HCoV's, ela também atua como receptor para o novo coronavírus *SARS-CoV-2*. Em virtude disso, a ECA2 se estabeleceu como potencial alvo farmacológico no tratamento da COVID-19. Ademais, achados de estudos pregressos e recentes sugerem variantes do gene que origina essa enzima, sobretudo oriundas de SNPs, como relevantes na patogênese da doença por coronavírus. (LI *et al.*, 2003; HOFFMANN *et al.*, 2020; REN *et al.*, 2022).

Sabidamente, a ECA2 atua como receptor para outros coronavírus como o *SARS-CoV* (LI *et al.*, 2003). No entanto, sua afinidade ao *SARS-CoV-2* se demonstrou ainda mais forte, indicando maior eficiência na entrada viral (SHANG *et al.*, 2020; WRAPP *et al.*, 2020). O domínio de ligação ao receptor (RBD) do novo coronavírus, de acordo com dados de Yan e colaboradores (2020), apresenta algumas variações de aminoácidos capazes de, por exemplo, fortalecer a interação com a proteína humana. Além disso, em decorrência da pressão seletiva criada pela ampla disseminação da doença, novas variantes virais aprimoraram a interação do RBD do vírus com a ECA2. Lupala e colaboradores (2022) demonstraram que a variante ômicron foi capaz de aumentar em cerca de 10 vezes essa interação quando comparada à cepa original.

O gene da *ACE2*, que dá origem a ECA2, está localizado no cromossomo X (Xp22.2) e apresenta um caráter altamente polimórfico. Essa característica genética compreensivelmente estimulou muitos estudos acerca do seu papel em variadas patologias. Na COVID-19 grave, desordens cardíacas e renais podem acometer os pacientes, evidenciando importante papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) – no qual atua a ECA2 - na patogênese da doença por coronavírus. Considerando a ampla expressão do gene *ACE2* no organismo humano, seu envolvimento em desordens sistêmicas na COVID-19 tem sido comumente relatado (ZOU *et al.*, 2020; GUPTA *et al.*, 2020).

No SRAA, a ECA2 converte a angiotensina 2 (Ang II), originada a partir de ação da ECA sobre a angiotensina 1 (Ang I), no peptídeo angiotensina 1-7 (Ang I-VII). Ang II é responsável por desencadear efeitos vasoconstritores e proliferativos, associados ao estabelecimento de hipertensão arterial sistêmica (HAS) e fibrose tecidual. Todavia, a Ang I-VII possui efeitos opostos, fundamentais para manter a homeostase e prevenir lesões celulares (PAUL *et al.*, 2006; GHEBLAWI *et al.*, 2020).

Imai e colaboradores (2005) realizaram um experimento com modelos murinos a fim de investigar se a expressão aumentada de *ACE2* influenciava a infecção por *SARS-CoV*. Seus resultados revelaram papel crítico dessa enzima na redução dos danos pulmonares causados pela doença. Conforme os dados descritos, o grupo tratado com uma versão recombinante do gene teve os sintomas pulmonares atenuados. Ademais, variantes genéticas que aumentam a expressão de *ACE2* já haviam sido apontadas como potencialmente protetoras para doenças cardíacas.

Comprovadamente, *ECA2* é fundamental para invasão celular pelo *SARS-CoV-2*. Entretanto, variantes de alta expressão de seu gene originário podem resultar em efeitos menos previsíveis. Paradoxalmente, indivíduos portadores de polimorfismos que elevam a presença do receptor viral, favorecendo o processo infeccioso, possuem menor susceptibilidade ao agravo da doença. Esse fenômeno é possivelmente explicado pela depleção dos receptores do tipo *ECA2* na superfície celular. Na infecção, eles são englobados por endocitose e posteriormente degradados por mecanismos proteolíticos. Dessa forma, há comprometimento da via de clivagem da Ang II em Ang I-VII e, conseqüentemente, aumento da lesão tecidual e agravos da doença GHEBLAWI *et al.*, 2020; HOFFMANN *et al.*, 2020).

Atualmente, existe grande número de estudos buscando elucidar o impacto dos polimorfismos do gene *ACE2* na infecção pelo novo coronavírus. Porém, há muitas controvérsias em relação aos resultados observados. O SNP rs35803318 apresenta maior frequência na população italiana em relação a populações do continente africano e do Sul da Ásia (STRAFELLA *et al.*, 2020). Tendo em vista o elevado número de mortes observados no país europeu nos primeiros meses de pandemia, essa variante pode estar relacionada a heterogeneidade de quadros clínicos observados na COVID-19 (ASSELTA e colaboradores (2020; REN *et al.*, 2022).

2.6.2 Serino-protease Transmembranar tipo II (TMPRSS2)

A TMPRSS2 é produzida a partir de gene homônimo, localizado no cromossomo 21q22.3. Ela faz parte de uma família de serina-proteases tipo 2 denominada TTSP, do inglês: *type II transmembrane serine proteases (TTSPs)*, composta por outros 16 membros em humanos. A maioria das proteínas presentes nessa família desempenham papéis bioquímicos cruciais para a manutenção da homeostase. Entretanto, algumas delas, incluindo a TMPRSS2, estão relacionados ao estabelecimento de patologias como neoplasias malignas e infecções virais sem, contudo, terem

seus papéis fisiológicos esclarecidos (BUGGE; ANTALIS; WU, 2009; BERTRAM *et al.*, 2010; LUCAS *et al.*, 2014).

Primeiramente, entre as características mais relevantes do gene *TMPRSS2* está sua ampla expressão tecidual. A proteína produzida por esse gene apresenta uma porção transmembranar responsável por mantê-la acoplada às superfícies epiteliais. Por isso, a presença da *TMPRSS2* pode ser observada nas células dos epitélios, sobretudo na próstata. Todavia, estudos científicos bem aceitos demonstram que essa serina-protease está distribuída em múltiplos órgãos, dentre eles os intestinos, coração e pulmões (LIN *et al.*, 1999; BERTRAM *et al.*, 2012; DONG *et al.*, 2020).

Anos após a serina-protease transmembranar tipo 2 (*TMPRSS2*) ter sido apontada como agente facilitador de infecções virais em humanos, seu papel voltou a ser objeto de estudos científicos. Isso porque, assim como os HCoV's *SARS-CoV*, *MERS-CoV*, o *SARS-CoV-2* utiliza essa mesma protease para clivar suas proteínas de superfície (proteínas S) e a proteína humana *ACE2*, processo crucial para entrada do virion na célula hospedeira (HEURICH *et al.*, 2014; HOFFMANN *et al.*, 2020).

Tal similaridade no ciclo infeccioso dos coronavírus, somada a evidências recentes sugerindo efeito antiviral a partir do bloqueio dessa protease, reforçam a *TMPRSS2* como potencial alvo farmacológico na infecção por *SARS-CoV-2*. Ademais, outra característica importante do gene *TMPRSS2* é o seu alto grau polimórfico. Assim, a identificação de variantes genéticas desse gene, capazes de afetar a resposta interindividual aos coronavírus, também se tornou relevante. (GLOWACKA *et al.*, 2011; HOFFMANN *et al.*, 2020).

Após a pandemia por H1N1 e H7N9, causada por vírus que também utilizam a *TMPRSS2* em seu processo infeccioso, pesquisadores reportaram os polimorfismos rs2070788 e rs383510 – responsáveis pela superexpressão dessa protease em humanos – como capazes de gerar vulnerabilidade ao hospedeiro na infecção por gripe A. Esse achado contribuiu para a elaboração da hipótese de que variantes do mesmo gene seriam as responsáveis pelos diferentes fenótipos observados na COVID-19 (GLOWACKA *et al.*, 2011; CHENG *et al.*, 2015).

Conforme mencionado, o gene *TMPRSS2* está expresso em diferentes compartimentos biológicos. Por isso, a prevalência de variantes potencialmente capazes de gerar uma atividade interindividual distinta do gene, elevando sua expressão por exemplo, possuem potencial de desencadear danos sistêmicos aos organismos infectados. Desse modo, a ocorrência de desordens

extrapulmonares, incluindo complicações neurológicas, cardíacas, gastrointestinais e renais pode estar relacionada, também, a expressão desregulada de *TMPRSS2* nesses tecidos, favorecendo a infecção órgão-específica por *SARS-CoV-2* (DONG *et al.*, 2020).

Ainda nos primeiros meses de pandemia, Asselta e colaboradores (2020) conduziram um estudo no qual analisaram os níveis de expressão e variantes dos genes *ACE2* e *TMPRSS2* na população italiana. Como resultado, seus dados demonstraram maior ocorrência de um haplótipo contendo três SNPs (rs2070788, rs9974589, rs7364083), associados à regulação positiva da expressão de *TMPRSS2*, nos pacientes do país europeu quando comparados a indivíduos do leste asiático. O aumento da expressão de *TMPRSS2* está associado à maior taxa de clivagem da proteína *Spike* do coronavírus e de seu receptor (*ECA2*). Desse modo, a prevalência desses polimorfismos pode otimizar o processo de entrada do vírus na célula hospedeira (HOFFMAN *et al.*, 2020).

Anteriormente, alguns experimentos da pesquisa básica já haviam investigado o papel da *TMPRSS2* na infecção por *SARS-CoV* e *MERS-CoV*. Em um estudo utilizando um modelo murino com animais *knockout* para o gene dessa serina-protease, ficou evidenciado menor grau de infecção, redução dos danos pulmonares e menores complicações da doença. Contudo, ainda houve infecção independente de *TMPRSS2*, sendo este fato possivelmente explicado pelo uso de vias proteolíticas redundantes por vírus para completar seu ciclo infeccioso. Entretanto, para o *SARS-CoV*, a principal via de entrada parece ser a via direta não-endossômica, na qual atua a *TMPRSS2*, o que também explica a menor taxa de infecção nos modelos experimentais na ausência da proteína (BERTRAM *et al.*, 2012; BERTRAM *et al.*, 2013; IWATA-YOSHIKAWA *et al.*, 2019).

Desde os primeiros dados reportados por estudos chineses, pacientes mais velhos (>60) e do sexo masculino têm sido a maioria dos doentes e mais propícios a desfechos desfavoráveis (ZHANG *et al.*, 2020). Para explicar esse fenômeno, pesquisadores sugeriram novamente o papel do gene *TMPRSS2*. Enquanto no sexo feminino o estrogênio é capaz de regular negativamente o *ACE2*, nos indivíduos do sexo masculino, a testosterona aumenta a expressão de *TMPRSS2* (LIN *et al.*, 1999; ASSELTA *et al.*, 2020; LAMY *et al.*, 2021). Para além disso, a desregulação na expressão do gene dessa serina-protease pode explicar, inclusive, o porquê da COVID-19 ser mais grave em idosos, é o que sugere o estudo de Schuler e colaboradores (2021) ao evidenciar o aumento da regulação positiva de *TMPRSS2* com o avanço da idade.

Atualmente, a protease TMPRSS2 representa um potencial alvo farmacológico para o tratamento da COVID-19. Embora existam estudos sugerindo sua participação na regulação dos canais de sódio do epitélio pulmonar, seu papel fisiológico ainda é controverso (DONALDSON *et al.*, 2002). Em modelos murinos *knockut* usados por Kim e colaboradores (2006), por exemplo, a ausência de *TMPRSS2* não gerou nenhuma sequela óbvia ou anomalia incompatível com a vida. Em contrapartida, experimentos com células Vero-E6 expressando a TMPRSS2 mostraram alta susceptibilidade celular à infecção pelo *SARS-CoV-2* (MATSUYAMA *et al.*, 2020).

Hoje, existem medicamentos disponíveis para o tratamento de outras condições, como pancreatite, capazes de bloquear a TMPRSS2 e impedir a entrada do *SARS-CoV-2* na célula hospedeira. Contudo, mais pesquisas são necessárias para verificar a eficácia desses fármacos. Ainda assim, a constatação de que a inibição dessa protease possui ação antiviral propicia cenários interessantes para a prospecção de novas moléculas capazes de mimetizar esse efeito. Ademais, detectar variantes desse gene que aumentem ou reduzam sua expressão pode fornecer um importante direcionamento para tratamentos com esses medicamentos (HOFFMAN *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2021).

3 JUSTIFICATIVA

Em março de 2020, uma pandemia de COVID-19, doença provocada pelo coronavírus *SARS-CoV-2*, foi decretada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Rapidamente o número de doentes e mortos aumentou, demandando enormes esforços governamentais para controlar a disseminação do vírus. Hoje, aproximadamente três anos após o decreto inicial da OMS, a vacinação está disponível e a emergência em saúde global terminou. Contudo, variantes do vírus continuam a surgir e a circular entre as diferentes populações mundiais. Possivelmente, a doença por coronavírus se tornará endêmica e, ainda que controlada, não poderá ser negligenciada pelos órgãos de saúde globais, sobretudo quando acomete grupos de risco (BARTOLETTI *et al.*, 2022; WHO, 2023).

Desde o início da pandemia, observou-se a heterogeneidade de quadros clínicos na infecção por *SARS-CoV-2*. A existência de um componente genético nos hospedeiros, capaz de torná-los vulneráveis à doença, tem sido amplamente investigada. Hoje, a partir de iniciativas globais para rastreio de variantes genéticas de susceptibilidade a COVID-19, já existem dados concretos sobre variantes genéticas de susceptibilidade ao novo coronavírus. Nesse contexto, os genes de *ECA2* e *TMPRSS* foram amplamente relatados, devido a existência de variações na frequência alélica entre populações diferentes. Vale ressaltar que ambos os genes exercem função importante na entrada do coronavírus *SARS-CoV-2*, promovendo a ligação do vírus à membrana da célula do hospedeiro. Portanto, polimorfismos em diferentes populações podem influenciar a virulência do agente etiológico e a gravidade da doença (HOFFMANN *et al.*, 2020; CAPPADONA *et al.*, 2023).

Diante do exposto, fica evidente que a caracterização do perfil molecular de pacientes com diferentes apresentações clínicas da COVID-19 é indispensável para a compreensão da importância de fatores genéticos associados aos prognósticos observados na doença. Para além disso, considerando a cenário de miscigenação pelo qual se formou a população brasileira, o que favoreceu o aumento da variabilidade genética, variados padrões de distribuição de alelos podem ocorrer. Portanto, é justificável investigar a distribuição de alelos raros de susceptibilidade à doença grave por *SARS-CoV-2* na população local, possibilitando melhor compreensão do perfil genético nacional e a estratificação de grupos de risco com base em componentes genéticos de susceptibilidade (MYCHALECKYJ *et al.*, 2017; ABRAMOV; BRASS; TASSABEHJI, 2020).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Investigar a influência de polimorfismos específicos dos genes *ACE2* (rs35803318) e *TMPRSS2* (rs2070788) no prognóstico de pacientes não vacinados diagnosticados com a COVID-19 no estado do Ceará.

4.2 Objetivos Específicos

- Auxiliar no diagnóstico molecular de indivíduos com suspeita de infecção por *SARS-CoV-2* por RT- qPCR.
- Determinar a frequência alélica para os polimorfismos rs35803318 (*ACE2*) e rs2070788 (*TMPRSS2*) em indivíduos com diferentes situações clínicas de COVID-19.
- Investigar a existência de correlação entre a distribuição alélica das variantes rs35803318 (*ACE2*) e rs2070788 (*TMPRSS2*) e o prognóstico de pacientes com COVID-19.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Delineamento do estudo

Este trabalho é um estudo transversal de base populacional com objetivo de rastrear em uma coorte de pacientes do Estado do Ceará polimorfismos (variantes) dos genes *ACE2* e *TMPRSS2* associados à COVID-19 para buscar correlações estatísticas entre as variações genéticas investigadas e desfechos desfavoráveis de pacientes doentes. Entre os meses de junho de 2020 a outubro de 2021, 148 pacientes com COVID-19 da cidade de Fortaleza (Ceará) tiveram suas amostras de *swabs* da nasofaringe e sangue periférico coletadas para diagnóstico molecular de *SARS-CoV-2* e para análise molecular de polimorfismos de *ACE2* e *TMPRSS2*, respectivamente. As amostras biológicas utilizadas neste trabalho são oriundas dos hospitais participantes da pesquisa: Instituto Doutor José Frota (IJF) e Hospital São José (HSJ), ambos localizados na cidade de Fortaleza, Ceará. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Farmacogenética (FARMAGEN), no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

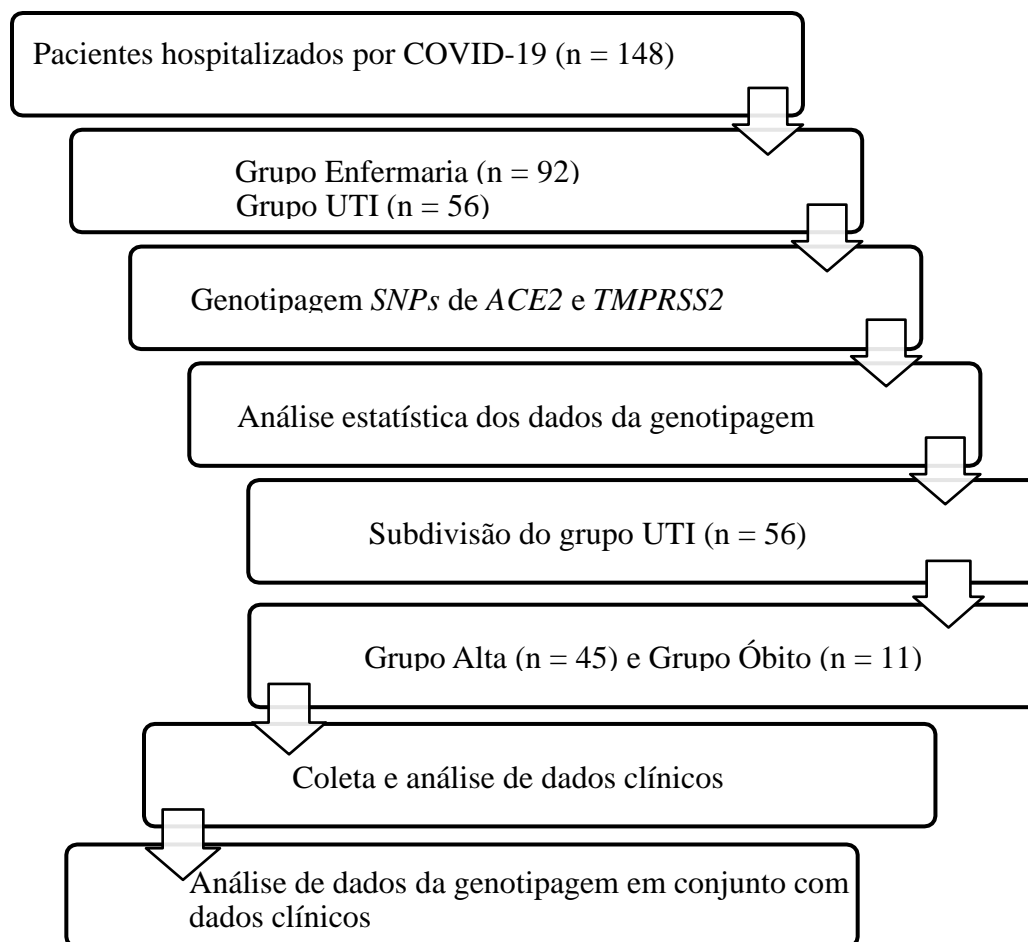
A maior parte dos indivíduos presentes na amostra deste trabalho ($n = 92$) compõem o grupo de pacientes que apresentaram sintomas leves ou não necessitaram de atendimento hospitalar intensivo. Entretanto, 56 desses pacientes precisaram de atendimento na UTI (Unidade de Tratamento Intensivo). Todas as amostras de DNA extraídas a partir de sangue total periférico dos 148 pacientes voluntários foram analisadas por meio de PCR em tempo real para detecção de polimorfismos de *ACE2* e *TMPRSS2*. Posteriormente, as frequências alélicas e genotípicas observadas na coorte estudada foram comparadas a 3.115 amostras de 26 populações diferentes e oriundas dos cinco continentes: África, Américas, Leste Asiático, Europa e Sul da Ásia, extraídas do banco de dados 1000 Genomes Phase 3 (1000G) (www.internationalgenome.org) (Figura 6).

A partir do grupo UTI ($n = 56$) foram criados dois subgrupos de acordo com o desfecho apresentado pelos pacientes: subgrupo de pacientes que receberam alta ($n = 45$) e subgrupo daqueles que foram a óbito ($n = 11$) em decorrência da infecção por *SARS-CoV-2*. Para observar se haviam diferenças significativas entre pacientes que receberam alta e os que foram a óbito na UTI, os subgrupos “Alta” e “Óbito” foram analisados em relação a diferentes variáveis nominais e intervalares: idade, gênero, pressão arterial, frequência cardíaca, frequência respiratória, escala de Glasgow, contagem de leucócitos, contagem de plaquetas, medida de creatinina, ocorrência de

sepsis, necessidade de ventilação mecânica e a Pontuação de Fisiologia Aguda Simplificada ou SAPS 3, do inglês: *Simplified Acute Physiology Score 3* (Figura 6).

A escolha das variáveis analisadas considerou os dados clínicos comparáveis e relevantes em COVID-19 disponíveis para este estudo. Todos os dados clínicos foram coletados a partir dos prontuários dos pacientes do grupo UTI e não estavam disponíveis para o grupo enfermaria (n = 92). Por fim, o grupo UTI também teve os dados da análise molecular analisados em conjunto com os dados clínicos coletados. Essa etapa objetivou encontrar correlações estatisticamente significativas entre a presença dos polimorfismos de *ACE2* e *TMPRSS2* e os desfechos desfavoráveis na COVID-19 (Figura 5).

Figura 5 - Representação esquemática do delineamento do estudo



Fonte: dados da pesquisa

5.2 Aspectos Éticos

A partir do início deste projeto, foram coletados 5mL de sangue periférico de indivíduos diagnosticados com COVID-19 por RT-PCR, do inglês *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, e que aceitaram participar do estudo através do preenchimento do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O TCLE foi fornecido por meio de formulário *online*, conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COMPEPE) da UFC sob parecer de número 4.029.490.

5.3 Coleta de amostras biológicas

As amostras para diagnóstico e análises moleculares foram coletadas no Instituto Doutor José Frota (IJF) e no Hospital São José, na cidade de Fortaleza, Ceará. Primeiramente, foram coletados *swabs* combinados da nasofaringe de pacientes com suspeita de COVID-19. Os *swabs* destinados ao diagnóstico foram prontamente imersos em solução salina a 0,9% em tubos do tipo Falcon com capacidade para 15 ml. Em seguida, o material coletado foi encaminhado ao laboratório de farmacogenética (FARMAGEN) e submetido ao processo de extração de RNA utilizando o kit de extração *QIAamp® Viral RNA (Qiagen, United States)*, conforme as instruções fornecidas pela bula do produto. Posteriormente, as amostras seguiram para o diagnóstico molecular por RT-qPCR, do inglês: *Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction*.

Cerca de 5 ml de sangue total periférico foi coletado de cada um dos pacientes participantes da pesquisa, então, aqueles cuja carga viral de *SARS-CoV-2* estava elevada ($Cq < 25$) foram selecionados para as análises moleculares posteriores. Ademais, para prevenir quaisquer interferências durante a realização da PCR em Tempo Real, que pode ter sua eficiência afetada por muitos fatores referentes a qualidade da amostra, foram adotados os seguintes cuidados: o sangue foi colhido em tubos contendo EDTA como anticoagulante, as amostras foram transportadas e armazenadas em condições de tempo e temperatura adequados. Além disso, amostras de sangue colhidas em heparina, hemolisadas, hiperlipêmicas ou apresentando quaisquer alterações macroscópicas foram prontamente descartadas.

5.4 Detecção de SARS-CoV-2

O Kit *2019-nCoV qPCR Diagnostic Panel dos Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, com primers específicos, foi usado para confirmar a presença de *SARS-CoV-2* em todas as amostras coletadas. As misturas de *primers* (iniciadores) e sondas neste kit comercial têm como alvo duas seções do gene do nucleocapsídeo viral (N1 e N2), bem como o controle endógeno

humano (gene RNase P), que serve como um controle de integridade da amostra. Os pacientes com diagnóstico confirmado para infecção por *SARS-CoV-2* por meio do teste de RT-qPCR e ciclo de quantificação abaixo de 25 (indicando maior carga viral) tiveram sua amostra de sangue periférico selecionada para extração de DNA genômico.

5.5 Processamento de amostras de sangue total e extração de DNA genômico

As amostras biológicas de sangue total recebidas foram imediatamente processadas por meio da técnica de centrifugação pesada. Inicialmente, cada amostra de sangue foi centrifugada durante 5 minutos a 5000 rpm e, de cada uma delas, foi coletado cerca de 200 μ L da interface leucocitária (*buffy coat*), rica em material genético, dando origem a alíquotas que foram armazenadas para extração de DNA genômico.

Foi realizada a extração de DNA utilizando o kit comercial *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit®* (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante. No total, 148 amostras de DNA foram extraídas a partir das alíquotas de *buffy coat* (interface leucocitária) recuperadas de sangue total periférico. Inicialmente, todas as alíquotas de *buffy coat* foram retiradas do armazenamento a -80°C e colocadas sobre a bancada para o descongelamento total.

Em seguida, cada alíquota de *buffy coat*, agora em tubo de microcentrífuga estéril, foi tratada com 20 μ L de RNase A e 20 μ L Proteinase K. Posteriormente, foi adicionado 200 μ L da solução de lise (*PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer*) e cada uma das alíquotas foi colocada em banho-maria a 55°C por 10 minutos. Após essa etapa, a cada tubo contendo amostras já lisadas, foi adicionado etanol absoluto. Todo o conteúdo dos tubos foi homogeneizado em um agitador do tipo vórtex e cerca de 640 μ L da mistura resultante foi transferida para colunas de sílica (colunas de purificação), adsorventes para as moléculas de DNA. O processo de ligação do material genético às colunas foi facilitado por centrifugações alternadas (com média de tempo entre um minuto e três minutos). As etapas de centrifugação são importantes para promover a adsorção do DNA à sílica e, também, para purificação do material extraído a partir da lavagem dos contaminantes presentes na amostra, como proteínas e carboidratos.

As etapas de lavagem corresponderam a duas centrifugações a 10.000 x g. Para isso, foram utilizados os reagentes de *PureLink™ Genomic/Wash Buffer* (tampão de lavagem) 1 e 2, levando um e três minutos respectivamente. Ao final da etapa de centrifugação com as soluções de lavagem, cada uma das colunas foi introduzida em microtubos do tipo *ependorf* de 2 ml e, em seguida,

lavadas com 100 μ L da solução de eluição (*PureLink™ Genomic/Elution Buffer*). Após serem incubadas por um minuto em temperatura ambiente (25°C), as colunas correspondentes a cada uma das amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 x g durante um minuto e meio. Terminada a centrifugação, o DNA purificado foi obtido e encaminhado para etapa de quantificação.

As amostras de DNA extraídas foram quantificadas utilizando um equipamento do tipo espectrofotômetro (*NanoDrop Lite da Thermo Scientific™*). Além da quantificação do material genético, foi observada durante a análise por espectrofotometria a pureza das amostras a partir da medição das razões 260/280 e 260/230. Conforme os critérios de pureza e quantificação indicados pelo *software* do equipamento, as amostras que apresentaram rendimento desejável (>20 ng/ μ L de DNA) e razões 260/280 e 260/230 próximas de 1.8 foram armazenadas. No entanto, as de rendimento inferior e/ou com parâmetro de pureza comprometido foram repetidas. Assim, o processo de extração foi realizado novamente para essas amostras a partir de *Buffy Coats* dos mesmos pacientes guardados como *backups*.

Tendo em vista que as amostras de sangue total não foram recebidas conjuntamente, mas em dias distintos, o processo de extração foi repetido de acordo com a demanda de material recebido. Dessa forma, um banco de amostras, composto por DNA extraído, foi montado no Laboratório de Farmacogenética (FARMAGEN), para que em seguida fossem realizadas as análises moleculares. Para evitar qualquer efeito sobre a estabilidade do material genético, todas as amostras foram armazenadas em freezer -80°C, onde permaneceram até a data definida para os experimentos de genotipagem.

5.6 Genotipagem de amostras de DNA

Os genótipos de *TMPRSS2* e *ACE2* foram determinados por PCR em tempo real (qPCR) utilizando o sistema de discriminação alélica *TaqMan®* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA). Para isso, foram utilizados *primers* e sondas de hidrólise *TaqMan®* de acordo com as sequências disponibilizadas pelo fabricante (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequências contexto de primers e sondas TaqMan® utilizadas

Gene	ID SNP	Sequência contexto (VIC/FAM)	ID Ensaio
ACE2	rs35803318	CAATGCCAACCACTATCACTCCCATC/TACAACTCCAAAA ACAATCAGCCATA	C__25637809_10
TMPRSS2	rs2070788	GATTGTTGTCTGTATGGCCTAGAC(A/G)CTTTGAGAAGG ATATAACAATAT	C__2592038_1_

Foram utilizadas microplacas ópticas do tipo *MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate* (*Applied Biosystems®*) como suporte para as amostras a serem analisadas. Dessa forma, o planejamento da reação levou em consideração o uso de placas com 96 poços cada. Assim, inicialmente foi realizado um desenho com o gabarito da placa de PCR em papel para posterior reprodução no experimento (Figura 6). Ao equipamento de PCR em Tempo Real *Quantstudio 5* (*Applied Biosystems®*) foram adicionadas as informações de identificação dos pacientes (enumerados em ordem crescente) e a distribuição de cada uma das amostras ocorreu conforme o gabarito da placa de PCR pré-pronto.

No total, quatro placas de PCR foram preparadas, sendo duas delas para a genotipagem do polimorfismo de *ACE2* e duas para os polimorfismos de *TMPRSS2*. Em cada uma das placas, três poços foram destinados à adição de controle negativo (CN) da reação (Figura 6). Como CN foi utilizada água ultrapura.

Figura 6 - Exemplo de desenho de placa de PCR em Tempo Real

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
B												
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
C												
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
D												
	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
E												
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
F												
	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
G												
	85	86	87	88	89	90	91	92	93	CN	CN	CN
H												

Fonte: elaborada pelo autor.

Ademais, foram mantidas as configurações de ciclagem para reações de genotipagem pré-estabelecidas pelo *software* do equipamento. A coleta de dados de fluorescência realizada pelo equipamento ocorreu durante as fases de pré-amplificação, amplificação e pós-amplificação conforme está descrito na Tabela 2. Os fluoróforos VIC e FAM foram selecionados no equipamento para marcar os nucleotídeos dos alelos selvagens e dos alelos mutantes de cada polimorfismo, respectivamente.

Tabela 2 - Programação utilizada no equipamento de PCR em Tempo Real

Estágio	Temperatura	Coleta de dados	Tempo
<i>Pre-Read</i>	60°C	sim	30s
<i>Hold</i>	95°C		10 min
	95°C		
PCR	60°C	sim	15s 1min30s
<i>Post-Read</i>	60°C	sim	30s

Fonte: elaborada pelo autor.

Posteriormente, respeitando os protocolos de biossegurança e de boas práticas laboratoriais, iniciou-se as etapas de manipulação das amostras biológicas e progressão da execução dos experimentos. Assim, inicialmente, todas as amostras foram diluídas em água livre de RNases e DNases (enzimas capazes de degradar o material genético), de modo que a concentração de material genético entre cada uma delas fosse igual a 10 nanogramas por microlitro (ng/μL). Essa etapa é importante para homogeneizar o experimento e reduzir possíveis vieses durante a análise por PCR em Tempo Real.

Para o experimento de genotipagem, uma mistura de reação foi preparada. Os seguintes componentes foram utilizados para a preparação dessa mistura: água ultrapura (livre de nucleases), *TaqMan genotyping assay mix* e *TaqMan® Genotyping Master Mix (ThermoFisher®)* (Tabela 3). A quantidade de amostras e controles testados foi determinante para o volume final da mistura. Ademais, uma margem de 10% para mais foi considerada no cálculo do volume de reagentes utilizados devido a possíveis erros de pipetagem.

Tabela 3 - Volume de reagentes para preparo da mistura de reação

Componente	Volume (μL)
<i>TaqMan</i> TM <i>Genotyping Master Mix</i>	5
<i>TaqMan genotyping assay mix</i> (40x)	0,25
Água ultrapura	0,25
TOTAL	5,5

Fonte: elaborada pelo autor.

A mistura de reação foi distribuída, em volume pré-determinado pelo protocolo de genotipagem (Tabela 3), em placas de PCR em Tempo Real. A distribuição foi realizada de acordo com o desenho da placa feito no planejamento inicial do experimento - exemplificado na Figura 1- e transferido ao *software* do termociclador. Todos os poços selecionados receberam o mesmo volume da mistura de genotipagem com o auxílio de uma pipeta monocal. Em seguida, as amostras de DNA genômico extraídas e diluídas a 10 ng/ μL , bem como as amostras de controle negativo (CN), foram igualmente distribuídas nos poços contendo a mistura de reação (Tabela 4).

Tabela 4 - Volume de reagentes para preparo de uma única reação

Componente	Volume (μL)
Mistura de Reação	5,5
Amostra de DNA/ Controle Negativo	4,5
TOTAL	10

Fonte: elaborada pelo autor.

As placas contendo todos os reagentes já misturados foram vedadas com selo óptico do tipo *MicroAmp*TM *Optical Adhesive Film* (*Applied Biosystems*®), brevemente centrifugadas e colocadas no equipamento de PCR em tempo real (qPCR) *QuantStudio 5* (*Applied Biosystems*®), no qual toda análise foi realizada.

5.7 Expressão de *locus* de características quantitativas (eQTL)

Foi utilizada a ferramenta *Genotype-Tissue Expression v7* (GTEx) para explorar dados publicamente acessíveis para análise de *loci* de características quantitativas de expressão (eQTL, do inglês, *Expression quantitative trait loci*), a fim de se entender mais sobre as funções potenciais de loci fortemente relacionados entre si. O GTEx foi projetado para definir transcriptomas humanos e gerou uma biblioteca de referência de níveis de expressão de genes de tecidos não doentes, incluindo genótipo e expressão do gene.

Os eQTLs multitecidos e os dados de nível de expressão foram obtidos do GTEx Portal V8 (<https://gtexportal.org/home>) com 49 tecidos diferentes de 15.201 amostras. O modo de permutações adaptativas foi usado com a configuração de permutação de 1000 e o limite da taxa de razão de falsas descobertas (FDR, do inglês, *false Discovery*) de $\leq 0,05$ foi aplicado para identificar genes com um eQTL significativo.

5.8 Análise estatística

Os dados foram analisados com o *software* estatístico *GraphPad Prism*, versão 9.4.1 (La Jolla, Califórnia, EUA). Os desvios do desequilíbrio de Hardy-Weinberg (HWD) foram calculados pelo teste de qualidade do ajuste do qui-quadrado (χ^2). As diferenças nas frequências dos alelos de *ACE2* (rs35803318) e *TMPRSS2* (rs2070788) entre grupos populacionais foram avaliadas usando o teste Exato de Fisher. As características clínicas e a associação genotípica foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado e pelo teste de Kruskal-Wallis. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

6 RESULTADOS

6.1 Análise de dados clínicos

No total, 56 indivíduos com COVID-19 grave foram primeiramente analisados por suas características clínicas. Variáveis nominais e intervalares foram selecionadas a partir dos dados disponíveis nos prontuários dos pacientes da UTI. A média e desvio padrão foi calculada para variáveis intervalares e os pacientes foram estratificados em relação as variáveis nominais. Ao todo, 45 pacientes receberam alta da UTI (80,4%), enquanto 11 (19,6%) pacientes foram a óbito. A ocorrência de sepse foi registrada em 33,9% dos pacientes da UTI, enquanto a ventilação mecânica foi necessária para 57,1% dos pacientes internados na UTI (Tabela 5).

Tabela 5 - Dados clínicos pacientes com COVID-19

Variável	Todos os pacientes
Medida de pressão arterial sistólica (PAS) mais baixa - Média (Desvio Padrão)	92,35 (10,08)
Medida de pressão arterial diastólica (PAD) mais baixa - Média (Desvio Padrão)	56,73 (7,22)
Frequência cardíaca mais alta - Média (Desvio Padrão)	117,8 (7,09)
Frequência respiratória mais alta - Média (Desvio Padrão)	30,61 (4,19)
Menor medida na escala de coma de Glasgow (GCS) - Média (Desvio Padrão)	9,61 (3,58)
Contagem mais alta de leucócitos	13,77 (4,02)
Contagem mais baixa de plaquetas	250,7 (71,87)
Maior medida de creatinina	2,48 (6,55)
SAPS3	58,71 (12,13)
Desfecho N (%)	
Alta hospitalar	45 (80,4%)
Óbito	11 (19,6%)
Sepse N (%)	
Sim	19 (33,9%)
Não	37 (66,1%)
Ventilação Mecânica N (%)	
Sim	32 (57,1%)
Não	24 (42,9%)

Fonte: dados da pesquisa.

Houve diferenças significativas entre os grupos alta e óbito nas seguintes variáveis: pressão arterial sistólica, frequência respiratória, escala de Glasgow, SAPS3, ocorrência de sepse e suporte ventilatório mecânico (Tabela 6).

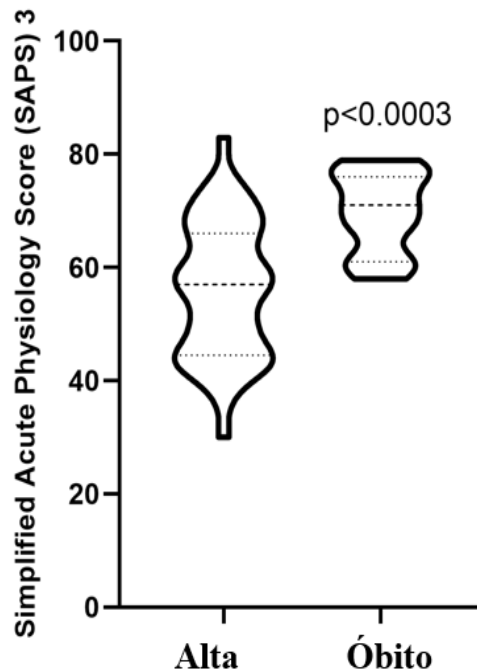
Tabela 6 - Características clínicas dos pacientes positivos para COVID-19 admitidos nas UTIs dos hospitais incluídos neste estudo.

VARIÁVEL	DESFECHO			p-valor
	ALTA	ÓBITO	TODOS	
^a Idade (Média ± Desvio Padrão)	48,7 ± 21,5	60,5 ± 17,1	51 ± 21,10	0,094
^b Gênero (%)				
Masculino	25 (78,1%)	7 (21,9%)	32 (57,1)	0,741
Feminino	20 (83,3%)	4 (16,7%)	24 (42,9)	
^c Medidas clínico-laboratoriais [Mediana (IQR)]				
Medida de pressão arterial sistólica (PAS) mais baixa	90 (10)	89 (2)	90 (3,75)	0,001*
Medida de pressão arterial diastólica (PAD) mais baixa	60 (6)	55 (11)	60 (6)	0,185
Frequência cardíaca mais alta	120 (6)	121 (2)	121 (3)	0,116
Frequência respiratória mais alta	31 (6)	33 (3)	31 (3)	0,001*
Menor medida na escala de coma de Glasgow	8 (6)	8 (3)	8 (6)	0,021*
Contagem mais alta de leucócitos	14 (6)	15 (4,5)	15 (5,75)	0,295
Contagem mais baixa de plaquetas	229,5 (81,8)	231,0 (138,3)	231 (94)	0,602
Maior medida de creatinina	0,90 (0,40)	1,25 (0,97)	0,90 (0,47)	0,150
SAPS3	57 (21,5)	71 (15)	59,5 (20,5)	0,0003*
^b Sepse N (%)				
Sim	12 (63,2%)	7 (36,8%)	19 (33,9%)	0,0325*
Não	33 (89,2%)	4 (10,8%)	37 (66,1%)	
^b Ventilação Mecânica N (%)				
Sim	22 (68,75%)	10 (31,25%)	32 (57,1%)	0,0161*
Não	23 (95,8%)	1 (4,2%)	24 (42,9%)	

^aTeste t de Student, ^bTeste exato de Fisher, ^cTeste de Mann-Whitney. * Indica um nível de significância menor do que 0,05.

Neste trabalho, o poder de predição do SAPS3 foi analisado. Como resultado, verificou-se que, enquanto para o grupo de óbito (Figura 7) a mediana do escore foi igual a 71, para o grupo dos pacientes que receberam alta foi de apenas 57 ($p < 0,0003$).

Figura 7 - Representação gráfica dos dados estatísticos da análise de SAPS3



Fonte: dados da pesquisa.

Por fim, as frequências alélicas e genotípicas dos subgrupos alta e óbito, oriundos do grupo UTI, foram analisados em conjunto com os achados moleculares da genotipagem de SNPS comparada com o objetivo de avaliar diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.

6.2 Genotipagem dos Polimorfismos de *TMPRSS2* e *ACE2*

Foi realizada a análise de genotipagem dos SNPs nos genes *ACE2* e *TMPRSS2* por qPCR. A Tabela 6 mostra a distribuição dos genótipos e frequências alélicas para os polimorfismos humanos rs2070788 (*TMPRSS2*) e rs35803318 (*ACE2*) encontrados.

Para *ACE2* (rs35803318) os resultados encontrados foram de 92,6% para o genótipo CC, 3,4% para o genótipo CT e 4,0% de portadores do genótipo TT, com uma frequência alélica alterada de 5,7% para o alelo T. Para *TMPRSS2* (rs2070788), as frequências genotípicas foram de 22,3%

do genótipo GG, 50,7% do genótipo AG e 27% de portadores do genótipo AA, com uma frequência alterada do alelo A em 52,4%.

Tabela 7 - Distribuição de alelos e genótipos na coorte de pacientes com COVID-19

Genes e SNP - ID	Genótipos	Frequência genotípica (% e n)	Alelos	Frequência de alelos (n e %)
<i>TMPRSS2</i> - rs2070788	GG	22,3% (33)	A	52,4% (155)
	AA	27% (40)		G
	AG	50,7% (75)		
<i>ACE2</i> - rs35803318	CC	92,6% (137)	C	94,3% (279)
	TT	4% (6)		T
	CT	3,4% (5)		

Fonte: dados da pesquisa.

6.3 Comparação de frequências genotípicas e frequências alélicas entre diferentes populações

Os resultados da genotipagem de DNA obtidos foram analisados para este estudo em comparação com 3.115 amostras de 26 populações diferentes concentradas em cinco grupos continentais: África (AFR), Américas (AMR), Leste Asiático (LA), Sul da Ásia (SA) e Europa (EUR). Conforme os dados representados nas Tabelas 8 e 9, as frequências genotípicas e alélicas variaram significativamente entre as populações continentais e a cidade de Fortaleza (FOR), no estado do Ceará, Brasil.

Evidenciou-se que os SNPs presentes nas sequências de *ACE2* e *TMPRSS2* estavam de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) na maioria das populações ($p > 0,05$), exceto para o SNP rs35803318 de *ACE2* na população de Fortaleza ($p < 0,05$) (Tabela 9).

Ao comparar os resultados de frequência alélica obtidos para o polimorfismo do gene *TMPRSS2* (rs2070788) na população da cidade de Fortaleza com as frequências observadas nas populações das Américas, Sul da Ásia e Europa, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Equilíbrio de Hardy-Weinberg e comparação das frequências alélicas do SNP rs35803318 de *TMPRSS2* na população Fortaleza (FOR) e outras populações continentais (AFR, AMR, LA, EUR, SA).

<i>TMPRSS2</i> (rs2070788)	Frequência genotípica (N)			EHW χ^2	Frequência alélica (N) p -valor	Teste exato de Fisher#		
	GG	AA	AG			G	A	p -valor
TODOS	0,166 (416)	0,373 (933)	0,461 (1155)	3,317	>0,05	0,397 (1987)	0,603 (3021)	0,0072*
AFR	0,070 (46)	0,522 (345)	0,408 (270)	0,486	>0,05	0,274 (362)	0,726 (960)	<0,0001*
AMR	0,245 (85)	0,256 (89)	0,499 (173)	0,003	>0,05	0,494 (343)	0,506 (351)	0,6272
LA	0,123 (62)	0,411 (207)	0,466 (235)	0,140	>0,05	0,356 (359)	0,644 (649)	0,0002*
SA	0,227 (111)	0,294 (144)	0,479 (234)	0,728	>0,05	0,466 (456)	0,534 (522)	0,7904
EUR	0,223 (112)	0,294 (148)	0,483 (243)	0,418	>0,05	0,464 (467)	0,536 (539)	0,7405
FOR (CE)	0,223 (33)	0,270 (40)	0,507 (75)	0,037	>0,05	0,476 (141)	0,524 (155)	-

Legenda: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para variantes genéticas selecionadas; χ^2 : Qui-quadrado; Todos: todos os continentes; AFR: África; AMR: Américas; LA: Leste asiático; SA: Sul asiático; EUR: Europa; FOR(CE): Fortaleza-Ceará. #Comparação de frequências entre Fortaleza (CE) e outros continentes. * Indica um nível de significância menor do que 0,05. Fonte: *1000 Genomes Project Phase 3*.

Comparando as frequências alélicas do polimorfismo *ACE2* (rs35803318), não foram observadas diferenças apenas entre Fortaleza (CE) e Américas ou Europa ($p > 0,05$). Por outro lado, a análise de comparação mostrou que a população de Fortaleza apresentou frequências distintas de populações africanas e do leste asiático ($p < 0,05$) (Tabela 9).

Tabela 9 - Equilíbrio de Hardy-Weinberg e comparação das frequências alélicas do SNP rs35803318 de *ACE2* na população Fortaleza (FOR) e outras populações continentais (AFR, AMR, LA, SA, EUR).

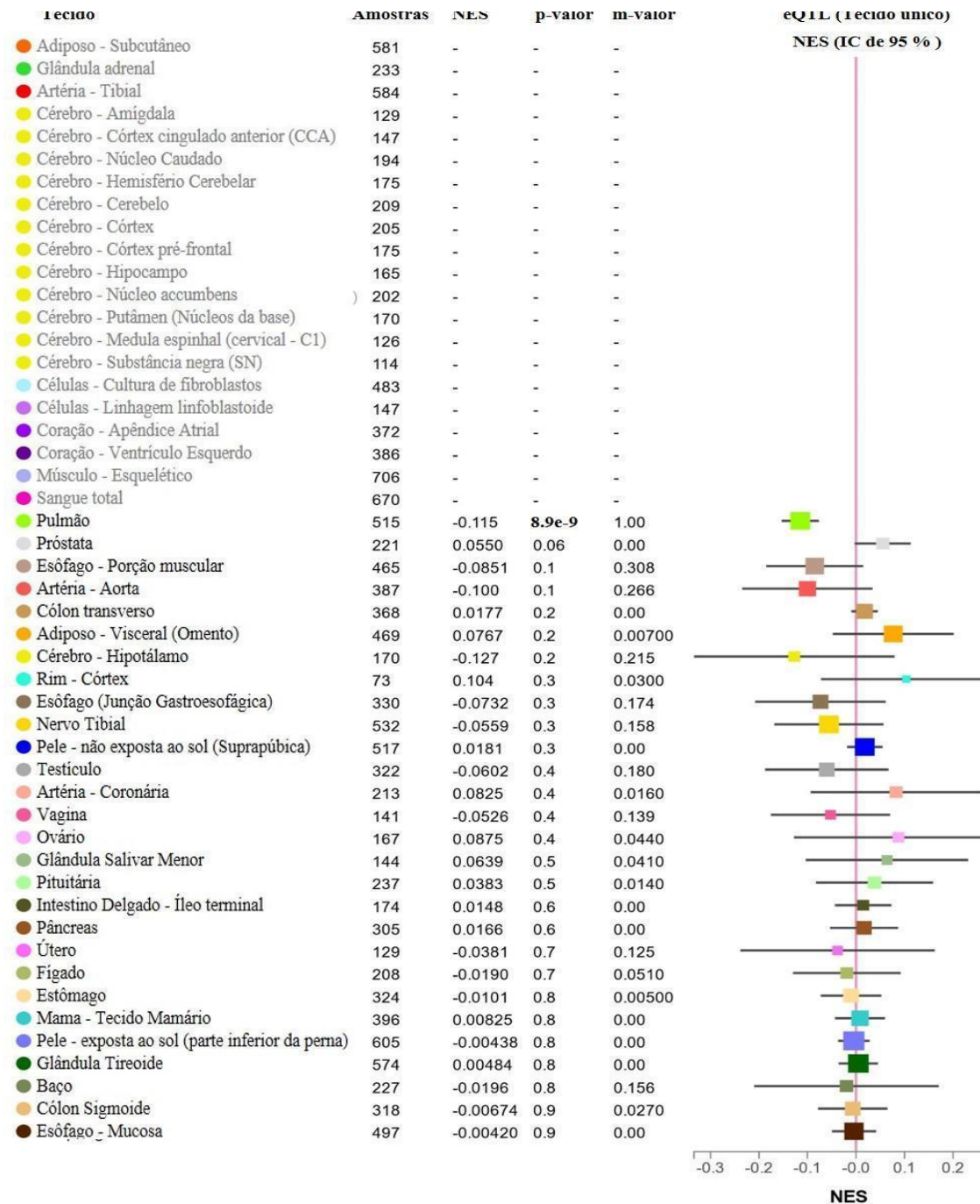
<i>ACE2</i> (rs35803318)	Frequência genotípica			HWE		Frequência alélica		Teste exato de Fisher#
	CC	TT	CT	χ^2	<i>p</i> -valor	C	T	<i>p</i> -valor
TODOS	0,486 (1218)	0,00039 (1)	0,021 (52)	0,347	>0,05	0,979 (3696)	0,021 (79)	0,0004*
AFR	0,516 (341)	0	0,002 (1)	0,151	>0,05	0,999 (1002)	0,001 (1)	<0,0001*
AMR	0,447 (155)	0	0,063 (22)	1,001	>0,05	0,929 (487)	0,071 (37)	0,5581
LA	0,516 (260)	0	0	0,000	>0,05	1,000 (764)	0	<0,0001*
SA	0,468 (229)	0	0	0,000	>0,05	1,000 (718)	0	<0,0001*
EUR	0,463 (233)	0,002 (1)	0,058 (29)	0,261	>0,05	0,946 (725)	0,054 (41)	0,7656
BRASIL	0,926 (137)	0,040 (6)	0,034 (5)	71,182	<0,05*	0,943 (279)	0,057 (17)	-

Legenda: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para variantes genéticas selecionadas; χ^2 : Qui-quadrado; Todos: todos os continentes; AFR: África; AMR: Américas; LA: Leste asiático; SA: Sul asiático; EUR: Europa; FOR(CE): Fortaleza-Ceará. #Comparação de frequências entre Fortaleza (CE) e outros continentes. * Indica um nível de significância menor do que 0,05. Fonte: *1000 Genomes Project Phase 3*

6.4 Análise de Expressão de *locus* de características quantitativas

Os perfis de eQTL de *TMPRSS2* e *ACE2* foram analisados usando o banco de dados GTEx (do inglês: *Genotype-Tissue Expression*). Como resultado, apenas um eQTL associado à expressão do SNP rs2070788 de *TMPRSS2* foi encontrado e está localizado no tecido pulmonar ($p = 8,9 \times 10^{-9}$) (Figura 8).

Figura 8 - eQTLs associados ao polimorfismo rs2070788 (*TMPRSS2*) em diferentes tecidos

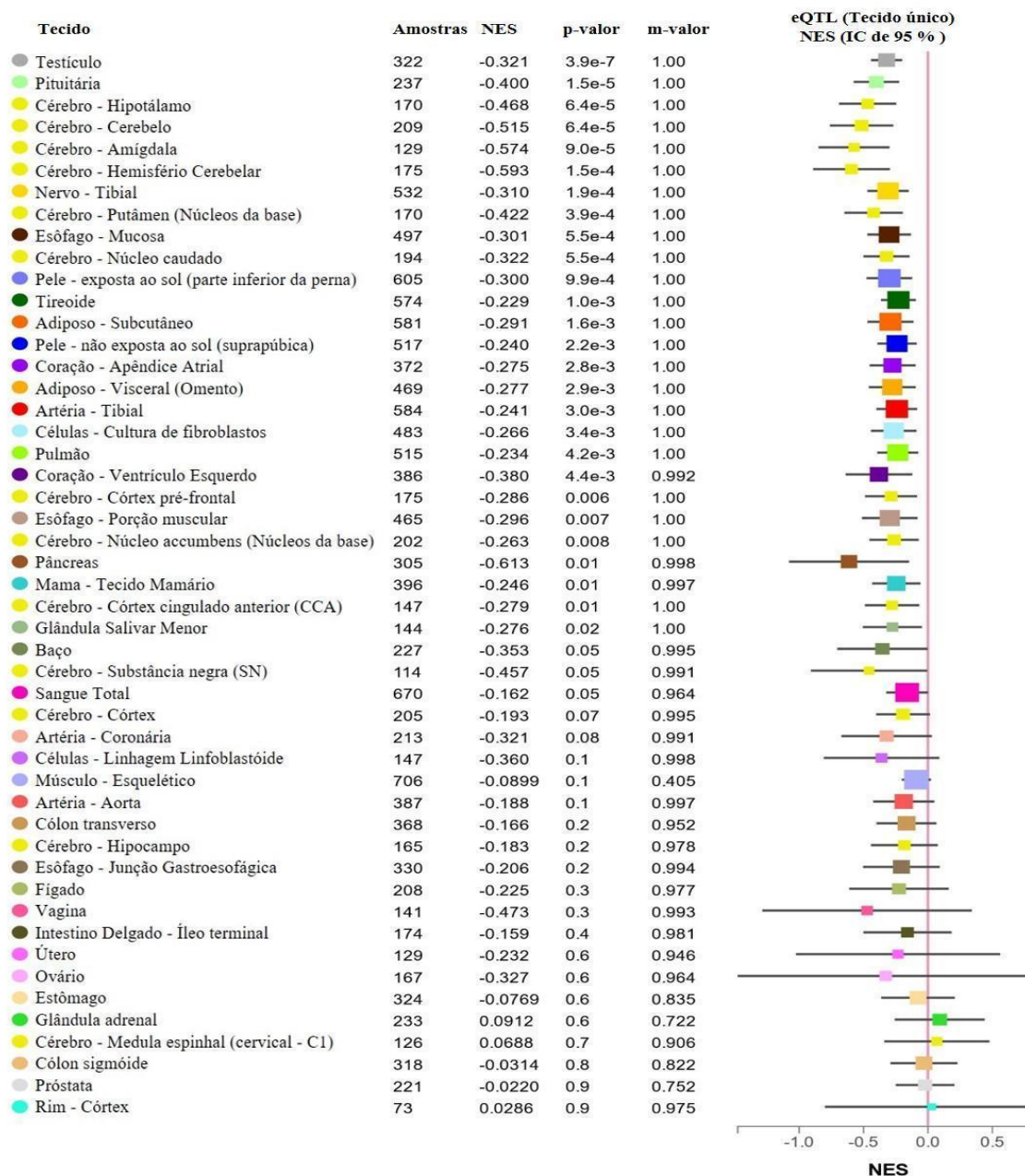


Fonte: dados analisados do banco de dados Gtex. Disponível em: <https://gtexportal.org/home/>.

Legenda: valores significativos de tamanho de efeito normalizado (NES) foram assumidos com $p < 0,05$.

Curiosamente, havia 28 tecidos específicos associados ao SNP rs35803318 de *ACE2* e a expressão do gene *PIR* foi a alteração mais significativa observada, inclusive no testículo (NES = -0,321, $p = 3,9 \times 10^{-7}$), bem como esôfago, pele, coração, pulmão e hipófise (Figura 9). Além disso, vários tecidos do sistema nervoso (hipotálamo, cerebelo, amígdala, nervo tibial) apresentaram eQTL significativo com tamanho de efeito normalizado negativo (NES < -0,310, $p < 3,9 \times 10^{-4}$).

Figura 9 - eQTLs associados ao polimorfismo rs35803318 (*ACE2*) em diferentes tecidos



Fonte: dados analisados do banco de dados Gtex. Disponível em: <https://gtexportal.org/home/>.

Legenda: valores significativos de tamanho de efeito normalizado (NES) foram assumidos com $p < 0,05$.

6.5 Análise conjunta entre dados clínicos e de genotipagem dos pacientes da UTI.

Foi realizada uma análise estatística da frequência de genótipos e alelos dos SNPs investigados através do teste do qui-quadrado ($p < 0,05$), considerando as variáveis clínicas dos pacientes do grupo UTI (subgrupo “alta” e “óbito”). As Tabelas 10 e 11 mostram a associação dos SNPs rs2070788 (*TMPRSS2*) e rs35803318 (*ACE2*) com variáveis categóricas como desfecho, ocorrência de sepse e necessidade de ventilação mecânica.

Tabela 10 - Associação das características clínicas com genótipo e distribuição alélica do polimorfismo rs2070788 (*TMPRSS2*)

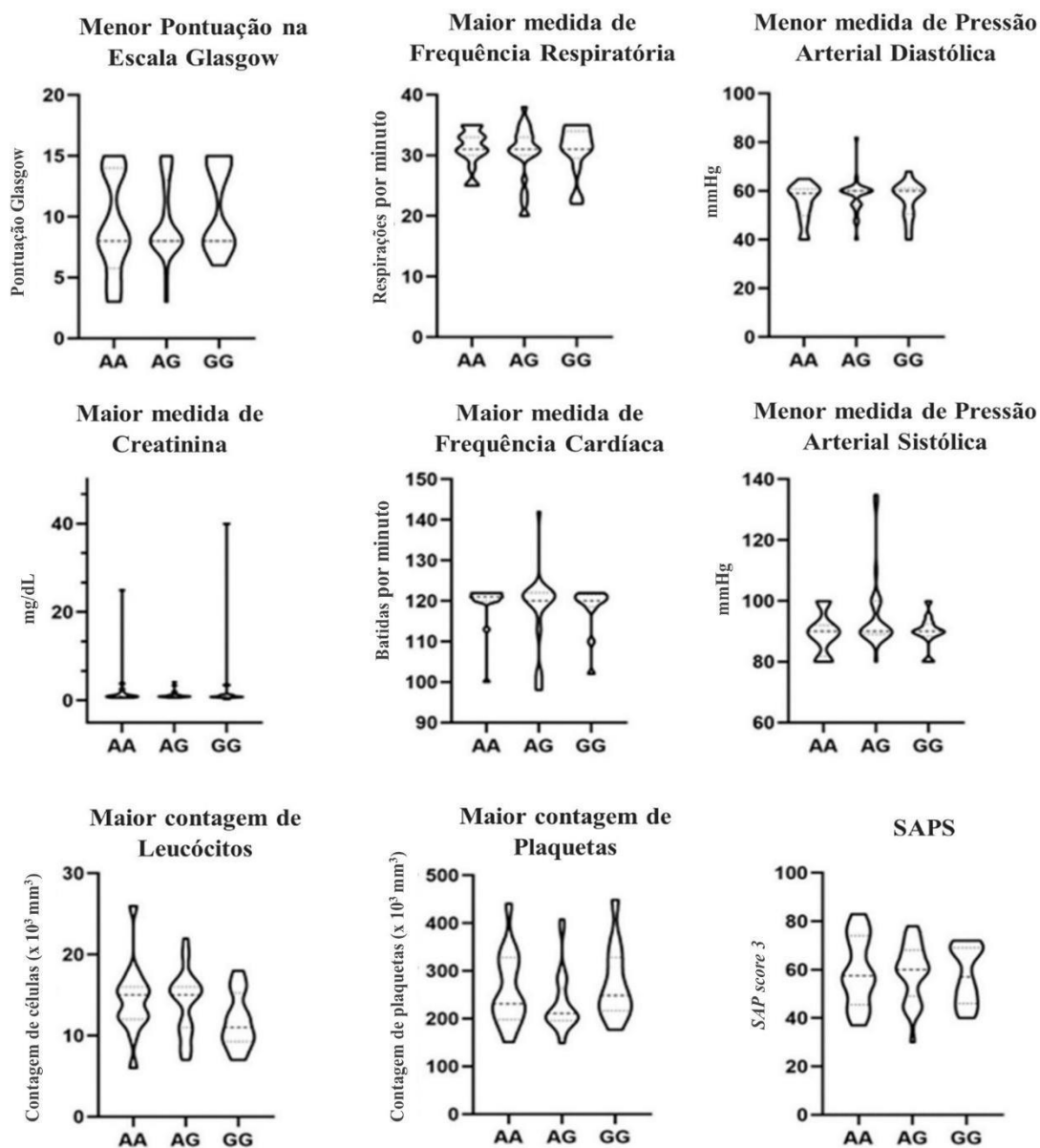
Variável	N	Genótipo %			<i>p</i> -valor	Alelo %		<i>p</i> -valor
		AA	AG	GG		G	A	
Desfecho								
Alta hospitalar	45	24,4	48,9	26,7	0,2776	51,1	48,9	0,2731
Óbito	11	45,5	45,5	9,1		31,8	68,2	
Sepse								
Sim	19	26,3	42,1	31,6	0,5654	52,6	47,4	0,5736
Não	37	29,7	51,4	18,9		44,6	55,4	
Ventilação Mecânica								
Sim	32	25,0	50,0	25,0	0,7846	50,0	50,0	0,6526
Não	24	33,3	45,8	20,8		43,8	56,3	

Tabela 11 - Associação das características clínicas com genótipo e distribuição alélica do polimorfismo rs35803318 (*ACE2*)

Variável	N	Genótipos %			<i>p</i> -valor	Alelos %		<i>p</i> -valor
		CC	CT	TT		C	T	
Desfecho								
Alta hospitalar	45	93,3	4,4	2,2	0,4377	95,6	4,4	0,1408
Óbito	11	81,8	9,1	9,1		86,4	13,6	
Sepse								
Sim	19	94,7	5,3	0,0	0,5857	97,4	2,6	0,6611
Não	37	58,9	3,6	3,6		91,9	8,1	
Ventilação Mecânica								
Sim	32	90,6	3,1	6,3	0,3335	92,2	7,8	0,4724
Não	24	91,7	8,3	0,0		95,8	4,2	

Nas figuras 10 e 11, estão apresentadas as comparações entre os genótipos dos SNPs com base em variáveis intervalares, como escala de Glasgow, frequência respiratória, frequência cardíaca, pressão diastólica e sistólica, contagem de leucócitos e plaquetas e níveis de creatinina.

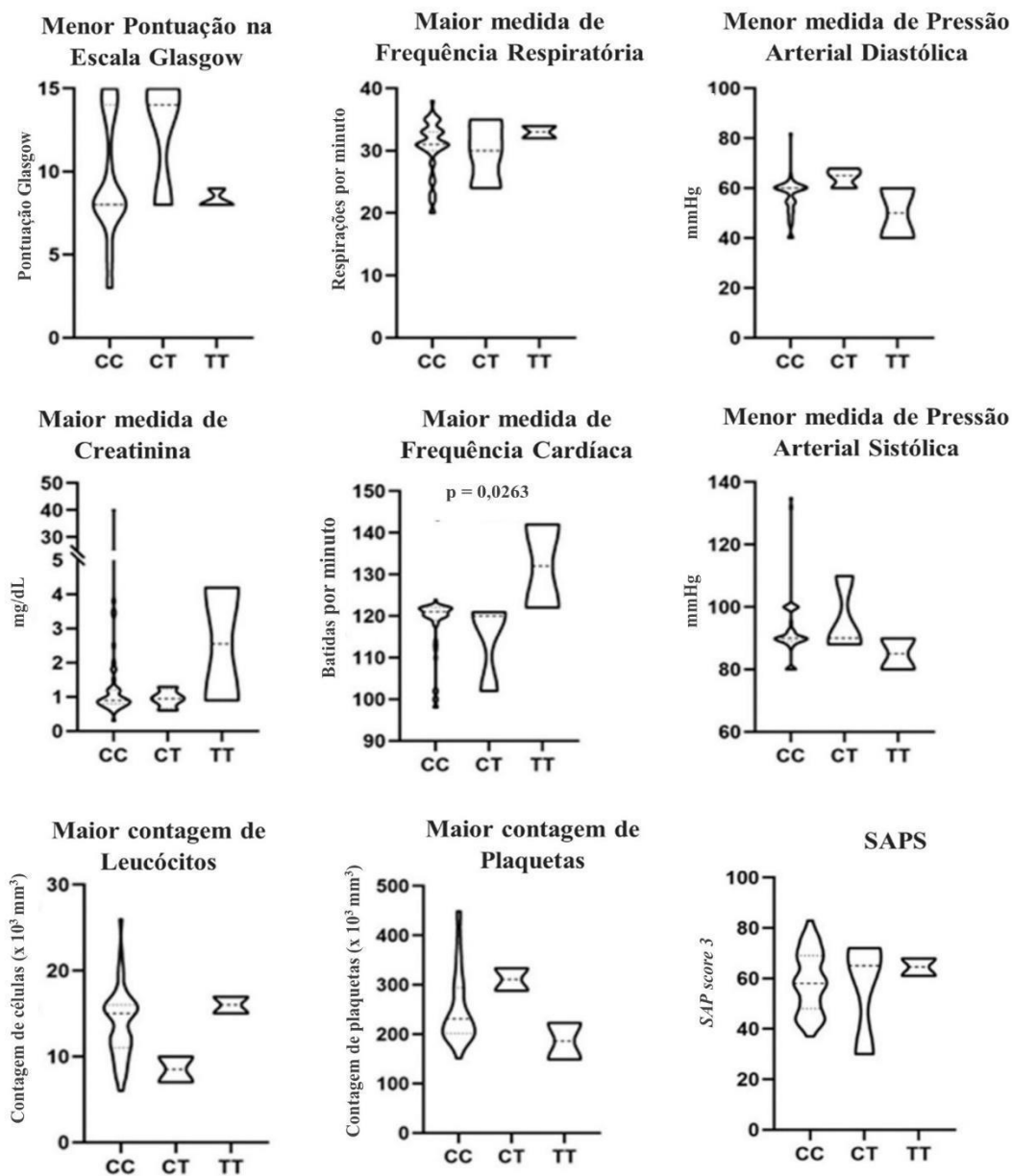
Figura 10 - Representação gráfica da análise conjunta do polimorfismo de *TMPRSS2* (rs2070788) e os dados clínicos do grupo “UTI”.



Fonte: dados da pesquisa.

Os dados são apresentados como mediana e as diferenças significativas foram testadas com o teste de *Kruskal-Wallis*. Diferenças significativas: $p < 0,05$. Não foi demonstrada associação entre as variáveis clínicas apresentadas e os SNPs no grupo de pacientes da UTI ($p > 0,05$).

Figura 11 - Representação gráfica da análise conjunta do polimorfismo de *ACE2* (rs35803318) e os dados clínicos do grupo “UTI”.



Fonte: dados da pesquisa.

7 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como um dos principais objetivos avaliar dois SNPs, rs2070788 (*TMPRSS2*) e rs35803318 (*ACE2*), em uma coorte oriunda da cidade de Fortaleza (Ceará, Brasil), frequentemente apontados como relevantes na doença causada pelo coronavírus *SARS-CoV-2*, a COVID-19. Esses polimorfismos foram anteriormente estudados em diferentes populações mundiais (KHAYAT *et al.*, 2020; KEHDY *et al.*, 2021). Até o presente momento, este é o primeiro trabalho a discutir esses SNPs na região nordeste do Brasil, uma amostra populacional com importante ascendência africana e europeia (PENA; SANTOS; TARAZONA-SANTOS, 2020).

A média de idade dos pacientes que tiveram os dados clínicos analisados foi de 51 anos. Para o grupo de pacientes que receberam alta da UTI, a média de idade foi de 48,7 anos, enquanto para o grupo de pacientes da UTI que foram a óbito, a média foi de 60,5 anos. No total, o grupo UTI é composto por 32 pacientes do sexo masculino e 24 do sexo feminino. Quando comparada a média de idade do grupo alta (48,7 anos) com a média de idade do grupo óbito (60,5 anos), há predominância de indivíduos com idade mais avançada (>60 anos) entre os casos fatais da doença. No entanto, as análises estatísticas para os dados observados demonstraram não existir significância em relação a essa variável ($p = 0,094$). Similarmente, na análise comparativa entre o gênero dos indivíduos pertencentes aos subgrupos avaliados, não houve qualquer significância estatística indicando que a variável gênero esteja implicada na gravidade da COVID-19 na coorte estudada ($p = 0,741$).

Há uma considerável porcentagem de estudos científicos abordando as variáveis gênero e idade como fatores relevantes na COVID-19. Mais especificamente, o gênero masculino e indivíduos com idade avançada apresentam maior risco de desenvolverem doença grave por coronavírus e por consequência irem a óbito (CHEN *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020). Pacientes idosos possuem, de modo geral, maior risco de agravamento de infecções e, frequentemente, compõem o grupo de risco para doenças como a gripe comum, H1N1 e outras. Esse fato é explicado, entre outros fatores, pelo processo natural de imunossenescência, responsável por uma considerável redução na eficiência do sistema imune em responder aos desafios imunológicos e montar defesas contra patógenos (WEISKOPF *et al.*, 2009; PAWELEC *et al.*, 2020).

No início da pandemia por COVID-19, a Itália foi fortemente afetada pelas infecções e mortes provocadas pela doença. A população desse país europeu é composta por uma grande parcela de idosos e, conforme mencionado anteriormente, essa característica foi apontada como razão para alta mortalidade por COVID-19 observada no país. Além disso, Schuler e colaboradores (2021) demonstraram que a expressão do gene *TMPRSS2* aumenta com o avanço da idade. Dessa forma, pacientes idosos, além de possuírem um sistema imune deficitário no controle da replicação viral, contribuindo para agravamento da COVID-19, podem ser de fato geneticamente suscetíveis a contraírem a infecção por *SARS-CoV-2*. Isso porque, com aumento da expressão de *TMPRSS2* e maior abundância de seu produto proteico nas superfícies epiteliais, haveria maiores taxas de clivagem da proteína de superfície viral e otimização da interação entre as partículas virais e os receptores do tipo ECA2, presente na célula do hospedeiro (HOFFMANN *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2021).

Neste estudo, no entanto, os resultados encontrados pelas análises realizadas não corroboram os achados de Schuler e colaboradores (2021) supracitados, tão pouco os observados e descritos por outros autores na literatura em relação à idade e ao gênero dos pacientes. Tendo em vista que variados estudos científicos consistentes ratificam a relevância de gênero e idade no prognóstico da COVID-19 (CHEN *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020), análises de expressão gênica por PCR em Tempo Real, talvez, pudessem esclarecer se de fato houve aumento na expressão do gene *TMPRSS2* no grupo de pacientes da coorte estudada. As amostras utilizadas neste trabalho para extração de DNA foram de sangue total periférico, por isso não foi possível investigar essa hipótese pela análise de expressão gênica, porque tanto o gene *ACE2*, como o gene *TMPRSS2* possuem baixa expressão gênica em células sanguíneas. Dessa forma, seria interessante a realização de análises complementares utilizando matrizes celulares reconhecidas por abundante expressão dos genes *ACE2* e *TMPRSS2* (ZOU *et al.*, 2020; VERDECCHIA *et al.*, 2020)

Todavia, embora existam limitações que possam ter colaborado para ausência de significância estatística nas variáveis gênero e idade, incluindo o tamanho da amostra analisada, existem outras hipóteses para a ocorrência desse fenômeno. Uma das hipóteses é a influência de variantes de *ACE2* e *TMPRSS2* na coorte do estudo que não foram contempladas nas análises e que estão associadas mais especificamente às variáveis investigadas. Conforme os achados de Sidhwani e colaboradores (2023), que investigaram o papel de múltiplos SNPs de *ACE2* na

gravidade da COVID-19, o polimorfismo rs2768883316, por exemplo, está implicado em maior risco de doença grave com o avanço da idade, enquanto o polimorfismo rs2285666 possui forte associação com a gravidade da doença em indivíduos do sexo masculino.

Além disso, condições subjacentes que afetam o estado de saúde dos pacientes, como alterações nos níveis de hormônios esteroides, sejam em decorrência de uma doença, existência de outros aspectos genéticos e estado fisiológico temporário ou permanente, podem ter papel importante na regulação da expressão de genes como o *TMPRSS2*. Conforme os dados reportados por Lamy e colaboradores (2021), a testosterona, por exemplo, é capaz de aumentar a regulação positiva do *TMPRSS2*, elevando o risco de infecção por *SARS-CoV-2* em homens.

Ademais, devem-se considerar, também, fatores sociais e culturais ao analisar os resultados observados. Em relação ao gênero dos pacientes, em geral, homens parecem adotar menos medidas de cuidado com a própria saúde, como ir a consultas de rotina ou realizar *check ups* periodicamente, quando comparados com as mulheres. Crenças pessoais e a perpetuação de comportamentos defendidos como característicos do sexo masculino favorecem cenários nos quais homens se expõem com mais frequência a situações de risco, seja pela baixa adesão ao uso de máscaras faciais durante a pandemia ou pela resistência em procurar atendimento médico em situações de agravo da doença (HAISCHER *et al.*, 2022; DANIELSEN *et al.*, 2022).

Nos Estados Unidos, um estudo realizado por Rushovich e colaboradores (2021) revelou as disparidades entre grupos raciais em relação ao risco de morte por COVID-19. O estudo em questão trouxe dados que revelam, além das nuances envolvendo a situação racial americana, um complexo aspecto socioeconômico de impacto na mortalidade dos pacientes com COVID-19 durante a pandemia. Conforme os autores apontam em seus achados, a população negra, com maior vulnerabilidade social e econômica, enfrenta risco aumentado de morte pela infecção por *SARS-CoV-2* em relação à população de pessoas de pele branca. Além disso, ainda que, quando realizada uma comparação intragrupo com estratificação por gênero, o maior número de óbitos esteja concentrado entre os pacientes do sexo masculino de ambos os grupos, na comparação intergrupo, na qual a totalidade do grupo de pessoas brancas foi comparada a totalidade do grupo de pessoas negras, constatou-se que mulheres negras possuem maiores chances de morrerem por COVID-19 mesmo quando comparadas a homens brancos.

Dito isso, é importante ressaltar que, devido à origem das amostras analisadas neste trabalho serem hospitais públicos da cidade de Fortaleza, responsáveis em grande parte pelo atendimento da população socioeconomicamente vulnerável da cidade e região metropolitana, a ausência de significância entre os gêneros observada nas análises do presente estudo possa estar associada a fatores socioeconômicos dos pacientes. Aqui, a hipótese defendida é a de que, embora as taxas de óbitos sejam maiores para o sexo masculino (ZHANG *et al.*, 2020), em cenários de vulnerabilidade socioeconômica, essas taxas entre os gêneros se assemelham, atenuando a disparidade observada em outros estudos. Sugere-se ainda que a questão racial seja levada em consideração, tendo em vista a possibilidade de o número de pacientes na UTI do sexo feminino estar superrepresentado por mulheres negras e pardas socioeconomicamente vulneráveis (RUSHOVICH *et al.*, 2021; FABRIN *et al.*, 2023).

Este trabalho pôde verificar ainda diferenças entre grupos a partir da análise dos dados clínicos coletados a partir do subgrupo de pacientes da UTI. Conforme os dados obtidos e analisados dos grupos de pacientes que receberam alta da UTI e daqueles que foram a óbito, houve diferença significativa nas seguintes variáveis: pressão arterial sistólica, frequência respiratória, escala de Glasgow, SAPS3, ocorrência de sepse e suporte ventilatório mecânico. Esses achados estão de acordo com estudos bem aceitos na literatura que evidenciam a piora do estado geral de saúde dos pacientes com COVID-19 grave (LAI *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2020; CASCELLA *et al.*, 2022).

Danos cardiovasculares e outras desordens associadas à desregulação do sistema-renal angiotensina-aldosterona são comumente observados em pacientes críticos para COVID-19. Além disso, pacientes com comorbidades, como hipertensão arterial sistêmica (HAS) possuem maiores riscos de desenvolverem doença grave, portanto, é compreensível a existência de diferenças significativas entre o grupo de “alta” e “óbito”. O ciclo infeccioso do coronavírus SARS-CoV-2 envolve o receptor do tipo ECA2, presente nos epitélios pelos quais o vírus geralmente invade as células. Como a ECA2 possui papel funcional importante regulando negativamente a atividade constritora da ECA e controlando a pressão arterial, (ZOU *et al.*, 2020; GUPTA *et al.*, 2020).

O comprometimento pulmonar na COVID-19 é responsável por frequentemente provocar sinais e sintomas respiratórios. Na doença grave, o processo de hematose é comprometido e danos sistêmicos decorrentes da hipóxia tecidual podem ocorrer, provocando a morte dos pacientes

acometidos. Neste estudo, pode-se verificar que as variáveis intervalares de frequência cardíaca e respiratória se apresentavam significativamente diferentes entre o grupo de pacientes que recebeu alta da UTI e aqueles que tiveram como desfecho o óbito, com a piora dessas variáveis para os últimos (RICHARDSON *et al.*, 2020; EVANS, 2022).

A diferença em relação às características clínicas entre os grupos “alta” e “óbito” ficou ainda mais evidenciada pelos dados obtidos pela análise da Pontuação de Fisiologia Aguda Simplificada ou escore SAPS 3, do inglês: *Simplified Acute Physiology Score 3*. O SAPS3 foi desenvolvido a partir da coleta de dados clínicos de cerca de 16.784 pacientes de diferentes nacionalidades internados em unidades de terapia intensiva (UTI). Esse escore é composto por 20 variáveis clínicas mensuráveis e tem como objetivo ser um modelo preditor do prognóstico de pacientes graves (METNITZ *et al.*, 2005; MORENO *et al.*, 2005).

De acordo com os resultados da análise dos dados de genotipagem, o SNP rs35803318 (*ACE2*) foi o único em desequilíbrio de Hardy Weinberg para população de Fortaleza (Brasil). Vários fatores causam desvios de EHW em uma população, como mutação, seleção natural, acasalamento não aleatório, deriva genética e fluxo gênico (GRAFFELMAN; JAIN; WEIR, 2017). Em uma vasta população com múltiplas etnias, como no Brasil, o acasalamento não aleatório relacionado à localização geográfica pode ser uma fonte prevalente de afastamentos de EHW por deficiência heterozigótica (ABRAMOV; BRASS; TASSABEHJI, 2020).

Ademais, este trabalho sugere a hipótese de que as diferenças observadas na comparação das frequências alélicas do SNP de *ACE2* (rs35803318) podem ocorrer devido ao desequilíbrio de Hardy Weinberg observado. Além disso, os desvios do EHW observados na coorte estudada podem ter um impacto relevante no comportamento da doença para a população do nordeste brasileiro. Molina e colaboradores (2022), por exemplo, estudaram em uma coorte de 318 pacientes polimorfismos do gene *ACE2* e constataram sua relação com a gravidade da COVID-19, indicando não apenas variantes associadas ao maior risco de hospitalização (rs2106809 e rs2285666), mas também variantes com efeito protetor (rs2074192 e rs1978124). Dessa forma, tendo em vista a existência de polimorfismos com característica protetora contra o *SARS-CoV-2*, a ausência de um cenário no qual a distribuição de alelos ocorra conforme a frequência esperada, ou seja, atenda ao EHW, pode favorecer a prevalência de genótipos de susceptibilidade à doença grave (MOLINA *et al.*, 2022).

Outro ponto observado nos resultados desse trabalho foi a ausência de diferenças significativas entre as frequências alélicas das populações de Fortaleza, Américas e Europa, o que pode ser explicado pela mistura altamente heterogênea e interétnica na população de brasileiros. Todavia, a análise comparativa mostrou que a população de Fortaleza apresentou frequências alélicas distintas das populações africanas e asiáticas (MYCHALECKYJ *et al.*, 2017).

Embora os africanos tenham chegado ao Brasil em larga escala entre os séculos XVII e XIX, os resultados deste trabalho indicam haver diferenças genéticas importantes entre a população de Fortaleza e a população africana. Esse fato possivelmente pode ser explicado por fatores históricos, como a extensa evasão da população negra do território cearense posteriormente à abolição da escravidão no estado, que ocorreu cerca de quatro anos antes da oficialização da lei Áurea no Brasil de 1888 (GIRÃO, 1984). Além disso, em meados de 1908, o Brasil recebeu um aumento considerável de imigrantes asiáticos, sobretudo japoneses, nas regiões sul e sudeste. Tendo em vista que a imigração de indivíduos com origem asiática não ocorreu de forma significativa para a região nordeste, incluindo o território cearense, fica evidente o porquê da diferença entre a frequência de alelos na coorte estudada e a observada na população do leste asiático (MANTA *et al.*, 2013; SILVESTRE *et al.*, 2017).

Anteriormente, foi demonstrada a existência de diferenças nas frequências alélicas dos genes *TMPRSS2* e *ACE2* entre a população europeia e a população asiática. Conforme os dados reportados por Asselta e colaboradores (2020), a população italiana possui maior frequência de um haplótipo responsável pelo aumento da expressão do *TMPRSS2*. Em contrapartida, esse haplótipo é menos frequente na população do leste asiático e continente africano. Dessa forma, tendo em vista maior proximidade genética entre a coorte do estudo e o continente europeu, pode-se apontar a hipótese de que a população de Fortaleza esteja mais suscetível à infecção por *SARS-CoV-2* e aos agravos da COVID-19, similarmente ao que foi defendido por estudos científicos em coortes europeias, por exemplo, as oriundas da Itália.

O banco de dados GTEx, do inglês: *Genotype-Tissue Expression*, possui informações sobre tamanho do efeito estimado de um alelo na expressão de determinado gene. Dessa forma, é possível realizar a identificação de genes cuja expressão é influenciada pela variação genética (GTEx CONSORTIUM, 2020). Anteriormente, um estudo descobriu que a presença do genótipo GG para o SNP rs2070788, que corresponde à maior expressão de *TMPRSS2* em tecidos pulmonares

humanos, aumenta o risco de influenza H1N1 grave (CHENG *et al.*, 2015). Com base nos resultados da análise de eQTLs e nas frequências genóticas observadas, o genótipo AA, que corresponde à menor expressão de *TMPRSS2* no pulmão, parece proteger os indivíduos portadores contra COVID-19, sobretudo em populações como as do leste da Ásia e África. Nesse sentido, os achados deste trabalho sugerem que Fortaleza (Brasil) e Américas podem ser as populações mais suscetíveis a infecções por *SARS-CoV-2*, uma vez que o genótipo AA está em baixa frequência.

Além disso, os resultados das análises de eQTLs demonstraram o papel trans regulatório do SNP rs35803318 (*ACE2*), sendo esse um outro achado importante deste trabalho. Esse polimorfismo possui influência sobre a expressão do gene *PIR* e pode estar relacionado a um mecanismo de supressão da resposta imunológica disfuncional na COVID-19 grave. Isso porque, a presença do alelo mutante (T) reduz a expressão do *PIR*, responsável por codificar a proteína pirina (SHOVLIN; VIZCAYCHIPI, 2020).

A proteína pirina está implicada em aumento significativo na ativação da via NF- κ B/p65, que está ligada a várias doenças inflamatórias crônicas (GIRIDHARAN; SRINIVASAN, 2018). Quando a pirina provoca a hiperativação da via NF- κ B/p65, há aumento da expressão de genes relacionados à síndrome da tempestade de citocinas, relacionada ao aumento da gravidade da COVID-19 (HARIHARAN *et al.*, 2021). Recentemente, Shoily e colaboradores (2021) já haviam relatado outro SNP rs4646156 (*ACE2*) como um locus eQTL que pode modificar a expressão do gene *PIR* em uma variedade de tecidos, incluindo esôfago, tireóide, tecido adiposo e artéria. Curiosamente, a maior frequência do genótipo homocigoto mutante (TT) foi na população de Fortaleza entre as populações analisadas.

Os resultados preliminares deste trabalho, além de outros estudos científicos, levantaram a hipótese de que os SNPs rs2070788 (*TMPRSS2*) e rs35803318 (*ACE2*) estão associados ao aumento do risco de infecção por *SARS-CoV-2* e a prognósticos desfavoráveis da COVID-19 em diferentes populações (KHAYAT *et al.*, 2020; KEHDY *et al.*, 2021). Apesar disso, não houve associação significativa entre parâmetros clínicos e os genótipos de *TMPRSS2*. Para os genótipos de rs35803318 (*ACE2*), apesar da ausência de associação entre a maioria dos parâmetros clínicos e a distribuição dos genótipos observada, foi verificada significância estatística para a variável “maior medida de frequência cardíaca” ($p = 0,0263$).

Conforme discutido anteriormente, o produto do gene *ACE2*, a ECA2, é responsável por antagonizar os efeitos vasoconstritores da ECA. Esse mecanismo se estabelece a partir da conversão de angiotensina 2 (Ang II) em angiotensina 1-7 (Ang I-VII) pela ação dessa enzima. A angiotensina 1-7 (Ang I-VII) é fundamental na regulação e controle da pressão arterial sistêmica e o comprometimento na produção desse peptídeo por ECA2 tem sido apontado como relevante em desordens cardíacas. Por isso, os resultados observados para a variável “maior medida de frequência cardíaca” poderiam estar associados ao comprometimento da via da angiotensina 1-7 (Ang I-VII) em decorrência do sequestro dos receptores ECA2 pelo *SARS-CoV-2*. Entretanto, é importante salientar a ausência de associação estatística entre o polimorfismo de *ACE2* e variáveis contendo as medidas de pressão arterial sistólica e diastólica. Além disso, não houve qualquer significância estatística do mesmo polimorfismo de *ACE2* e o abrangente escore SAPS3, enfraquecendo a hipótese de que esse polimorfismo impacte verdadeiramente no prognóstico dos pacientes com COVID-19 (ZOU *et al.*, 2020; GUPTA *et al.*, 2020).

Portanto, ao contrário de resultados divulgados por estudos de outros países, o desfecho ou a gravidade na coorte deste estudo não foi afetado pela presença ou ausência dos SNPs de *ACE2* e *TMPRSS2*. Todavia, este trabalho pôde fornecer maior esclarecimento acerca do impacto dessas variantes na doença por COVID-19. Além disso, os achados deste trabalho, sobretudo aqueles observados nas análises de eQTLs e avaliação de frequências de alélicas, podem ajudar a complementar a hipótese da existência de SNPs protetores para infecção por *SARS-CoV-2*, favorecendo a estratificação molecular dos indivíduos de acordo com seu componente genético (TORRE-FUENTES *et al.*, 2021).

Anteriormente, a variante rs35803318 (*ACE2*) já havia sido apontada como possivelmente protetora na COVID-19. Em um estudo conduzido por Torre-fuentes e colaboradores (2021), não houve nenhuma associação desta variante com doença grave. Benetti e colaboradores (2020) apontaram, ainda, maior frequência de alelos correspondentes a variante rs35803318 (*ACE2*) no grupo controle quando comparado ao grupo de indivíduos com infecção por *SARS-CoV-2*. Portanto, os dados obtidos a partir das análises feitas neste trabalho ajudam a corroborar essa hipótese.

Por fim, tendo em vista as características da proteína *TMPRSS2*: ação de clivagem sobre receptores do hospedeiro que promovem a infecção por coronavírus, alto grau polimórfico de seu gene de origem e seu papel fisiológico aparentemente dispensável aos organismos, estudos

pregressos têm sugerido essa protease como um potencial alvo farmacológico na COVID-19 (HOFFMANN *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2023). No entanto, apesar de TMPRSS2 parecer um alvo promissor para a prospecção de novos fármacos, principalmente por funcionar como co-receptor para diferentes tipos virais, incluindo SARS-CoV-1 e 2 e o vírus influenza, outras vias independentes do mecanismo pelo qual essa proteína promove o processo infeccioso parecem ganhar mais destaque a depender do microrganismo invasor ou até mesmo do tipo de variante desse microrganismo. Por exemplo, ainda que *in vitro* tenha sido possível evitar a infecção por SARS-CoV-2 por um agente bloqueador de TMPRSS2 (mesilado de nafamostatato) (HOFFMANN *et al.*, 2020), Zhao e colaboradores (2022) reportaram que a inibição de TMPRSS2 só foi eficaz para evitar a infecção pela variante Delta, porém pouco eficiente para a variante Omicron.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de variações na frequência alélica nos genes de *ACE2* e *TMPRSS2* foi observada em uma variedade de populações em todo o mundo, indicando que diferenças na infecção e gravidade por COVID-19 podem ser influenciadas por antecedentes genéticos do hospedeiro (CAO *et al.*, 2020). Portanto, este trabalho teve como principal o objetivo investigar a influência de dois SNPs, rs2070788 (*TMPRSS2*) e rs35803318 (*ACE2*), no prognóstico de pacientes não vacinados diagnosticados com a COVID-19 no estado do Ceará. Ambas as variantes foram anteriormente estudadas na população europeia, peruana nativo americana e nativo americana da Amazônia (KHAYAT *et al.*, 2020; KEHDY *et al.*, 2021) e têm ganhado atenção na literatura (SURYAMOHAN *et al.*, 2021).

Dessa forma, este estudo pode observar diferenças significativas ao comparar os subgrupos “alta” e “óbito” em relação aos parâmetros clínicos dos pacientes. Porém, a análise conjunta entre os dados de genotipagem e os parâmetros clínicos desses pacientes evidenciou não haver associação significativa entre a distribuição dos genótipos, o desfecho e a gravidade da doença por *SARS-CoV-2*. Portanto, de acordo com este estudo, os SNPs rs35803318 do gene *ACE2* e rs2070788 do gene *TMPRSS2* não estão associados à doença grave e mortalidade.

Em contrapartida, as análises de eQTLs sugerem que genótipos com alelo mutante estão associados a menor expressão dos genes *ACE2* e *TMPRSS2*, indicando possível papel protetor dessas variantes na COVID-19. Ademais, o SNP de *ACE2* foi implicado na regulação da expressão do PIR gene, sugerindo um papel dessa variante na modulação da resposta imune ao *SARS-CoV-2*. Além disso, as análises dos parâmetros clínicos pertencentes ao grupo UTI corroboraram o alto poder preditivo do SAPS3 para risco de morte de pacientes em estado grave. Dessa forma, conforme os dados deste trabalho, o escore SAPS3 foi uma excelente ferramenta para prever o risco de mortalidade para pacientes com COVID-19 na UTI.

No total, cerca de cinco mil exames de RT-PCR para detecção de *SARS-CoV-2* foram realizados no laboratório de Farmacogenética (FARMAGEN), que funcionou com laboratório de apoio para o Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará (LACEN) durante os períodos de alta demanda por diagnóstico molecular na pandemia por COVID-19. No entanto, apenas um número reduzido de pacientes (n = 148) foi inserido nesta pesquisa. Entre as principais barreiras para

recrutar participantes estava a dificuldade de acesso aos pacientes, pois uma parcela desses indivíduos estava na UTI.

Além disso, o período no qual se realizou a prospecção de voluntários ampliou a dificuldade tanto em contatar pacientes e/ou familiares de pacientes, como de realizar a coleta de dados clínicos. A pesquisa ocorreu durante períodos no qual o número de novas infecções e mortes era crescente e não havia muitas informações sobre a COVID-19, resultando no controle rígido no acesso aos hospitais participantes da pesquisa, aos pacientes e seus familiares. O preenchimento do TCLE *online* também trouxe dificuldade para alguns voluntários por motivos diversos, levando, por exemplo, ao não preenchimento e ao preenchimento incompleto ou incorreto das informações requeridas no formulário. Ademais, muitos pacientes ou familiares se recusaram a participar da pesquisa por motivos pessoais não relatados.

Por fim, os resultados encontrados neste estudo propiciaram maior esclarecimento sobre o papel dos SNPs, rs2070788 (*TMPRSS2*) e rs35803318 (*ACE2*) na COVID-19, reforçando, na verdade, uma hipótese contrária àquela previamente elaborada, na qual, em concordância com dados de estudos pregressos, tais variantes seriam responsáveis pelo aumento da susceptibilidade a COVID-19. Neste trabalho, no entanto, essa hipótese não somente foi refutada, como a hipótese de as variantes que foram objeto desta pesquisa possam, na verdade, ter um papel protetor na doença por coronavírus. Ademais, os dados de genotipagem trouxeram informações importantes sobre o perfil genético da coorte estudada, uma vez que foi realizada a determinação e distribuição desses genótipos em comparação com diferentes populações mundiais.

Todavia, podem-se apontar algumas questões que merecem, talvez, análises e pesquisas complementares para maior esclarecimento. Dentre essas questões está a influência de outras variantes dos genes *ACE2* e *TMPRSS2* que podem ser responsáveis pela ausência de significância estatística observada neste trabalho para as variáveis idade e gênero. Além disso, a significância estatística observada na comparação entre os genótipos do SNP de *ACE2* e variável “medida de frequência cardíaca” também pode ser mais bem investigada a fim de esclarecer quais razões levaram a esse resultado.

REFERÊNCIAS

ABRAMOV, Nikita; BRASS, Andrew; TASSABEHJI, May. Hardy-Weinberg equilibrium in the large scale genomic sequencing era. **Frontiers in genetics**, v. 11, p. 210, 2020.

AL-MAKKI, Akram *et al.* Hypertension pharmacological treatment in adults: a World Health Organization guideline executive summary. **Hypertension**, v. 79, n. 1, p. 293-301, 2022.

AL-QAHTANI, Ahmed A. *et al.* SARS-CoV-2 modulates inflammatory responses of alveolar epithelial type II cells via PI3K/AKT pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2022.

ANDRESEN, Vibeke; GJERTSEN, Bjørn T. Drug repurposing for the treatment of acute myeloid leukemia. **Frontiers in Medicine**, v. 4, p. 211, 2017.

ASSELTA, Rosanna *et al.* ACE2 and TMPRSS2 variants and expression as candidates to sex and country differences in COVID-19 severity in Italy. **Aging (albania NY)**, v. 12, n. 11, p. 10087, 2020.

BAI, Zhihua *et al.* The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation. **Viruses**, v. 13, n. 6, p. 1115, 2021.

BARTOLETTI, Michele *et al.* ESCMID COVID-19 living guidelines: drug treatment and clinical management. **Clinical microbiology and infection**, v. 28, n. 2, p. 222-238, 2022.

BENETTI, Elisa *et al.* ACE2 gene variants may underlie interindividual variability and susceptibility to COVID-19 in the Italian population. **European Journal of Human Genetics**, v. 28, n. 11, p. 1602-1614, 2020.

BERTRAM, Stephanie *et al.* Influenza and SARS-coronavirus activating proteases TMPRSS2 and HAT are expressed at multiple sites in human respiratory and gastrointestinal tracts. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35876, 2012.

BERTRAM, Stephanie *et al.* TMPRSS2 activates the human coronavirus 229E for cathepsin-independent host cell entry and is expressed in viral target cells in the respiratory epithelium. **Journal of virology**, v. 87, n. 11, p. 6150-6160, 2013.

BERTRAM, Stephanie *et al.* TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. **Journal of virology**, v. 84, n. 19, p. 10016-10025, 2010.

BOSCOLO-RIZZO, Paolo *et al.* Coronavirus disease 2019 (COVID-19)–related smell and taste impairment with widespread diffusion of severe acute respiratory syndrome–coronavirus-2 (SARS-CoV-2) Omicron variant. In: **International Forum of Allergy & Rhinology**. 2022. p. 1273-1281.

BOULICAULT, Marion. Sex disparities in COVID-19 mortality vary across US racial groups. 2021.

BURKI, Talha Khan. Omicron variant and booster COVID-19 vaccines. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 10, n. 2, p. e17, 2022.

CAIMMI, Philippe Primo *et al.* The hard lessons learned by the COVID-19 epidemic in Italy: rethinking the role of the national health care service?. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 11, n. 3, p. 266, 2021.

CALCAGNILE, Matteo *et al.* Molecular docking simulation reveals ACE2 polymorphisms that may increase the affinity of ACE2 with the SARS-CoV-2 Spike protein. **Biochimie**, v. 180, p. 143-148, 2021.

CALY, Leon *et al.* The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. **Antiviral research**, v. 178, p. 104787, 2020.

CAO, Yanan *et al.* Comparative genetic analysis of the novel coronavirus (2019-nCoV/SARS-CoV-2) receptor ACE2 in different populations. **Cell discovery**, v. 6, n. 1, p. 1-4, 2020.

CAPPADONA, Claudio *et al.* Genetic susceptibility to severe COVID-19. **Infection, Genetics and Evolution**, p. 105426, 2023.

CARDOSO, Evelin Helena Silva *et al.* Characterizing the impact of social inequality on COVID-19 propagation in developing countries. **Ieee Access**, v. 8, p. 172563-172580, 2020.

CASANOVA, Jean-Laurent; ABEL, Laurent. Human genetics of infectious diseases: a unified theory. **The EMBO journal**, v. 26, n. 4, p. 915-922, 2007.

- CASCELLA, Marco *et al.* Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). **Statpearls [internet]**, 2022.
- CASTAÑO-AMORES, Celia *et al.* Pharmacogenetic polymorphisms affecting bisoprolol response. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 142, p. 112069, 2021.
- CHEN, Nanshan *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507-513, 2020.
- CHENG, Zhongshan *et al.* Identification of TMPRSS2 as a susceptibility gene for severe 2009 pandemic A (H1N1) influenza and A (H7N9) influenza. **The Journal of infectious diseases**, v. 212, n. 8, p. 1214-1221, 2015.
- CHENG, Zhongshan *et al.* Identification of TMPRSS2 as a susceptibility gene for severe 2009 pandemic A (H1N1) influenza and A (H7N9) influenza. **The Journal of infectious diseases**, v. 212, n. 8, p. 1214-1221, 2015.
- CHILAMAKURI, R.; AGARWAL, S. COVID-19: Characteristics and therapeutics. **Cells**. 2021; 10: 206. 2021.
- COCHIN, Maxime *et al.* Hydroxychloroquine and azithromycin used alone or combined are not effective against SARS-CoV-2 ex vivo and in a hamster model. **Antiviral Research**, v. 197, p. 105212, 2022.
- CORTI, Davide *et al.* Tackling COVID-19 with neutralizing monoclonal antibodies. **Cell**, v. 184, n. 12, p. 3086-3108, 2021.
- COUZIN-FRANKEL, Jennifer. The mystery of the pandemic's 'happy hypoxia'. 2020.
- CRACKOWER, Michael A. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature**, v. 417, n. 6891, p. 822-828, 2002.
- CUI, Jie; LI, Fang; SHI, Zheng-Li. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature reviews microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181-192, 2019.

DA SILVA, Severino Jefferson Ribeiro *et al.* Two years into the COVID-19 pandemic: lessons learned. **ACS infectious diseases**, v. 8, n. 9, p. 1758-1814, 2022.

DAL-RE, Rafael *et al.* Availability of oral antivirals against SARS-CoV-2 infection and the requirement for an ethical prescribing approach. **The Lancet Infectious Diseases**, 2022.

DANIELSEN, Ann Caroline *et al.* Sex disparities in COVID-19 outcomes in the United States: Quantifying and contextualizing variation. **Social science & medicine**, v. 294, p. 114716, 2022.

DE BRUYN, Astrid *et al.* Secondary infection in COVID-19 critically ill patients: a retrospective single-center evaluation. **BMC Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 207, 2022.

DE HAAN, Cornelis AM; ROTTIER, Peter JM. Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. **Advances in virus research**, v. 64, p. 165-230, 2005.

DE WIT, Emmie *et al.* SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. **Nature reviews microbiology**, v. 14, n. 8, p. 523-534, 2016.

DONALDSON, Scott H. *et al.* Regulation of the epithelial sodium channel by serine proteases in human airways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 10, p. 8338-8345, 2002.

DONG, Mengzhen *et al.* ACE2, TMPRSS2 distribution and extrapulmonary organ injury in patients with COVID-19. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 131, p. 110678, 2020.

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

EVANS, Colin E. Hypoxia-inducible factor signaling in inflammatory lung injury and repair. **Cells**, v. 11, n. 2, p. 183, 2022.

FABRIN, Caroline *et al.* Desigualdade socioeconômica na letalidade e no cuidado hospitalar de crianças e adolescentes internados por COVID-19 no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 26, 2023.

FEIKIN, Daniel R. *et al.* Duration of effectiveness of vaccines against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease: results of a systematic review and meta-regression. **The Lancet**, 2022.

FUJIMOTO, Kazuhiro J. *et al.* In Silico Analysis and Synthesis of Nafamostat Derivatives and Evaluation of Their Anti-SARS-CoV-2 Activity. **Viruses**, v. 14, n. 2, p. 389, 2022.

GAUTRET, Philippe *et al.* Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. **International journal of antimicrobial agents**, v. 56, n. 1, p. 105949, 2020.

GE, Xing-Yi *et al.* Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. **Nature**, v. 503, n. 7477, p. 535-538, 2013.

GHEBLAWI, Mahmoud *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2: SARS-CoV-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system: celebrating the 20th anniversary of the discovery of ACE2. **Circulation research**, v. 126, n. 10, p. 1456-1474, 2020.

GIRÃO, Raimundo. **A abolição no Ceará**. Secretaria de Cultura e Desporto, 1984.

GIRIDHARAN, Sivagami; SRINIVASAN, Mythily. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation. **Journal of inflammation research**, p. 407-419, 2018.

GLOWACKA, Ilona *et al.* Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. **Journal of virology**, v. 85, n. 9, p. 4122-4134, 2011.

GORDON, David E. *et al.* A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. **Nature**, v. 583, n. 7816, p. 459-468, 2020.

GRAFFELMAN, Jan; JAIN, Deepti; WEIR, Bruce. A genome-wide study of Hardy–Weinberg equilibrium with next generation sequence data. **Human genetics**, v. 136, p. 727-741, 2017

GRAMMES, Nadja *et al.* Research output and international cooperation among countries during the COVID-19 pandemic: scientometric analysis. **Journal of medical Internet research**, v. 22, n. 12, p. e24514, 2020.

GTEX CONSORTIUM. The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. **Science**, v. 369, n. 6509, p. 1318-1330, 2020.

GUARNIERI, Joseph W. *et al.* SARS-CoV-2 viroporins activate the NLRP3-inflammasome via the mitochondrial permeability transition pore. **BioRxiv**, p. 2022.02.19.481139, 2022.

GUPTA, Aakriti *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nature medicine**, v. 26, n. 7, p. 1017-1032, 2020.

GUSTINE, Joshua N.; JONES, Dennis. Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19. **The American journal of pathology**, v. 191, n. 1, p. 4-17, 2021.

HAISCHER, Michael H. *et al.* Who is wearing a mask? Gender-, age-, and location-related differences during the COVID-19 pandemic. **PloS one**, v. 15, n. 10, p. e0240785, 2020.

HARIHARAN, Apurva *et al.* The role and therapeutic potential of NF-kappa-B pathway in severe COVID-19 patients. **Inflammopharmacology**, v. 29, p. 91-100, 2021.

HEURICH, Adeline *et al.* TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. **Journal of virology**, v. 88, n. 2, p. 1293-1307, 2014.

HODOS, Rachel A. *et al.* In silico methods for drug repurposing and pharmacology. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 186-210, 2016.

HOFFMANN, Markus *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **cell**, v. 181, n. 2, p. 271-280. e8, 2020.

HU, Ben *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141-154, 2021.

HUANG, Chaolin *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

IMAI, Yumiko *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. **Nature**, v. 436, n. 7047, p. 112-116, 2005.

IWATA-YOSHIKAWA, Naoko *et al.* TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after coronavirus infection. **Journal of virology**, v. 93, n. 6, p. e01815-18, 2019.

JOHNS HOPKINS. Coronavirus 2019-nCoV Global Cases. Center for Systems Science and Engineering, Johns Hopkins University. Disponível em: <https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>. Acesso em: 01 de outubro de 2022

KEHDY, Fernanda SG *et al.* Human-SARS-CoV-2 interactome and human genetic diversity: TMPRSS2-rs2070788, associated with severe influenza, and its population genetics caveats in Native Americans. **Genetics and Molecular Biology**, v. 44, 2021.

KEHDY, Fernanda SG *et al.* Human-SARS-CoV-2 interactome and human genetic diversity: TMPRSS2-rs2070788, associated with severe influenza, and its population genetics caveats in Native Americans. **Genetics and Molecular Biology**, v. 44, 2021.

KEHDY, Fernanda SG *et al.* Human-SARS-CoV-2 interactome and human genetic diversity: TMPRSS2-rs2070788, associated with severe influenza, and its population genetics caveats in Native Americans. **Genetics and Molecular Biology**, v. 44, 2021.

KHAYAT, A. S. Assumpcao PP de, Khayat BCM, Araujo TMT, Batista-Gomes JA, Imbiriba LC, *et al.* **ACE2 polymorphisms as potential players in COVID-19 outcome. Genetic and Genomic Medicine**, 2020.

KHAYAT, André Salim *et al.* ACE2 polymorphisms as potential players in COVID-19 outcome. **PLoS One**, v. 15, n. 12, p. e0243887, 2020.

KIM, Min Ji *et al.* Isolation and genomic analyses of an early SARS-CoV-2 strains from the 2020 epidemic in gwangju, south korea. **Journal of Bacteriology and Virology**, v. 51, n. 3, p. 138-147, 2021.

KIM, Tom S. *et al.* Phenotypic analysis of mice lacking the Tmprss2-encoded protease. **Molecular and cellular biology**, v. 26, n. 3, p. 965-975, 2006.

LAI, Chih-Cheng *et al.* Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Facts and myths. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 53, n. 3, p. 404-412, 2020.

- LAMY, Pierre-Jean *et al.* Androgenic hormones and the excess male mortality observed in COVID-19 patients: new convergent data. **World Journal of Urology**, v. 39, n. 8, p. 3121-3123, 2021.
- LEVY, Samuel *et al.* The diploid genome sequence of an individual human. **PLoS biology**, v. 5, n. 10, p. e254, 2007.
- LI, Fang. Structural analysis of major species barriers between humans and palm civets for severe acute respiratory syndrome coronavirus infections. **Journal of virology**, v. 82, n. 14, p. 6984-6991, 2008.
- LI, Jin-Yan *et al.* The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of *SARS-CoV-2* inhibit type I interferon signaling pathway. **Virus research**, v. 286, p. 198074, 2020.
- LI, Kun *et al.* The TMPRSS2 inhibitor nafamostat reduces *SARS-CoV-2* pulmonary infection in mouse models of COVID-19. **MBio**, v. 12, n. 4, p. e00970-21, 2021.
- LI, Wendong *et al.* Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. **Science**, v. 310, n. 5748, p. 676-679, 2005.
- LI, Wenhui *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. **Nature**, v. 426, n. 6965, p. 450-454, 2003.
- LIN, Biaoyang *et al.* Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. **Cancer research**, v. 59, n. 17, p. 4180-4184, 1999.
- LIU, Jia *et al.* Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting *SARS-CoV-2* infection in vitro. **Cell discovery**, v. 6, n. 1, p. 16, 2020.
- LU, Roujian *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565-574, 2020.
- LUCAS, Jared M. *et al.* The Androgen-Regulated Protease TMPRSS2 Activates a Proteolytic Cascade Involving Components of the Tumor Microenvironment and Promotes Prostate Cancer Metastasis. **Cancer discovery**, v. 4, n. 11, p. 1310-1325, 2014.

LUPALA, Cecylia S. *et al.* Mutations on RBD of SARS-CoV-2 Omicron variant result in stronger binding to human ACE2 receptor. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 590, p. 34-41, 2022.

MACALINO, Stephani Joy Y. *et al.* Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. **Archives of pharmacal research**, v. 38, p. 1686-1701, 2015.

MAHASE, Elisabeth. Covid-19: Pfizer's paxlovid is 89% effective in patients at risk of serious illness, company reports. 2021.

MAHASE, Elisabeth. Covid-19: WHO declares pandemic because of "alarming levels" of spread, severity, and inaction. **Bmj**, v. 368, n. March, p. m1036, 2020.

MALLAH, Saad I. *et al.* COVID-19: breaking down a global health crisis. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 20, n. 1, p. 1-36, 2021.

MANTA, Fernanda Saloum Neves *et al.* Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. **Annals of human biology**, v. 40, n. 1, p. 94-98, 2013.

MARCONI, Vincent C. *et al.* Efficacy and safety of baricitinib for the treatment of hospitalised adults with COVID-19 (COV-BARRIER): a randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled phase 3 trial. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 9, n. 12, p. 1407-1418, 2021.

MATSUYAMA, Shutoku *et al.* Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 13, p. 7001-7003, 2020.

MAYENCE, Annie; VANDEN EYNDE, Jean Jacques. Baricitinib: a 2018 novel FDA-approved small molecule inhibiting janus kinases. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 1, p. 37, 2019.

MCCLELLAN, Jon; KING, Mary-Claire. Genetic heterogeneity in human disease. **Cell**, v. 141, n. 2, p. 210-217, 2010.

MINH, Le Huu Nhat *et al.* Clinical and laboratory factors associated with coronavirus disease 2019 (Covid-19): a systematic review and meta-analysis. **Reviews in Medical Virology**, v. 31, n. 6, p. e2288, 2021.

MOUFFAK, Soraya *et al.* Recent advances in management of COVID-19: a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 143, p. 112107, 2021.

MULLIN, Sarah *et al.* Modeling pandemic to endemic patterns of SARS-CoV-2 transmission using parameters estimated from animal model data. **PNAS nexus**, v. 1, n. 3, p. pgac096, 2022.

NAQVI, Ahmad Abu Turab *et al.* Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 10, p. 165878, 2020.

NG, Yan Ling; SALIM, Cyrill Kafi; CHU, Justin Jang Hann. Drug repurposing for COVID-19: Approaches, challenges and promising candidates. **Pharmacology & therapeutics**, v. 228, p. 107930, 2021.

NIETO-TORRES, Jose L. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004077, 2014.

NIKIC, Predrag *et al.* Polymorphisms of Antioxidant Enzymes SOD2 (rs4880) and GPX1 (rs1050450) Are Associated with Bladder Cancer Risk or Its Aggressiveness. **Medicina**, v. 59, n. 1, p. 131, 2023.

NOORIMOTLAGH, Zahra *et al.* A systematic review of possible airborne transmission of the COVID-19 virus (SARS-CoV-2) in the indoor air environment. **Environmental research**, v. 193, p. 110612, 2021.

ONG, Sean Wei Xiang *et al.* Air, surface environmental, and personal protective equipment contamination by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) from a symptomatic patient. **Jama**, v. 323, n. 16, p. 1610-1612, 2020.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Novo coronavírus 2019. Relatório de situação. **Organização Mundial da Saúde (OMS)**. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/>. Acessado em 01 de outubro de 2020.

PAN, Hongchao *et al.* Repurposed Antiviral Drugs for Covid-19-Interim WHO Solidarity Trial Results. **Lancet**, v. 399, p. 1941-1953, 2022.

PANDEY, Manish *et al.* Comparative incidence of early and late bloodstream and respiratory tract co-infection in patients admitted to ICU with COVID-19 pneumonia versus Influenza A or B pneumonia versus no viral pneumonia: Wales multicentre ICU cohort study. **Critical Care**, v. 26, n. 1, p. 1-12, 2022.

PAUL, Martin; POYAN MEHR, Ali; KREUTZ, Reinhold. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiological reviews**, v. 86, n. 3, p. 747-803, 2006.

PEIRIS, J. S. M. *et al.* Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. **The lancet**, v. 361, n. 9366, p. 1319-1325, 2003.

PENA, Sergio DJ; SANTOS, Fabrício R.; TARAZONA-SANTOS, Eduardo. Genetic admixture in Brazil. In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**. Hoboken, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2020. p. 928-938.

PIROTH, Lionel *et al.* Comparison of the characteristics, morbidity, and mortality of COVID-19 and seasonal influenza: a nationwide, population-based retrospective cohort study. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 9, n. 3, p. 251-259, 2021.

PORMOHAMMAD, Ali *et al.* Comparison of influenza type A and B with COVID-19: A global systematic review and meta-analysis on clinical, laboratory and radiographic findings. **Reviews in medical virology**, v. 31, n. 3, p. e2179, 2021.

POUDEL, Ayusha *et al.* D-dimer as a biomarker for assessment of COVID-19 prognosis: D-dimer levels on admission and its role in predicting disease outcome in hospitalized patients with COVID-19. **Plos one**, v. 16, n. 8, p. e0256744, 2021.

PRICE, Christina C. *et al.* Tocilizumab treatment for cytokine release syndrome in hospitalized patients with coronavirus disease 2019: survival and clinical outcomes. **Chest**, v. 158, n. 4, p. 1397-1408, 2020.

PYRC, Krzysztof; BERKHOUT, Ben; VAN DER HOEK, Lia. The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. **Journal of virology**, v. 81, n. 7, p. 3051-3057, 2007.

QI, Jing *et al.* The scRNA-seq expression profiling of the receptor *ACE2* and the cellular protease TMPRSS2 reveals human organs susceptible to *SARS-CoV-2* infection. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 1, p. 284, 2021.

REN, Li-Li *et al.* Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. **Chinese medical journal**, v. 133, n. 09, p. 1015-1024, 2020.

REN, Wenlin *et al.* Susceptibilities of human *ACE2* genetic variants in coronavirus infection. **Journal of Virology**, v. 96, n. 1, p. e01492-21, 2022.

RICE, Benjamin L. *et al.* Why do some coronaviruses become pandemic threats when others do not?. **PLoS biology**, v. 20, n. 5, p. e3001652, 2022.

RICHARDSON, Safiya *et al.* Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City area. **Jama**, v. 323, n. 20, p. 2052-2059, 2020.

ROCHA, Rudi *et al.* Effect of socioeconomic inequalities and vulnerabilities on health-system preparedness and response to COVID-19 in Brazil: a comprehensive analysis. **The Lancet Global Health**, v. 9, n. 6, p. e782-e792, 2021.

ROMAN, Yuani M. *et al.* Ivermectin for the treatment of coronavirus disease 2019: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Clinical Infectious Diseases**, v. 74, n. 6, p. 1022-1029, 2022.

RUSHOVICH, Tamara *et al.* Sex disparities in COVID-19 mortality vary across US racial groups. **Journal of General Internal Medicine**, v. 36, p. 1696-1701, 2021.

SABATER MOLINA, Maria *et al.* Polymorphisms in ACE, ACE2, AGTR1 genes and severity of COVID-19 disease. **PLoS One**, v. 17, n. 2, p. e0263140, 2022.

SCHULER, Bryce A. *et al.* Age-determined expression of priming protease TMPRSS2 and localization of SARS-CoV-2 in lung epithelium. **The Journal of clinical investigation**, v. 131, n. 1, 2021.

SCHULER, Bryce A. *et al.* Age-determined expression of priming protease TMPRSS2 and localization of SARS-CoV-2 in lung epithelium. **The Journal of clinical investigation**, v. 131, n. 1, 2021.

SCHWARTZ, Daniella M. *et al.* JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases. **Nature reviews Drug discovery**, v. 16, n. 12, p. 843-862, 2017.

SHANG, Jian *et al.* Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. **Nature**, v. 581, n. 7807, p. 221-224, 2020.

SHEAHAN, Timothy P. *et al.* Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. **Science translational medicine**, v. 9, n. 396, p. eaal3653, 2017.

SHOILY, Sabrina Samad *et al.* Disparities in COVID-19 severities and casualties across ethnic groups around the globe and patterns of ACE2 and PIR variants. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 92, p. 104888, 2021.

SHOVLIN, Claire L.; VIZCAYCHIPI, Marcela P. Vascular inflammation and endothelial injury in SARS-CoV-2 infection: The overlooked regulatory cascades implicated by the ACE2 gene cluster. 2020.

SIDHWANI, Santosh Kumar *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) polymorphisms and susceptibility of severe SARS-CoV-2 in a subset of Pakistani population. **Virology Journal**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2023.

SOUZA, Pedro FN *et al.* The human pandemic coronaviruses on the show: The spike glycoprotein as the main actor in the coronaviruses play. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 179, p. 1-19, 2021.

STANDL, Fabian *et al.* Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. e77, 2021.

- STRAFELLA, Claudia *et al.* Analysis of *ACE2* genetic variability among populations highlights a possible link with COVID-19-related neurological complications. **Genes**, v. 11, n. 7, p. 741, 2020.
- SURYA, Wahyu; LI, Yan; TORRES, Jaume. Structural model of the SARS coronavirus E channel in LMPG micelles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1860, n. 6, p. 1309-1317, 2018.
- SURYAMOHAN, Kushal *et al.* Human *ACE2* receptor polymorphisms and altered susceptibility to *SARS-CoV-2*. **Communications biology**, v. 4, n. 1, p. 475, 2021.
- SZABO, Roman *et al.* Type II transmembrane serine proteases. **Thrombosis and haemostasis**, v. 90, n. 08, p. 185-193, 2003.
- TAKEDA, Makoto. Proteolytic activation of SARS-CoV-2 spike protein. **Microbiology and immunology**, v. 66, n. 1, p. 15-23, 2022.
- TAY, Matthew Zirui *et al.* The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363-374, 2020.
- TCHESNOKOV, Egor P. *et al.* Mechanism of inhibition of Ebola virus RNA-dependent RNA polymerase by remdesivir. **Viruses**, v. 11, n. 4, p. 326, 2019.
- TOMAZINI, Bruno M. *et al.* Effect of dexamethasone on days alive and ventilator-free in patients with moderate or severe acute respiratory distress syndrome and COVID-19: the CoDEX randomized clinical trial. **Jama**, v. 324, n. 13, p. 1307-1316, 2020.
- TORRE-FUENTES, Laura *et al.* *ACE2*, *TMPRSS2*, and Furin variants and SARS-CoV-2 infection in Madrid, Spain. **Journal of medical virology**, v. 93, n. 2, p. 863-869, 2021.
- TREGONING, John S. *et al.* Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. **Nature reviews immunology**, v. 21, n. 10, p. 626-636, 2021.
- VARGAS-GANDICA, Jair *et al.* Ageusia and anosmia, a common sign of COVID-19? A case series from four countries. **Journal of NeuroVirology**, v. 26, n. 5, p. 785-789, 2020.

- VELAVAN, Thirumalaisamy P. *et al.* Host genetic factors determining COVID-19 susceptibility and severity. **EBioMedicine**, v. 72, p. 103629, 2021.
- WALLS, Alexandra C. *et al.* Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281-292. e6, 2020.
- WANG, Dawei *et al.* Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus–infected pneumonia in Wuhan, China. **jama**, v. 323, n. 11, p. 1061-1069, 2020.
- WANG, Ning *et al.* Subunit vaccines against emerging pathogenic human coronaviruses. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 298, 2020.
- WANG, Tong-Hong *et al.* PM2. 5 promotes lung cancer progression through activation of the AhR-TMPRSS2-IL18 pathway. **EMBO Molecular Medicine**, p. e17014, 2023.
- WANG, Yeming *et al.* Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. **The lancet**, v. 395, n. 10236, p. 1569-1578, 2020.
- WEISKOPF, Daniela; WEINBERGER, Birgit; GRUBECK-LOEBENSTEIN, Beatrix. The aging of the immune system. **Transplant international**, v. 22, n. 11, p. 1041-1050, 2009.
- WEISS, Robin A.; MCLEAN, Angela R. What have we learnt from SARS?. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1447, p. 1137-1140, 2004.
- WEN, Wen *et al.* Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19 : a meta-analysis. **Annals of medicine**, v. 54, n. 1, p. 516-523, 2022.
- WICHMANN, Dominic *et al.* Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19: a prospective cohort study. **Annals of internal medicine**, v. 173, n. 4, p. 268-277, 2020.
- WOO, Patrick CY *et al.* Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. **viruses**, v. 2, n. 8, p. 1804-1820, 2010.

WOO, Patrick CY *et al.* Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. **Journal of virology**, v. 86, n. 7, p. 3995-4008, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* Therapeutics and COVID-19: living guideline, 14 July 2022. **World Health Organization**, 2022.

WRAPP, Daniel *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**, v. 367, n. 6483, p. 1260-1263, 2020.

WU, Aiping *et al.* Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. **Cell host & microbe**, v. 27, n. 3, p. 325-328, 2020.

WU, Canrong *et al.* Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 10, n. 5, p. 766-788, 2020.

WU, Fan *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265-269, 2020.

WU, Fan *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265-269, 2020.

XIAO, Kangpeng *et al.* Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. **Nature**, v. 583, n. 7815, p. 286-289, 2020.

XU, Zhe *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **The Lancet respiratory medicine**, v. 8, n. 4, p. 420-422, 2020.

YADAV, Rohitash *et al.* Role of structural and non-structural proteins and therapeutic targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. **Cells**, v. 10, n. 4, p. 821, 2021.

YAN, Renhong *et al.* Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. **Science**, v. 367, n. 6485, p. 1444-1448, 2020.

- YANG, Yang *et al.* SARS-CoV-2 membrane protein causes the mitochondrial apoptosis and pulmonary edema via targeting BOK. **Cell Death & Differentiation**, v. 29, n. 7, p. 1395-1408, 2022.
- YEAGER, Curtis L. *et al.* Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. **Nature**, v. 357, n. 6377, p. 420-422, 1992.
- YOON, Soon Ho; LEE, Jong Hyuk; KIM, Baek-Nam. Chest CT findings in hospitalized patients with SARS-CoV-2: delta versus Omicron variants. **Radiology**, v. 306, n. 1, p. 252-260, 2023.
- YUAN, Jing *et al.* Monitoring transmissibility and mortality of COVID-19 in Europe. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 95, p. 311-315, 2020.
- ZAKI, Ali M. *et al.* Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 19, p. 1814-1820, 2012.
- ZHAN, Yuan *et al.* Efficacy of corticosteroid in patients with COVID-19: A multi-center retrospective study and meta-analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 7, p. 4292-4302, 2021.
- ZHANG, Jixiang *et al.* Risk factors for disease severity, unimprovement, and mortality in COVID-19 patients in Wuhan, China. **Clinical microbiology and infection**, v. 26, n. 6, p. 767-772, 2020.
- ZHANG, Qian *et al.* Human genetic and immunological determinants of critical COVID-19 pneumonia. **Nature**, v. 603, n. 7902, p. 587-598, 2022.
- ZHANG, Zhikuan *et al.* Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 4399, 2022.
- ZHOU, Fei *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054-1062, 2020.
- ZHOU, Peng *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **nature**, v. 579, n. 7798, p. 270-273, 2020.
- ZHOU, Shilin *et al.* SARS-CoV-2 E protein: pathogenesis and potential therapeutic development. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, p. 114242, 2023.

ZOU, Xin *et al.* Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor *ACE2* expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. **Frontiers of medicine**, v. 14, p. 185-192, 2020.

ANEXO I – CARTA DE CONCORDÂNCIA EM PARTICIPAÇÃO INSTITUTO DR. JOSÉ FROTA



TERMO DE ANUÊNCIA

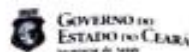
Eu, ROBERTO CÉSAR PONTES IZQUIERA,
 conheço o protocolo de pesquisa intitulado "IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES GENÉTICOS PARA ESTRATIFICAÇÃO PROGNÓSTICA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM COVID-19" desenvolvido pela pesquisadora Raquel C Montenegro, conheço seus objetivos e a metodologia que será desenvolvida, estando ciente de que a referida pesquisadora não irá interferir no fluxo normal deste Serviço.

Roberto Cesar Pontes Izquierda

Fortaleza, 28 de abril de 2020

Dr. Roberto Cesar Pontes Izquierda
 Diretor Médico - IJF
 CREMEC 5612

ANEXO II – CARTA DE CONCORDÂNCIA EM PARTICIPAÇÃO HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECCIOSAS



Carta de Anuência

Declaro ter lido e concordar com a realização da pesquisa intitulada: "IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES GENÉTICOS PARA ESTRATIFICAÇÃO PROGNÓSTICA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A COVID-19." de autoria de **Raquel C. Montenegro**, após o parecer ético emitido pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital São José de Doenças Infecciosas, conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Esta instituição está ciente de suas responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança de bem-estar.

Fortaleza, 27 de ABRIL de 2020

Assinatura e carimbo do responsável institucional

Francisco Edson Rubens Albuquerque
Diretor Geral - CREMEC 6274
HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECCIOSAS

ANEXO III – CARTA DE CONCORDÂNCIA EM PARTICIPAÇÃO LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICOS DO BRASIL (DASA)

Fortaleza, 06 de maio de 2020

DECLARAÇÃO DE CONCORDÂNCIA – DASA

Eu, Gustavo Aguiar Campana, Diretor Médico de Análises Clínicas do Laboratório Diagnósticos do Brasil – DASA, tenho conhecimento do trabalho intitulado IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES GENÉTICOS PARA ESTRATIFICAÇÃO PROGNÓSTICA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A COVID-19. Confirmando a participação da DASA na identificação de pacientes com diagnóstico de COVID, após consentimento destes, seguindo as exigências da Resolução 466/2012.

O laboratório não irá partilhar dados de pacientes que não consentirem a sua participação na presente pesquisa.



.....
Gustavo Aguiar Campana

ANEXO IV – RELATÓRIO DE VISITA TÉCNICA - LACEN



TÍTULO: RELATÓRIO DE VISTA TÉCNICA

AUDITORIA INTERNA DA QUALIDADE E BIOSSEGURANÇA – AIQB

Área/processo auditado: Verificação das instalações e infraestrutura dos LABORATÓRIOS do NPDM para realização do teste de amplificação de ácidos nucleicos - NAT para COVID 19	Data: 01/04/2020
---	-------------------------


EQUIPE AUDITORA

Auditor líder:

Nome

Assinatura

ELZA GADELHA LIMA


 Elza Gadelha Lima
 Coordenação da Qualidade

AUDITADOS

Nome

Cargo

Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho - participação online :)

Pesquisador

Dra. Raquel Carvalho Montenegro

Pesquisadora

Dra. Ana Rosa Quidute

Pesquisadora

Dra. Sítia Almeida

Pesquisadora

Dr. Diego Wilke

Pesquisador

Dr. Ronald Pinheiro

Pesquisador

Dra. Caroline Aquino Moreira-Nunes

Pesquisadora

Apoio Técnico:

Maisa Viana de Holanda Barros

Roberta Taiane Germano de Oliveira

Lais Lacerda Brasil de Oliveira

Carlos Roberto Paier

Islay Lima Magalhães

OBJETIVOS DA AUDITORIA

Verificar se todos os aspectos de infraestrutura e Biossegurança estão conformes para realização do teste de amplificação de ácidos nucleicos - NAT para COVID 19

PADRÃO NORMATIVO E REQUISITOS (CRITÉRIOS DA AUDITORIA)

NBR ISO IEC 17025:2017, NBR ISO 15189:2015, MANUAL DE BIOSSEGURANÇA; GUIA PARA A REDE LABORATORIAL DE VIGILÂNCIA DA INFLUENZA, 2016

AUDITORIA DE ENSAIO

Revisão 02 | 17/09/2018 | Página 1 de 2



TÍTULO: RELATÓRIO DE VISTA TÉCNICA

Ensaio auditado: Foi verificada apenas a infraestrutura (física (incluindo as condições de biossegurança) e equipamentos) do Laboratório.
NA

EVIDENCIAS	NÃO CONFORMIDADES-NC
<p>Foi evidenciado que todos os técnicos são capacitados para realizar testes de biologia molecular (RT-PCR)</p> <p>Foi evidenciado o monitoramento e registro das condições ambientais</p> <p>Foi evidenciado que os equipamentos e instrumentos de medição estão calibrados;</p> <p>Foram evidenciados os equipamentos necessários para a execução dos testes para COVID19 (Agitador tipo vortex; Centrífuga refrigerada; Pipetadores automáticos (P100, P200, P1.000); Freezer -20 °C; Freezer -70 °C; Cabine de Segurança Biológica Classe II B2 (4); Geladeira e automação em PRC em tempo real (2) Quanti, (2) 7500FAST) CSB Classe II B2 (4), autoclave)</p> <p>Foi evidenciada pressão negativa e porta com Inter travamento automático na sala de extração, assim como, antessala de paramentação.</p> <p>Foi evidenciado certificado de biossegurança pela CTNBIO e Manual de Biossegurança.</p> <p>Foi evidenciada Capela de Exaustão para uso de reagentes químicos (no caso a acetona)</p> <p>Foram evidenciadas áreas para extração, amplificação e detecção. (O fluxo de trabalho é realizado de forma adequada);</p>	<p>Não foram detectadas NC</p>

OBSERVAÇÕES E SUGESTÕES DE MELHORIAS

CONCLUSÕES DA AUDITORIA

Foi realizada visita técnica para verificar a infraestrutura dos LABORATÓRIOS DO NPDM para verificar a viabilidade de realização do teste de amplificação de ácidos nucleicos - NAT para COVID 19.

Não foram encontradas NC. Os laboratórios possuem as condições de infraestrutura adequadas para realizar os testes.

ANEXO V – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES GENÉTICOS PARA ESTRATIFICAÇÃO PROGNÓSTICA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A COVID-19 E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO SARS-CoV-2 NO ESTADO DO CEARÁ

NOME DO CENTRO DE PESQUISA: NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS/FACULDADE DE MEDICINA/ UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ.

NOME DO INVESTIGADOR PRINCIPAL: RAQUEL CARVALHO MONTENEGRO, PhD.

INFORMAÇÕES AO PARTICIPANTE DA PESQUISA

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. A pesquisa será conduzida por uma equipe de pesquisadores do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará. Antes que você decida fazer parte deste estudo é importante que leia com atenção as informações abaixo. Esta página e as próximas contêm informações sobre a sua participação no estudo. A equipe de pesquisadores responsáveis pelo estudo responderá qualquer dúvida que você possa ter. A participação no estudo é voluntária e depende exclusivamente da sua vontade e você está livre para retirar-se do mesmo a qualquer momento. Caso você concorde e forneça seu consentimento formal através de assinatura, você poderá participar do estudo. Portanto, se restar alguma dúvida, não assine este termo antes que esta dúvida seja devidamente esclarecida.

DESENHO DO ESTUDO E OBJETIVOS

O objetivo da pesquisa é verificar as possíveis mudanças do SARS-COV-2 para entender se ocorrem modificações nesse vírus ao longo do tempo. Além disso, queremos entender se mudanças entre as pessoas podem favorecer a entrada do vírus e/ou uma maior gravidade da doença. Essas mudanças podem ser úteis para a identificação de pessoas com maiores riscos de adoecerem e melhorar o tratamento de outras pessoas com a sua doença.

Para o estudo do vírus, sua participação no referido estudo será no sentido de permitir a coleta do seu material biológico (secreção do nariz e da garganta) com a introdução de um bastão tipo cotonete no nariz e na garganta (*swabs*) sendo realizado por pessoal treinado na referida coleta, e que mesmo assim poderá causar um leve desconforto (leve sensação de corpo estranho), mas que é essencial para o diagnóstico da doença.

Para o estudo da mudança de gravidade da doença entre as pessoas, pedimos sua autorização para que uma pessoa responsável e treinada colete 10 mL de sangue periférico, o que pode causar um leve ardor no local e ficar uma pequena mancha arroxeadada transitória. Você também contribuirá com o fornecimento de dados clínicos e seus sintomas relacionados à doença, preenchendo um questionário elaborado pelos pesquisadores, que terá duração de no máximo 10 minutos. Poderá

haver algum grau de constrangimento no fornecimento dos seus dados, mas fui informado que meu nome ou qualquer informação que revele minha identidade não será revelada em qualquer parte da pesquisa e que minha privacidade será respeitada e mantida em sigilo. Os pesquisadores envolvidos oferecerão apoio e amparo, mas os mesmos não são responsáveis pelo seu tratamento. Se houver alguma dúvida quanto às informações que você, participante da pesquisa, forneceu, haverá acesso ao conteúdo e você poderá solicitar mais esclarecimentos sobre o estudo. Você receberá uma via deste consentimento para guardar. Informamos que durante o desenvolvimento deste trabalho você não será identificado(a) e seu anonimato será garantido.

USO E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Gostaríamos de confirmar que seu material biológico será coletado e utilizado para esta pesquisa. Também gostaríamos de pedir sua autorização para guardarmos o restante do seu material biológico para que possamos utilizá-lo em pesquisas futuras. Seu material será guardado e conservado em local seguro e adequado no Biorrepositório do Laboratório de Farmacogenética do NPDM da Universidade Federal do Ceará – UFC sob a guarda da Professora Doutora Raquel Carvalho Montenegro.

Caso haja outro estudo no futuro você permite o uso de suas amostras.

____ SIM ____ NÃO

TEREI ALGUM BENEFÍCIO?

Este projeto de pesquisa não oferece benefícios diretos para você. O benefício principal de sua participação é possibilitar que no futuro, os resultados alcançados com este estudo, possam beneficiar outras pessoas. Se você tiver quaisquer dúvidas sobre os seus direitos como um sujeito de pesquisa ou sobre a ética do estudo, favor contatar o

Comitê de Ética em Pesquisa citado abaixo:

Comitê de Ética em Pesquisa (COMPEPE) da Universidade Federal do Ceará
Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000 – Rodolfo Teófilo
Telefone (85) 3366-8344, horário de atendimento 2ª às 6ª feiras das 8h00 às 12h00.

QUAIS OS POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS?

A possibilidade de qualquer tipo de risco para você pela utilização de seu material biológico nesta pesquisa é mínima. A retirada de sangue de sua veia, para que possamos utilizá-lo neste estudo pode resultar em dor no local da coleta ou manchas roxas transitórias.

EU SEREI DE ALGUMA FORMA, RESSARCIDO PELAS DESPESAS DECORRENTES DA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO?

Sua participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

POSSO DESISTIR DO ESTUDO A QUALQUER MOMENTO?

Sim, você é totalmente livre para desistir de participar em qualquer momento do estudo, não devendo temer quaisquer consequências negativas.

COMO AS INFORMAÇÕES SOBRE MIM SERÃO PROTEGIDAS PARA MANTER MINHA PRIVACIDADE?

De acordo com as leis brasileiras, seus registros médicos relacionados ao estudo serão mantidos sob o máximo sigilo permitido. Todos os materiais (amostras de sangue, por exemplo) serão utilizados somente para esta pesquisa. Qualquer pesquisa adicional com o seu material deve ser submetida e aprovada pelo comitê de ética.

CONSENTIMENTO FINAL DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

Concordo em participar deste estudo.

Eu declaro que é de livre e espontânea vontade que participo do estudo acima citado. Declaro também que li, entendi e não resta nenhuma dúvida em relação ao estudo. Fui informado sobre o objetivo e procedimentos do estudo, bem como das possíveis vantagens, desvantagens, eventos adversos e riscos previstos. Estou ciente que eu posso deixar de participar deste estudo a qualquer momento, sem nenhuma penalização.

Nome do participante da pesquisa	Data	Assinatura
Nome da pessoa que está obtendo o termo de consentimento	Data	Assinatura
Nome do Pesquisador Principal	Data	Assinatura

ANEXO VI – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA PROJETO BIOMARCADORES GENÉTICOS

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES GENÉTICOS PARA ESTRATIFICAÇÃO PROGNÓSTICA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A COVID-19 E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO SARS-Cov-2 NO ESTADO DO CEARÁ

Pesquisador: Raquel Carvalho Montenegro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 31453320.7.0000.5054

Instituição Proponente: Universidade Federal do Ceará/ PROPESQ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.029.490

Apresentação do Projeto:

O último boletim do Ministério da Saúde, aponta Fortaleza como a capital com a maior incidência de casos da COVID-19, possuindo 729/1 milhão de habitantes. A rápida evolução no contágio e a insuficiência de informações acerca da fisiopatologia da doença levam ao aumento exponencial do número de casos. A infecção pelo SARS-CoV-2 apresenta quadros de gravidade diversos o que sugere a influência de fatores genéticos no desfecho clínico desses pacientes. Estes podem estar associados a variante genética do vírus, ou seja, mutações em proteínas específicas do vírus já demonstraram tornar o vírus mais ou menos infectante, bem como polimorfismos no hospedeiro. Em estudos recentes foram observadas diferenças de frequência alélicas variantes do gene TMPRSS2 entre asiáticos e italianos, onde níveis mais altos de TMPRSS2, são mais frequentes da população italiana do que da população do leste asiático. Esta proteína facilita a ligação do vírus a membrana da célula do hospedeiro e, assim, polimorfismos nessa região podem influenciar a virulência e a gravidade da doença em diferentes populações. Para desencadear uma resposta antiviral, o sistema imune inato precisa reconhecer a invasão do vírus e, geralmente, isso acontece pelo

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVR E_E_ESCLARECIDO_COVID19_2020.pdf	13/05/2020 19:25:40	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_COVID_Comite_de_Etica_Raquel_v2.pdf	13/05/2020 19:24:09	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_CNPq.pdf	05/05/2020 22:34:31	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_COVID_Comite_de_Etica_Raquel.pdf	05/05/2020 22:33:46	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
Declaração do Patrocinador	FUNCAP_COVID.pdf	05/05/2020 22:32:10	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DISPENSA_DE_TCLE_COVID19_CEP_Raquel_2020.pdf	05/05/2020 22:31:36	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	CARTA_SOLICITANDO_APRECIACAO_COVID19_CEP_2020.pdf	05/05/2020 22:29:17	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
Outros	SESA_2020.pdf	05/05/2020 22:21:37	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
Outros	SisGen.pdf	05/05/2020 22:20:23	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
Outros	Hospital_SJ.pdf	05/05/2020 22:20:06	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
Outros	IJF_2020.pdf	05/05/2020 22:19:37	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
Declaração de concordância	TERMO_DE_COMPROMISSO_PARA_UTILIZACAO_DE_DADOS_COVID19_CEP_2020.pdf	05/05/2020 22:18:51	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
Orçamento	DECLARACAO_DE_ORCAMENTO_FINANCEIRO_COVID19_CEP_2020.pdf	05/05/2020 22:15:29	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DOS_PESQUISADORES_ENVOLVIDOS_NA_PESQUISA_COVID19_CEP_2020_FINAL.pdf	05/05/2020 22:12:41	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAO_DO_LOCAL_DE_REALIZACAO_DA_PESQUISA.pdf	05/05/2020 22:09:09	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_COVID19_CEP_2020.pdf	05/05/2020 22:06:12	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

ANEXO VII – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA PROJETO BIORREPOSITÓRIO

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: BIORREPOSITÓRIO PARA O ESTUDO DA COVID-19 NO ESTADO DO CEARÁ

Pesquisador: Raquel Carvalho Montenegro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 31246320.2.0000.5054

Instituição Proponente: Universidade Federal do Ceará/ PROPESQ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.024.941

Apresentação do Projeto:

A epidemiologia molecular tem por objetivo "definir, identificar, e monitorar espécies, subespécies e estirpes patogênicas relevantes por meio de tecnologia molecular e biologia evolutiva. Nesse sentido, estratificar pacientes de acordo com o seu diagnóstico, prognóstico e tratamento, baseado em polimorfismos genéticos e/ou as cepas circulantes no Estado, podem prever a evolução da COVID-19 de forma personalizada e, assim, reduzir as internações e os custos para o SUS, uma vez que diante da rápida disseminação do SARS-CoV-2, uma das preocupações correntes em todos os países afetados é a sobrecarga do sistema de saúde, uma vez que os pacientes que evoluem para quadros mais graves da doença necessitam de internação hospitalar e de ventilação mecânica por períodos prolongados contribuindo para a saturação dos hospitais. Portanto, o sequenciamento do vírus SARS-CoV-2 e conhecimento de alvos moleculares no hospedeiro são importantes para uma melhor compreensão das alterações no vírus e/ou no hospedeiro que possam influenciar no prognóstico e desfecho clínico dos pacientes com a COVID-19 no Estado. Nesse sentido, propomos a criação de um biorrepositório para acondicionar as amostras de RNA viral, DNA, RNA e soro dos pacientes.

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 4.024.941

Orçamento	DECLARACAO_DE_ORCAMENTO_FINANCEIRO_BIORREPOSITORIO_COVID_CEP_2020.docx	30/04/2020 21:06:44	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DOS_PESQUISADORES_COVID.doc	30/04/2020 21:02:04	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TERMO_DE_COMPROMISSO_BIORREPOSITORIO_COVID.docx	30/04/2020 20:52:40	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAO_DO_LOCAL_DE_REALIZACAO_DA_PESQUISA.docx	30/04/2020 20:47:58	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_BIORREPOSITORIO_COVID.docx	30/04/2020 20:46:37	Raquel Carvalho Montenegro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 13 de Maio de 2020

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador(a))