



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

**GENOTIPAGEM DE HLA PARA AVALIAÇÃO DE RISCO
DE INFEÇÃO POR SARS-CoV-2**

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa
Para obtenção do grau de mestre em Medicina Dentária

Por:

Raquel Silva Morais

Viseu, 2021



CATOLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

**GENOTIPAGEM DE HLA PARA AVALIAÇÃO DE RISCO
DE INFEÇÃO POR SARS-CoV-2**

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa
Para obtenção do grau de mestre em Medicina Dentária

Por:

Raquel Silva Morais

Orientador: Professora Doutora Raquel Monteiro Marques da Silva

Coorientador: Professora Doutora Maria José Correia

Viseu, 2021

“Success is the sum of small efforts, repeated day-in and day-out.”

Robert Collier

Dedico esta tese à minha mãe, que é e sempre foi o meu exemplo de superação. Com bastante esforço e dedicação, foi capaz de me proporcionar esta oportunidade para que eu conseguisse realizar este sonho. Tudo o que sou e no que me tornei devo-lhe a ela. Dedico também à minha avó Angelina que estará para sempre presente no meu coração, certamente, muito orgulhosa com esta minha conquista.

Agradecimentos

Todo o processo que envolve a realização de uma dissertação de mestrado inclui momentos desafiantes, difíceis de superar e de certa frustração. Porém, muitas destas ocasiões são ultrapassadas devido à ajuda de pessoas que nos são importantes e que nos incentivam a dar o nosso melhor. Deste modo, conseguir realizar este projeto só foi possível graças ao apoio incondicional de determinadas pessoas, a quem individualmente agradeço.

À minha orientadora, Professora Doutora Raquel Monteiro Marques da Silva, por todo o apoio e ajuda prestados durante este projeto. Agradeço pela sua dedicação, empenho e perfeccionismo depositados durante estes meses de trabalho e por toda a partilha de conhecimento que adquiri. É notável toda a sua sabedoria e experiência, que se tornaram essenciais para o desenvolvimento excelente deste trabalho.

À minha coorientadora, Professora Doutora Maria José Correia, por toda a disponibilidade e simpatia. Enalteço, igualmente, toda a sua sapiência e toda a ajuda ao longo destes quatro anos de aprendizagem.

À Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa, por me ter proporcionado uma educação de excelência com professores ilustres que me ensinaram o quão bonita consegue ser esta profissão. Agradecer, principalmente, por todo o esforço que foi feito durante esta pandemia para que a nossa formação não fosse muito afetada. Agradeço, igualmente, a todo o corpo não docente desta faculdade por todo o apoio, amizade e ajuda durante o meu percurso académico. Um agradecimento especial à D. Dália pela sua boa disposição e simpatia durante estes anos todos.

Às pessoas incríveis que conheci neste curso, em especial à Catarina, à Carolina, à Larissa e à Josefa, por todo o apoio e amizade. Por todas as gargalhadas e por todas as ocasiões extraordinárias que passámos juntas. Obrigada por estarem sempre presentes, tanto nos bons como nos maus momentos e por tornarem Viseu um local muito mais divertido. Sem dúvida que os laços de amizade criados ficarão para sempre.

Ao meu binómio, Ricardo, por toda a aprendizagem e companhia ao longo destes quatro anos, tanto a nível profissional, onde nos desafiámos mutuamente para crescermos e sermos cada vez melhores, como a nível pessoal, por todos os bons momentos que vivenciámos juntos. Agradeço por toda a ajuda e amizade.

À minha companheira de laboratório, Rita Marques, que sempre se mostrou disponível para me ajudar e ensinar tudo o que era necessário em relação à parte prática

deste projeto. A sua companhia foi fundamental para conseguir alcançar os meus objetivos. Agradecer também por toda a motivação que me deu e todo o apoio nos momentos mais difíceis.

Às minhas grandes amigas de Lisboa, em especial à Isa e à Marta, por acreditarem em mim e me terem dado força para embarcar nesta nova aventura, tão longe de casa. As saudades foram muitas, mas todas as chamadas, mensagens e visitas encurtaram a grande distância que nos separou durante este período.

Por fim, o agradecimento mais importante dedico-o à minha família. À minha mãe, que sempre me incentivou a seguir os meus sonhos, ajudando-me a concretizá-los. É o meu pilar e o meu maior exemplo de dedicação, amor e carinho. Mãe estaremos juntas para sempre, para toda a vida! À minha tia Paula, por todo o apoio e ajuda que foram fundamentais para a minha permanência em Viseu. A todos os outros familiares, nomeadamente, primos e tios, que sempre acreditaram em mim. E, por último, à minha avó Angelina, que mesmo não estando presente, foi e continuará a ser um grande exemplo de superação, determinação e coragem. Obrigada por tudo, Avó!

Agradeço também o financiamento do projeto Proteger* (CENTRO-01-02B7-FEDER-070086), cofinanciado por:



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional

Resumo

Introdução: Em dezembro de 2019, foi identificado um novo coronavírus na China. Este foi denominado SARS-CoV-2 e a doença associada designou-se COVID-19. Atualmente já são reconhecidos fatores de risco para o desenvolvimento de uma forma mais grave desta doença. No entanto, a gravidade desta não está apenas associada à infeção viral em si, mas também está relacionada com a resposta imunitária do hospedeiro ao SARS-CoV-2. Neste contexto, o sistema HLA tem um papel fundamental na regulação da resposta imune. Estão descritos diversos polimorfismos nos genes HLA associados a infeções virais, incluindo SARS-CoV-2.

Objetivos: Caracterizar uma população de Viseu com registo prévio de infeção por SARS-CoV-2 e genotipar os seus alelos HLA, para eventualmente identificar variantes genéticas de HLA associadas à infeção.

Materiais e Métodos: Estudo de investigação laboratorial com aplicação de um questionário e colheita de uma amostra biológica de saliva. Os participantes foram alunos e pacientes da Clínica Dentária Universitária da UCP e pacientes da JS Clínica Médica Lda., em Viseu. As amostras foram processadas para determinar a carga viral e identificar alterações nos genes HLA, de modo a relacionar estes polimorfismos com o grau de desenvolvimento de COVID-19.

Resultados: As frequências dos diferentes alelos HLA-A e HLA-B foram analisadas e comparadas entre populações. Os alelos HLA-A*02, HLA-B*44 e HLA-B*51 são os mais frequentes em Viseu e a nível nacional. A caracterização dos indivíduos previamente infetados com SARS-CoV-2 corrobora a diversidade de manifestações clínicas associadas. Foram identificados polimorfismos presentes nos genes HLA-A e HLA-B destes indivíduos.

Conclusão: Sabendo a grande influência do sistema HLA nas infeções virais, é imperioso incentivar pesquisas a nível populacional dos alelos HLA de suscetibilidade e de proteção face ao SARS-CoV-2 para que se consiga melhorar a atuação contra a propagação desta pandemia.

Palavras-chave: COVID-19, SARS-CoV-2, genotipagem de HLA, saliva, triagem de pacientes

Abstract

Introduction: In December 2019, a new coronavirus was identified in China. It was named SARS-CoV-2 and the associated disease COVID-19. Currently, risk factors for the development of a more severe form of this disease are already recognized. However, the severity is not only associated with the viral infection itself but is also related with the host's immune response to SARS-CoV-2. In this context, the HLA system plays a key role in the immune response's regulation. Several polymorphisms in HLA genes associated with viral infections, including SARS-CoV-2, have been described.

Aims: To characterize a population from Viseu with a previous record of SARS-CoV-2 infection and to genotype its HLA alleles, to eventually identify HLA genetic variants associated with SARS-CoV-2 infection.

Materials and Methods: Laboratory research study with questionnaire application and collection of a biological saliva sample. The participants were students and patients from the UCP University Dental Clinic and patients from JS Clínica Médica Lda., in Viseu. The samples were processed to determine viral load and identify changes in HLA genes, to relate these polymorphisms with the COVID-19 severity.

Results: The frequencies of the different HLA-A and HLA-B alleles were analyzed and compared between populations. The alleles HLA-A*02, HLA-B*44 and HLA-B*51 are the most frequent in Viseu and in Portugal. The characterization of individuals previously infected with SARS-CoV-2 corroborates the diversity of associated clinical manifestations. Polymorphisms present in HLA-A and HLA-B genes from these individuals were identified.

Conclusion: Knowing the wide influence of the HLA system on viral infections, it is imperative to encourage population-level research on HLA susceptibility and protection alleles against SARS-CoV-2 to improve the performance against the spread of this pandemic.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, HLA genotyping, saliva, patient screening

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. INFEÇÃO POR SARS-CoV-2	3
1.1.1. Estrutura do SARS-CoV-2	4
1.1.2. Resposta do Hospedeiro ao SARS-CoV-2	5
1.1.3. A COVID-19	6
1.1.4. Influência do Gênero na Suscetibilidade à COVID-19	6
1.1.5. Marcadores de Prognóstico	8
1.2. SISTEMA HLA	9
1.3. MÉTODOS DE GENOTIPAGEM	14
1.4. SALIVA COMO FLUÍDO BIOLÓGICO	15
1.5. OBJETIVOS	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1. TIPO DE ESTUDO	21
2.2. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	21
2.3. POPULAÇÃO E AMOSTRA	21
2.4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS AMOSTRAS	22
2.5. ANÁLISE BIOINFORMÁTICA	25
3. RESULTADOS	27
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	29
3.2. DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL	32
3.3. ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS DE HLA	32
3.4. IDENTIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE HLA	35
4. DISCUSSÃO	41
5. CONCLUSÃO	49
6. BIBLIOGRAFIA	53
7. ANEXOS	59

Índice de Figuras

Figura 1 Genoma do SARS-CoV-2 (adaptado de (7))	4
Figura 2 Representação génica do HLA e das respetivas classes (adaptado de (29))	9
Figura 3 Moléculas Classe I e Classe II (adaptado de (29))	10
Figura 4 Padrão de hereditariedade mendeliana dos HLA (adaptado de (32))	11
Figura 5 Procedimento Experimental de Extração de DNA	23
Figura 6 Frequência de Sintomas da 1ª Faixa Etária (18-39 anos)	30
Figura 7 Frequência de Sintomas da 2ª Faixa Etária (40-59 anos)	31
Figura 8 Frequência de Sintomas da 3ª Faixa Etária (≥ 60 anos)	32
Figura 9 Frequências de HLA-A em Viseu	33
Figura 10 Frequências de HLA-B em Viseu	34
Figura 11 Visualização do produto de PCR de HLA-A em gel de agarose 1%	35
Figura 12 Sequenciação de HLA-A, evidenciando os polimorfismos nas posições 882, 890, 895 e 899 (A), e 910, 920 e 932 (B)	36
Figura 13 Visualização do produto de PCR de HLA-B em gel de agarose 1%	37
Figura 14 Sequenciação HLA-B, evidenciando os polimorfismos nas posições 923, 927 e 930 (A) e 955 e 956 (B)	37

Índice de Tabelas

Tabela 1 Participantes sem diagnóstico prévio de SARS-CoV-2 por faixa etária e género	22
Tabela 2 Participantes diagnosticados previamente com SARS-CoV-2 por faixa etária e género	22
Tabela 3 Primers HLA.....	23
Tabela 4 Componentes da Reação de PCR	24
Tabela 5 Ciclo de Amplificação de HLA-A.....	24
Tabela 6 Ciclo de Amplificação de HLA-B	24
Tabela 7 Regiões do mundo com maior frequência de HLA-A*25, HLA-B*44 e B*46	34
Tabela 8 Polimorfismos HLA-A	36
Tabela 9 Polimorfismos HLA-B.....	38

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infecção por SARS-CoV-2

Em dezembro de 2019, foi identificado um novo coronavírus em Wuhan, na China. Este foi inicialmente denominado 2019-nCov pela Organização Mundial de Saúde (WHO), no dia 12 de janeiro de 2020. No entanto, o nome acabou por sofrer alterações no dia 11 de fevereiro de 2020 pelo Comitê Internacional de Classificação de Vírus, passando a designar-se como SARS-CoV-2 (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave - 2). A doença associada a este vírus foi nomeada como doença de coronavírus de 2019 (COVID-19), pela WHO (1).

Há evidência que este vírus tenha uma origem zoonótica (2) e a teoria mais aceite coloca a origem deste surto num mercado de marisco denominado Hunan. Assim, pressupôs-se que as pessoas com sintomas compatíveis com esta infecção viral tivessem comido determinados animais infetados ou tivessem visitado este mercado. Contudo, uma investigação feita *a posteriori* revelou que alguns dos indivíduos sintomáticos não tinham tido nenhum tipo de contacto com este mercado (3).

Tal como outros microrganismos respiratórios patogénicos, o SARS-CoV-2 pode disseminar-se tanto por meios diretos, ou seja, através de gotículas e da transmissão de pessoa para pessoa, quanto por contato indireto, a partir de possíveis objetos contaminados e contágio pelo ar (4). Os meios diretos de disseminação ocorrem principalmente através de gotículas respiratórias, quando uma pessoa infetada tosse, espirra ou fala. Estas gotículas podem alcançar até dois metros e permanecem no ar por um tempo limitado. No entanto, o diminuto tamanho das partículas deste vírus permite a sua suspensão no ar durante mais tempo do que seria expectável (5). Aquando do contacto indireto, se uma pessoa tocar numa superfície contaminada com SARS-CoV-2, e as suas mãos entrarem em contato direto com as membranas mucosas, tais como olhos, nariz ou boca, pode ocorrer a infecção por este vírus (3).

Para além das formas de disseminação acima relatadas, é relevante estudar a possível transmissão vertical de SARS-CoV-2 entre grávidas e os respetivos fetos. Há estudos que demonstram a presença de anticorpos da imunoglobulina M (IgM) para SARS-CoV-2 presentes no sangue dos recém-nascidos, o que pode comprovar esta possível transmissão (6). Também existe a possibilidade de transmissão de animais para humanos, embora ainda não tenha sido comprovada. Foi demonstrado que os gatos podem ser infetados com este vírus e transmiti-lo a outros gatos. Para além disso, outros animais, como cães e furões, são igualmente suscetíveis ao SARS-CoV-2 (3).

1.1.1. Estrutura do SARS-CoV-2

O vírus SARS-CoV-2 pertence à família dos coronavírus, vírus de RNA de cadeia simples de sentido positivo. Diversos testes demonstraram a afinidade da sua glicoproteína *spike* (S) com o recetor 2 da enzima conversora de angiotensina (ACE2), que atua como porta de entrada do vírus nas células.

O genoma do SARS-CoV-2 é semelhante ao dos coronavírus típicos e contém pelo menos dez grelhas de leitura (ORFs). As primeiras ORFs (ORF1a/b), cerca de dois terços do RNA viral, são traduzidas em duas grandes poliproteínas. No SARS-CoV e no MERS-CoV (Síndrome Respiratória do Médio Oriente), duas poliproteínas, pp1a e pp1ab, são processadas em 16 proteínas não estruturais (non-structural proteins ou nsp1-nsp16), que compõem o complexo replicase-transcriptase viral. Essas nsps reorganizam as membranas produzidas no retículo endoplasmático rugoso (RER) em vesículas de membrana dupla, onde ocorre a replicação e transcrição viral. As outras ORFs do SARS-CoV-2, localizadas num terço do genoma, codificam quatro proteínas estruturais principais: glicoproteína *spike* (S), proteína do envelope (E), nucleoproteína (N) e proteína de membrana (M) (Figura 1). Para além das descritas anteriormente, também são codificadas várias proteínas acessórias com funções desconhecidas que não participam na replicação viral (7). Em relação ao tamanho do genoma do SARS-CoV-2, é semelhante ao dos coronavírus supracitados (8).

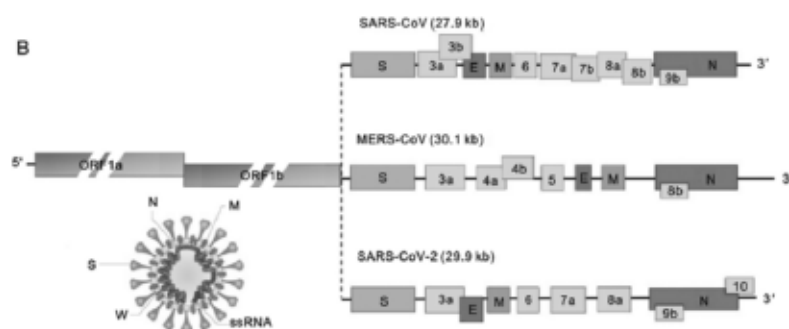


Figura 1 Genoma do SARS-CoV-2 (adaptado de (7))

Para a entrada do coronavírus nas células hospedeiras, a proteína S é determinante (9). Esta glicoproteína liga-se ao recetor celular, ACE2 para SARS-CoV e SARS-CoV-2. A entrada nas células é realizada por fusão direta da membrana entre o vírus e a membrana plasmática. Após a entrada do vírus nas células, o genoma do RNA viral é libertado no citoplasma e traduzido em poliproteínas e proteínas estruturais, resultando

na replicação do vírus (7). As glicoproteínas recém-formadas são introduzidas na membrana do retículo endoplasmático e a nucleocápside é formada pela combinação de RNA genómico e proteína N. Por fim, as vesículas que contêm as partículas virais fundem-se com a membrana plasmática para libertar o vírus (9).

1.1.2. Resposta do Hospedeiro ao SARS-CoV-2

Assim que o vírus entra nas células, os seus antígenos são apresentados às células do sistema imunitário e reconhecidos por linfócitos T citotóxicos específicos para vírus (CTLs). Como ainda não existem muitos estudos em relação ao SARS-CoV-2, são feitas associações com o SARS-CoV e MERS-CoV. A apresentação de antígenos do SARS-CoV depende principalmente das moléculas MHC I (Complexo Maior de Histocompatibilidade classe I), mas o MHC II também contribui para a sua apresentação (7). Este tópico será discutido com mais detalhe posteriormente nesta dissertação.

A apresentação de antígenos estimula a imunidade celular e humoral do hospedeiro, sendo mediada por células B e T específicas. Semelhante às infeções virais agudas comuns, o perfil de anticorpos contra o vírus SARS-CoV tem um padrão típico de produção de IgM e IgG. Os anticorpos IgM específicos para SARS desaparecem passado cerca de 3 meses, enquanto que os anticorpos IgG podem durar mais tempo, o que indica que podem desempenhar um papel protetor (10). Em relação à imunidade celular, os últimos estudos demonstram que o número de células T CD4⁺ e T CD8⁺ no sangue periférico de pacientes infetados com SARS-CoV-2 é significativamente reduzido (7).

Deste modo, neste tipo de patologia, a resposta imune do hospedeiro está associada ao curso da infeção, uma vez que se tem observado uma quantidade avultada de citocinas no sangue periférico de diversos indivíduos infetados. Esta quantidade elevada de fatores inflamatórios está diretamente associada a resultados desfavoráveis, podendo ser necessárias intervenções hospitalares. A infeção desencadeia uma resposta sistémica com hiper-inflamação que tem sido comparada a várias doenças inflamatórias. Estudos na população chinesa demonstraram que os principais preditores de prognóstico negativo são níveis aumentados de IL-6 (interleucina 6), fibrinogénio e consequente inflamação sistémica, que contribui para a mortalidade (11). De ressaltar que níveis elevados de IL-6 estão relacionados com a síndrome de dificuldade respiratória aguda (SDRA) e falência de múltiplos órgãos (12).

1.1.3. A COVID-19

O SARS-CoV-2 tem um período médio de incubação de 5,2 dias (13), e durante este intervalo não existem sintomas. Após este período, a doença começa por se manifestar através de sintomas inespecíficos, isto é, febre, tosse seca e cansaço, que podem ser relacionados com uma panóplia de doenças e infeções. Os sintomas podem acometer diversos sistemas no organismo humano, tais como, o respiratório (tosse, espirros, falta de ar, dor de garganta, rinorreia e hemoptise), o gastrointestinal (dispepsia, náuseas, vômitos e diarreia), o neurológico (dor de cabeça ou confusão) e o músculo-esquelético (dor muscular e cansaço) (3). Para além destes sintomas, este tipo de infeção viral também pode provocar alterações no olfato (anosmia) e no paladar (ageusia) (14).

Quanto à prevalência dos sinais e sintomas, os mais comuns são febre (83% – 98%), tosse (76% – 82%) e falta de ar (31% – 55%). Em certos indivíduos a doença pode progredir de tal maneira que é necessário o internamento hospitalar e ventilação mecânica. A maioria dos pacientes que desenvolvem SDRA devido ao SARS-CoV-2 agravam a sua condição clínica num curto período de tempo e morrem da falência de múltiplos órgãos (15).

No entanto, nem todos os indivíduos infetados desenvolvem sintomas, o que significa que os pacientes infetados com SARS-CoV-2 podem ser assintomáticos, apresentar uma sintomatologia ligeira, moderada ou severa, sendo que esta pode vir a ser fatal. A taxa de letalidade pode ser tão elevada quanto 10% (16).

Atualmente já são reconhecidos certos fatores de risco, como a idade, o género e a existência prévia de comorbilidades, para o desenvolvimento de uma forma mais grave desta doença (17). Os fatores de risco associados às comorbilidades estão relacionados com a expressão elevada de ACE2. Isto porque pacientes com diabetes mellitus, hipertensão, doenças cerebrovasculares e cardiovasculares necessitam de inibidores do sistema renina-angiotensina para controlar as condições pré-existentes. Estes inibidores levam a uma expressão elevada de ACE2, tornando-os vulneráveis para esta infeção ou piorando a sua condição (18).

1.1.4. Influência do Género na Suscetibilidade à COVID-19

Em relação ao género, os dados disponíveis descrevem diferenças na gravidade e na taxa de mortalidade entre homens e mulheres. Por exemplo, entre os casos confirmados na China, a taxa de infeção é igual, mas a taxa de mortalidade nos homens é de 4,7% em

INTRODUÇÃO

comparação com 2,8% nas mulheres. Da mesma forma, em Itália, é de 16,6% nos homens contra 9,1% nas mulheres (18). As possíveis causas associadas a esta diferença incluem a maior taxa de tabagismo em homens, sabendo que o uso do tabaco afeta a aptidão pulmonar e torna o indivíduo mais vulnerável a diversas doenças relacionadas com o sistema respiratório. De salientar que a taxa de tabagismo na população masculina é bastante superior nos países em desenvolvimento, igualando-se aquando dos países desenvolvidos (19).

Para além disso, também as comorbilidades supracitadas estão associadas a determinados comportamentos de risco, como por exemplo o consumo de álcool, igualmente mais prevalente no género masculino. Também existe maior prevalência de infeções no trato respiratório nos homens, devido a diferenças nas vias de imunidade inata durante as infeções virais, isto é, existem diferenças no número de células e na sua resposta funcional que depende da modulação dos recetores das hormonas esteróides (19). Deste modo, o estrogénio estimula o sistema imunológico nas mulheres, participando na regulação da sinalização celular, contribuindo para uma resposta imune mais específica. Para além disso, inúmeros estudos estabeleceram que o estrogénio, em concentrações fisiologicamente mais altas, inibe a síntese de várias citocinas pró-inflamatórias. Já a testosterona desempenha um papel imunossupressor e anti-inflamatório, ou seja, a ação desta leva a uma diminuição na imunidade adaptativa devido à função suprimida de células T auxiliares e, por consequência, à diminuição de respostas de anticorpos (18).

A localização de diversos genes da resposta imune no cromossoma X também interfere na resposta imune. Assim, neste contexto, qualquer tipo de mutação que afete estes genes pode alterar as respostas imunológicas e as vias de sinalização entre géneros (18).

Para além das razões apresentadas para este dimorfismo sexual, ainda se pode incluir a maior expressão de citocinas pró-inflamatórias nos homens, o que pode predispor a um aumento no risco de gravidade da COVID-19 para o género masculino (20).

Relativamente à idade dos indivíduos, sabe-se que, com o avanço da mesma, a prevalência das comorbilidades já abordadas é maior. Para além disso, este fator também tem bastante relevância no género masculino em relação ao nível de testosterona, já que esta diminui com a idade. Esta diminuição leva ao aumento da inflamação sistémica, bem como, ao aumento de marcadores pró-inflamatórios (21).

1.1.5. Marcadores de Prognóstico

Para além dos fatores de risco associados a esta infeção viral, existem determinados biomarcadores úteis no prognóstico do curso da mesma. Estes biomarcadores são parâmetros quantitativos utilizados clinicamente para estudar o desenvolvimento patológico desta doença (22). Os mais estudados são a proteína C reativa (CRP), a IL-6, a contagem de leucócitos, a lactato desidrogenase (LDH), o dímero-D, a contagem de plaquetas e os marcadores renais. Em relação à CRP é utilizada como biomarcador em diversas situações inflamatórias. É uma proteína produzida no fígado e induzida por mediadores inflamatórios, como por exemplo a IL-6. Os estudos referem que CRP elevada sugere um aumento da gravidade da COVID-19. A IL-6, uma citocina libertada por macrófagos, encontra-se igualmente aumentada nas manifestações mais graves desta doença. Já relativamente à contagem de leucócitos, valores desproporcionais destas células podem estar associados a infeções, e por isso, estar também associado a esta infeção viral (2). No que concerne à LDH, esta converte o piruvato em lactato e a sua secreção é desencadeada pela necrose das membranas celulares. Este acontecimento pressupõe uma infeção viral ou uma lesão pulmonar, semelhante à pneumonia induzida por este vírus. Assim, existem evidências científicas que interligam o aumento de LDH com o curso desta infeção (23). No que diz respeito à contagem de plaquetas, esta infeção viral promove alterações hematológicas severas que levam a trombocitopenia, ou seja, em casos graves desta doença o número de plaquetas encontra-se diminuído. Para além disso, também provoca alterações hemostáticas, provocando modificações na coagulação, onde o dímero-D se encontra aumentado. Este tem origem na lise de fibrina reticulada e valores aumentados são indicativos da ativação da coagulação e fibrinólise (2). Outros estudos demonstraram o aumento significativo dos marcadores renais nos casos mais graves desta infeção, tais como, a creatinina e a ureia sérica (24).

No entanto, a gravidade da doença não está apenas associada à infeção viral em si, mas também está relacionada com a resposta imunitária do hospedeiro ao SARS-CoV-2. A imunidade inata tenta suprimir o vírus através dos seus recetores de padrões moleculares associados a patogénios (PAMPs) e, em seguida, a resposta imune adaptativa, através das células T e B e da libertação de anticorpos, permite uma diminuição da carga viral (25).

1.2. Sistema HLA

Em 1980, Jean Dausset, George Davis Snell e Baruj Benacerraf ganharam o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina pela descoberta do Complexo Principal de Histocompatibilidade – MHC (*Major Histocompatibility Complex*). Foram os pioneiros pela descoberta de genes que codificam moléculas presentes na superfície celular dos linfócitos. O MHC é comum a todos os mamíferos, no entanto em humanos é designado por Antígeno Leucocitário Humano – HLA (*Human Leukocyte Antigen*) (26).

Este sistema participa na regulação da resposta imune, especificamente através do reconhecimento, processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos CD4⁺ através da sua classe II, ou aos linfócitos CD8⁺ pela sua classe I (27). Para além disso, permite que o sistema imunológico distinga os antígenos “*self*” dos “*não self*”, isto é, os antígenos do próprio indivíduo dos que têm origem em agentes exteriores. Estes genes são os mais polimórficos nos humanos, com uma grande variedade de alelos (cada variante de um gene polimórfico é chamada de alelo) que codificam péptidos funcionais. Esta variedade e heterozigosidade capacita o sistema imunológico contra uma grande diversidade de microrganismos e antígenos encontrados pelo hospedeiro (28).

O sistema HLA encontra-se localizado no braço curto do cromossoma 6 e os genes presentes podem ser divididos em 3 grupos distintos, denominados por genes de classe I, II e III. Nos genes de classe I estão englobadas as moléculas clássicas de histocompatibilidade HLA-A, HLA-B e HLA-C. Nos genes de classe II encontram-se as moléculas HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP. Por fim, os genes de classe III, embora não codifiquem moléculas de histocompatibilidade, contêm algumas moléculas que fazem parte do sistema imune, como é o caso das proteínas C4 e C2 e dos fatores de necrose tumoral (TNF- α e TNF- β) (Figura 2) (29).

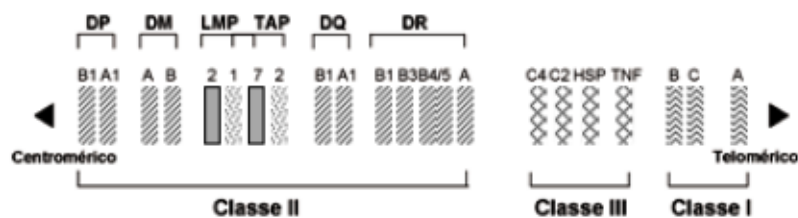


Figura 2 Representação genética do HLA e das respetivas classes (adaptado de (29))

As moléculas da classe I são formadas por duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente: as cadeias α e a β_2 -microglobulina. A cadeia pesada, cadeia α , como referido anteriormente, é codificada pelos genes HLA e contém 3 domínios: α_1 , α_2 e α_3 , sendo que os polimorfismos destas moléculas ocorrem preferencialmente nos primeiros dois domínios (Figura 3). Estes domínios são extracelulares e são compostos por cerca de 90 resíduos de aminoácidos. A cadeia leve, cadeia β_2 -microglobulina, é codificada por um gene localizado no cromossoma 15, não fazendo parte da região MHC. Estas moléculas são expressas por todas as células nucleadas. Os péptidos que se ligam a estas moléculas, com cerca de 8 a 12 aminoácidos, são produzidos no citosol através da ação dos proteassomas e unem-se na zona de ligação da molécula HLA no retículo endoplasmático. Aquando desta ligação dá-se a migração até à membrana da célula, onde este conjunto é apresentado aos linfócitos T CD8⁺ (29, 30).

As moléculas da classe II encontram-se expressas apenas na superfície de alguns tipos celulares, como é o caso das células apresentadoras de antígenos. São igualmente formadas por duas cadeias polipeptídicas: as cadeias α e β . Ambas codificadas por genes HLA altamente polimórficos, contendo cada uma dois domínios: α_1 e α_2 na cadeia α , e β_1 e β_2 na cadeia β (Figura 3). Nas moléculas HLA-DR os polimorfismos ocorrem no domínio β_2 . Já nas restantes moléculas (HLA-DQ e HLA-DP) os polimorfismos ocorrem preferencialmente nos domínios α_1 e β_1 . Os péptidos apresentados por estas moléculas contêm cerca de 15 a 24 aminoácidos. Aquando desta ligação são transportados até à superfície celular, onde este conjunto é apresentado aos linfócitos T CD4⁺ (29, 30).

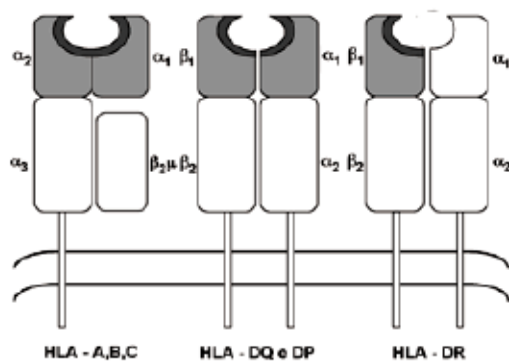


Figura 3 Moléculas Classe I e Classe II (adaptado de (29))

Ambas as classes de MHC são semelhantes quanto à sua estrutura, tendo três componentes distintas: a extracelular, encarregue da apresentação de antígenos às células

INTRODUÇÃO

T; a transmembranar, que assegura a posição na bicamada lipídica das membranas celulares; e a citosólica, que se situa no interior da célula e que transmite os sinais intracelulares (31).

Em relação à hereditariedade destes genes, os HLA raramente são separados por fenómenos de recombinação por se encontrarem muito próximos no genoma, ou seja, são considerados um haplótipo. Por esta razão, este “bloco HLA” é transmitido intacto do progenitor para o seu descendente. Se o indivíduo tem dois alelos idênticos nos dois cromossomas é considerado homocigótico, por sua vez, tendo dois alelos distintos é considerado heterocigótico. Esta última situação acaba por ser a mais frequente, visto que a distribuição dos alelos é variada numa mesma população. Estes genes são herdados de acordo com os padrões mendelianos, existindo uma codominância de alelos (Figura 4). Face ao apresentado, e considerando apenas os 3 genes representados na figura 4, há 25% de probabilidade de dois irmãos terem genotipicamente o mesmo HLA, 50% de probabilidade de partilharem um dos haplótipos e 25% de probabilidade de não partilharem qualquer haplótipo (32).

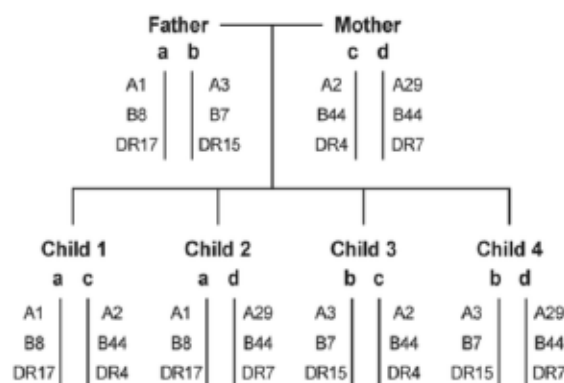


Figura 4 Padrão de hereditariedade mendeliana dos HLA (adaptado de (32))

Nos últimos anos, surgiu na literatura um grande número de estudos que associam os alelos HLA a doenças específicas. Assim, e com os desenvolvimentos recentes na tipagem de DNA, estes alelos têm sido cada vez mais estudados e sequenciados, permitindo obter informações bastante importantes para a comparação de populações e para os estudos de diferentes doenças (33).

Portugal está situado no extremo sul da Europa. Habitado desde o período Paleolítico, o território português foi fonte de diversos movimentos de diferentes povos, tais como, celtas, fenícios e inúmeros povos da bacia do Mediterrâneo. Os efeitos de todas estas migrações foram estudados com vários tipos de marcadores de DNA, como os alelos HLA

(34). Deste modo, estão descritas as frequências alélicas dos *loci* HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 na população portuguesa. Foram encontrados um total de 27 alelos de HLA-A, 43 de HLA-B e 36 de HLA-DRB1. Para os HLA-A, o alelo mais frequente na população portuguesa é o A*02:01:01, onde, de acordo com a nomenclatura dos HLA, o 02 corresponde ao grupo do alelo, o primeiro 01 corresponde à proteína HLA específica e o segundo 01 é usado para mostrar uma substituição de DNA sinónima dentro da região codificante (mutação silenciosa) (35). Este alelo foi encontrado em 26% das amostras, uma característica comum a muitas populações, especialmente nos caucasianos. Em relação aos alelos HLA-A*01:01:01 e HLA-A*03:01:01 aparecem em Portugal com frequências mais baixas do que noutras populações europeias. Nos alelos HLA-B, os mais frequentes são os HLA-B*44:03:01 e HLA-B*51:01:01. O primeiro aparece em frequências semelhantes em Marrocos e em Itália, mas tem uma prevalência mais baixa noutros países europeus e africanos. O segundo tem uma prevalência maior no norte de Itália e na Bulgária. Notar que o alelo HLA-B*27:08 é bastante raro e foi encontrado em açorianos e britânicos. Relativamente aos alelos de HLA-DRB1, os mais comuns são os HLA-DRB1*07:01:01, DRB1*03:01:01 e DRB1*04, com frequências típicas do Mediterrâneo e de outras populações europeias. É também conhecido que as frequências alélicas não apresentam uma distribuição homogénea nas diferentes regiões de Portugal (33).

Como supracitado, os HLA têm um papel fundamental na regulação da resposta imune, devido à apresentação de antigénios às células T. Os seus alelos têm uma grande influência na suscetibilidade ou resistência a diversas infeções virais como a hepatite, o HIV (vírus da imunodeficiência humana) e o SARS-CoV-1. Assim é importante o conhecimento destas variações genéticas para aferir a suscetibilidade das diferentes populações a estas infeções. Certos estudos defendem até que, para além de serem associadas à suscetibilidade ou resistência do hospedeiro, estão associadas ao aumento da severidade da doença propriamente dita (25).

Por exemplo, na infeção viral por SARS-CoV-1 foi descrito que os indivíduos da população asiática com o genótipo HLA-B*46:01 tinham sintomas mais severos do que os indivíduos com outros genótipos. Para além deste polimorfismo associado à suscetibilidade ao SARS-CoV-1, também os alelos HLA-B*07:03, HLA-DRB1*12:02 e HLA-Cw*08:01 estão associados à suscetibilidade à infeção. Como polimorfismos protetores contra a infeção por SARS-CoV-1 foram descritos os seguintes: HLA-DR*03:01, HLA-Cw*15:02 e HLA-A*02:01 (7).

INTRODUÇÃO

No caso do SARS-CoV-2, as variações presentes nos alelos HLA também podem afetar o curso da infecção viral. Num estudo feito na população chinesa, alguns alelos foram identificados com mais frequência em pacientes infetados com SARS-CoV-2 em comparação com indivíduos saudáveis. Assim, os alelos HLA-C*07:29, C*08:01G, B*15:27, B*40:06, DRB1*04:06 e DPB1*36:01, poderão estar associados a uma possível suscetibilidade a este vírus. Por outro lado, os alelos DRB1*12:02 e DPB1*04:01 tiveram uma frequência menor nos pacientes infetados do que na população controlo, podendo estar associados à resistência a este vírus (1). Num estudo feito na população italiana, associaram os seguintes alelos à suscetibilidade e incidência de SARS-CoV-2: HLA-A*25, B*08, B*44, B*15:01, B*51 e C*01 e C*03. Por sua vez, identificaram HLA-B*14, B*18 e B*49 como alelos de proteção para esta infecção viral (36).

Num estudo realizado nas Ilhas Canárias, em Espanha, os autores identificaram igualmente certos alelos com frequências diferentes em indivíduos saudáveis em comparação com indivíduos infetados com SARS-CoV-2. Nos indivíduos saudáveis encontrava-se com maior frequência o alelo HLA-A*32. Nos indivíduos infetados encontravam-se com maior frequência os alelos HLA-A*03, HLA-B*39 e o HLA-C*16. Em relação à gravidade da doença, os alelos HLA-A*11, HLA-C*01 e o HLA-DQB1*04 apresentavam uma frequência mais elevada nos pacientes que não sobreviveram a esta infecção em comparação com os que sobreviveram (37).

As frequências alélicas observadas variam muito entre diferentes regiões, o que pode influenciar a identificação de determinados alelos de risco nos diversos estudos. Isto porque, estas associações podem não se verificar devido à diferente representatividade dos alelos noutras populações. Assim, é fundamental que cada população desenvolva estudos para identificar os alelos de suscetibilidade ou de proteção mais prevalentes na sua região. Como por exemplo, o alelo HLA-B*46:01, para além de estar relacionado com o SARS-CoV-1, certos estudos na China associaram-no igualmente à suscetibilidade ao vírus SARS-CoV-2. Este alelo é bastante frequente na população chinesa, mas num estudo feito na população espanhola, a representação alélica deste polimorfismo foi quase nula (25). Neste mesmo estudo, foram identificados alelos teoricamente de proteção para esta infecção viral, tais como o HLA-B*15:03 e o HLA-A*25:01.

1.3. Métodos de Genotipagem

A genotipagem é o processo de obtenção do genótipo de um indivíduo para um determinado estudo ou diagnóstico. A sequenciação do genoma humano e o seu mapeamento oferecem a possibilidade de estudar fatores genéticos importantes, bem como, características genéticas complexas. Estes estudos do genoma podem ser feitos a partir de uma abordagem ampla, ou seja, sem assumir que uma determinada região possa ter maior probabilidade de abrigar o fator genético em questão, ou a partir de uma abordagem específica, para um ou mais genes estipulados, usando conhecimento biológico para selecionar as partes do genoma em estudo (38, 39).

De acordo com Pui-Yan Kwok, o método de genotipagem ideal deve ter as seguintes características: os testes devem ser acessíveis, automatizados e desenvolvidos rapidamente a partir de informações de sequência, e os custos de desenvolvimentos dos estudos devem ser baixos, bem como o custo total dos testes por genótipo. Isto inclui equipamentos, reagentes e mão de obra. A reação deverá ser robusta, de maneira que mesmo as amostras menos confiáveis produzam bons resultados. O formato da reação deve ser adaptável e versátil, para se conseguir realizar diversos testes por dia, e a análise dos dados deve ser simples e precisa (38).

O método mais utilizado para estudar alterações genéticas por sequenciação é o método de Sanger. Contudo, este método tem limitações a nível de rendimento e precisão quando comparado com os sistemas de sequenciação de nova geração (NGS). No método de Sanger, a amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) é específica para um determinado *locus* e é seguida de uma reação de sequenciação que origina diversos fragmentos de DNA de tamanhos diferentes marcados com fluorescência. Estes fragmentos são depois analisados por eletroforese capilar. Por sua vez, o sistema NGS permite que sejam sequenciados vários genes ou até mesmo todo o genoma em simultâneo. Para além disso, a sequenciação pelo primeiro método deteta sinais de ambos os alelos de um indivíduo heterozigótico, podendo gerar ambiguidades. Já o segundo método lê moléculas singulares de cada alelo separadamente (40).

A genotipagem pode envolver alguns erros técnicos e estes tendem a reduzir o poder estatístico dos estudos. Sabe-se à partida que nenhum sistema de genotipagem é infalível e perfeito. Assim, é de extrema importância preceder à análise de deteção de erros dos genótipos esperados. Por exemplo, em estudos em que são utilizados genótipos de uma determinada família, primeiro deve-se garantir que os genótipos esperados estão

atribuídos aos indivíduos corretos e que as relações familiares dos mesmos são corretamente especificadas. Caso tal não aconteça, os genótipos esperados podem parecer errôneos porque os indivíduos terão genótipos inconsistentes com as suas relações genéticas (41).

1.4. Saliva como Fluido Biológico

A cavidade oral oferece um ambiente húmido e quente com nutrientes provindos do hospedeiro, que permite a sobrevivência de inúmeros tipos de microrganismos. Este ecossistema tão complexo e diversificado tem extrema importância na promoção e manutenção da saúde oral. Um dos fatores que tem um papel preponderante na homeostase oral é a saliva (42).

A saliva contribui para a formação de uma película que adere ao esmalte e à mucosa oral. Esta película cobre os tecidos moles e os dentes na cavidade oral, e ajuda na modelação da adesão primária e da colonização dos microrganismos. Por um lado, a saliva ajuda na eliminação de microrganismos da cavidade oral, e, por outro lado, fornece nutrientes às bactérias colonizadoras, degradando lípidos e proteínas (42).

A saliva provém dos vários tipos de glândulas salivares, sendo que cada uma delas secreta saliva com composição e características distintas. As secreções dessas glândulas têm uma composição complexa e são alteradas por diferentes condições, tais como, a hora do dia (influência do ritmo circadiano), a dieta, a idade, o sexo, uma variedade de estados de doença e vários agentes farmacológicos. A saliva total é um fluido misto derivado predominantemente dos 3 pares de glândulas salivares principais: as glândulas parótida, submandibular e sublingual. A atividade destas glândulas é responsável por aproximadamente 90% do volume salivar total, sendo o restante proveniente das glândulas salivares *minor* localizadas em várias regiões da mucosa oral (43).

É um líquido de cor clara, com um pH ligeiramente ácido, e é constituída por 99% de água, com componentes orgânicos e componentes inorgânicos. Os componentes orgânicos incluem: ureia, ácido úrico, glicose, colesterol, ácidos gordos, triglicéridos, lípidos, glicolípidos, aminoácidos, hormonas esteróides e proteínas. Por sua vez, os componentes inorgânicos incluem diversos iões, tais como, Ca^{2+} , K^+ , HCO_3^- , H_2PO_4^- , Na^+ , Cl^- , I^- , Mg^{2+} e F^- (43).

Graças às suas diversas características e componentes a saliva é utilizada como amostra biológica para diagnóstico de inúmeras doenças e pressupõe-se que as alterações

observadas na mesma sejam indicativas do estado de saúde do paciente. A saliva pode ser recolhida com ou sem estimulação. As duas melhores formas de colheita sem estimulação são o método de *drooling*, onde se acumula a saliva na boca e deixa-se escorrer através do lábio inferior, e o método de *spitting*, em que a pessoa deve expetorar saliva para um tubo. A utilização de saliva como amostra biológica oferece numerosas vantagens, nomeadamente, ser um procedimento de recolha relativamente simples, não invasivo, mais confortável para os indivíduos, com a possibilidade de recolha em qualquer lugar e de auto-recolha, e é considerado um procedimento mais barato (43). Também tinha como vantagem diminuir o risco potencial de transmissão de doenças infecciosas do paciente, quando comparada com outros biofluidos como o sangue, mas atualmente com a pandemia do SARS-CoV-2 tal já não se verifica, uma vez que a saliva é uma fonte de partículas infecciosas.

Vários estudos descrevem que se consegue obter DNA de alta qualidade e quantidade de amostras de saliva. No entanto, a utilização desta amostra biológica está associada a algumas complicações. Como por exemplo, a variação do método de recolha utilizado pode levar à obtenção de diferentes volumes de amostra, o que possibilita igualmente uma variação de quantidade de DNA presente nas mesmas. Para além disso, a saliva contém uma variedade de compostos e enzimas com potencial para degradar proteínas e ácidos nucleicos. Assim, se as amostras forem guardadas ou transportadas à temperatura ambiente, a atividade destes compostos pode afetar o DNA extraído. Também como já foi referido, os fluidos orais contêm uma grande quantidade de microrganismos e, portanto, as estimativas da concentração do DNA na saliva podem ser superestimadas pois incluem DNA humano e DNA microbiano (44).

Um dos problemas associados à utilização de saliva como amostra biológica é o volume necessário para permitir o isolamento de DNA em quantidade e qualidade suficientes para análises genéticas, nomeadamente NGS. Normalmente, para a maioria das faixas etárias, a recolha de um volume significativo é bastante simples e relativamente rápida. No entanto, existem algumas exceções. A recolha de saliva de bebés, crianças pequenas com menos de 6 anos ou pessoas com necessidades especiais resulta em volumes de amostra diminuídos, uma vez que os mesmos têm dificuldade em cuspir ou deixar acumular saliva na boca sem engolir. Por outro lado, nos idosos esta recolha pode ser deveras demorada ou pode nem sequer acontecer. Estes acontecimentos estão associados a um efeito secundário de vários medicamentos que leva a uma condição denominada de xerostomia (boca seca) (44).

INTRODUÇÃO

Outra dificuldade nestas recolhas prende-se com o armazenamento das mesmas. Em condições normais, após a recolha das amostras salivares, estas devem ser mantidas no frio, e, posteriormente, congeladas. Assim, consegue-se manter a integridade das amostras, evitar a degradação de alguns componentes da saliva e restringir a atividade enzimática e o crescimento de bactérias. Notar que quando se faz a extração de DNA não se diferencia o DNA humano do microbiano, o que ressalta a importância do congelamento das amostras (44). Contudo, face às vantagens apresentadas, a recolha de saliva como amostra biológica continua a ser um método de obtenção de DNA bastante utilizado com resultados fidedignos.

1.5. Objetivos

Os objetivos principais desta dissertação são caracterizar uma população de Viseu com indicação prévia de infecção por SARS-CoV-2 e genotipar os alelos HLA destes indivíduos, para eventualmente identificar variantes genéticas de HLA associadas a esta infecção.

No âmbito dos objetivos secundários a identificação de fatores de risco imunogenéticos associados à COVID-19 poderá contribuir para melhorar a triagem de pacientes, possibilitando uma gestão mais efetiva dos pacientes no Sistema Nacional de Saúde em geral, e na Clínica Dentária Universitária em particular.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Tipo de Estudo

Este estudo de investigação laboratorial consistiu na aplicação de um questionário aos participantes selecionados, para recolha de dados demográficos e clínicos, e na colheita de uma amostra biológica de saliva. De notar que, para o desenvolvimento deste estudo, foi obtida a aprovação da Comissão de Ética para a Saúde da Universidade Católica Portuguesa (CES-UCP) (anexo I).

2.2. Considerações Éticas

Todos os participantes foram informados e esclarecidos sobre os objetivos deste estudo e da sua participação, sendo esta voluntária e sem remuneração. Para além disso, os participantes deste estudo leram e assinaram um termo de consentimento informado (anexo II), onde autorizaram a recolha e utilização da amostra biológica, bem como dos dados do questionário (anexo III), para o desenvolvimento deste trabalho. Os dados obtidos do questionário utilizado foram tratados de forma confidencial e pseudoanonimizada.

2.3. População e Amostra

Na realização deste estudo participaram pacientes e alunos da Clínica Dentária Universitária da Universidade Católica Portuguesa, bem como pacientes da JS Clínica Médica Lda., em Viseu. Os participantes, após lerem e assinarem o consentimento informado, responderam ao questionário utilizado onde, para além de perguntas de carácter geral, se encontravam perguntas do foro médico. Estas tiveram como objetivo o despiste de patologias com uma possível implicação na suscetibilidade à infeção viral por SARS-CoV-2, tais como a diabetes mellitus e as doenças cardiovasculares.

Após o preenchimento deste questionário, os participantes doaram uma amostra de saliva num ambiente devidamente controlado e respeitando todas as normas da Direção Geral de Saúde sobre a prevenção e controlo de infeção por SARS-CoV-2. Estas amostras foram recolhidas através do método de *spitting* de acordo com um protocolo para colheitas de amostras biológicas, desenvolvido no SalivaTec (UCP) (anexo IV). Para estas

colheitas foram utilizados tubos corretamente identificados, selados com parafilme e devidamente desinfetados antes de serem colocados no contentor secundário.

Neste estudo, só foram incluídas pessoas com mais de 18 anos de idade. Foi efetuada a amostragem em 60 participantes sem diagnóstico prévio de SARS-CoV-2. Estes encontram-se agrupados de acordo com diferentes faixas etárias e de acordo com o género, como se pode verificar na Tabela 1.

Tabela 1 Participantes sem diagnóstico prévio de SARS-CoV-2 por faixa etária e género

Idade	Género	Número de Pacientes
18 - 39	Feminino	10
	Masculino	10
40 - 59	Feminino	10
	Masculino	10
≥ 60	Feminino	10
	Masculino	10

Como comparação, foi efetuada a amostragem em 42 participantes com diagnóstico prévio desta infeção viral. Estes encontram-se agrupados de acordo com diferentes faixas etárias e de acordo com o género, como se pode verificar na Tabela 2.

Tabela 2 Participantes diagnosticados previamente com SARS-CoV-2 por faixa etária e género

Idade	Género	Número de Pacientes
18 - 39	Feminino	10
	Masculino	9
40 - 59	Feminino	4
	Masculino	8
≥ 60	Feminino	6
	Masculino	5

2.4. Caracterização Molecular das Amostras

As amostras foram processadas para determinar a carga viral, bem como identificar alterações genéticas nos genes HLA, de modo a relacionar estes polimorfismos com o grau de desenvolvimento de COVID-19. Para a carga viral, foram efetuados testes em formato *pool*. Isto é, foi misturada a saliva de 10 participantes e, após esta mistura, foram extraídos os ácidos nucleicos. O RNA viral foi amplificado por RT-PCR (CFX96™ Real-Time System, BIO-RAD) com recurso ao kit comercial FOSUN e de acordo com as

instruções do fabricante (Shanghai Fosun Long March Medical Science CO., Ltd, Shanghai, China), de modo a determinar a presença ou ausência do vírus. Assim, foram efetuados 6 testes por *pool* para contemplar os 60 participantes sem diagnóstico prévio de infecção por SARS-CoV-2.

Para identificar alterações nos genes HLA, as amostras biológicas de saliva foram previamente tratadas com QuickExtract™ DNA Extração Solution (Buffer QE) para provocar a lise celular e, conseqüentemente, libertar o DNA dessas células (Figura 5).



Figura 5 Procedimento Experimental de Extração de DNA

As reações de amplificação do DNA do hospedeiro foram feitas por PCR convencional (CFX Connect™ Real-Time System, BIO-RAD), usando *primers* específicos para os genes alvo, a região dos exões 3 dos HLA-A e HLA-B, que se encontram disponíveis na Tabela 3.

Tabela 3 Primers HLA

Locus/Alelo	Primers
HLA-A exão 3	F (5' GGGACCGGAACACACGGAATG 3') R (5' TGTGGTCCCAATTGTCTCCCCTC 3')
HLA-B exão 3	F (5' GGGGCCAGGGTCTCACA 3') R (5' CCCACTGCCCTGGTACC 3')

Para a amplificação das regiões genômicas alvo, os componentes de cada reação de PCR foram adicionados pela ordem descrita na Tabela 4. Numa fase seguinte, as amostras foram colocadas no termociclador de acordo com os ciclos de amplificação apresentados na Tabela 5 e Tabela 6.

O procedimento de PCR envolve três etapas principais, correspondendo às diferentes temperaturas utilizadas nos ciclos. O primeiro passo corresponde à etapa da desnaturação, aqui o DNA é desnaturado por aquecimento a 95°C e as duas cadeias de DNA separam-se. O segundo passo corresponde ao *annealing*, onde os *primers* escolhidos vão complementar as cadeias de DNA do gene que se quer amplificar. A temperatura deste passo varia consoante a sequência dos *primers*. O terceiro e último passo corresponde à

GENOTIPAGEM DE HLA PARA AVALIAÇÃO DE RISCO DE INFECÇÃO POR SARS-COV-2

extensão, onde a enzima Taq DNA Polimerase, presente na Green MasterMix, realiza a extensão dos primers, sintetizando novas cadeias de DNA. Esta etapa é feita a 72°C. Esta sequência de passos é repetida 35 vezes.

Tabela 4 Componentes da Reação de PCR

Componentes	Volume por Reação
Green MasterMix (NZYTaQ II)	10 µL
Primer F (2µM)	1 µL
Primer R (2µM)	1 µL
DNA	8 µL
Volume Final	20 µL

Tabela 5 Ciclo de Amplificação de HLA-A

HLA-A		
1x	95.0°C	10:00
	95.0°C	0:30
5x*	70.0°C	1:00
	72.0°C	1:00
1x	72.0°C	10:00

*Estes cinco ciclos foram repetidos para temperaturas de *annealing* decrescentes, de 2 em 2 graus até aos 58°C, perfazendo 35 ciclos.

Tabela 6 Ciclo de Amplificação de HLA-B

HLA-B		
1x	95.0°C	10:00
	95.0°C	0:30
35x	60.0°C	1:00
	72.0°C	1:00
1x	72.0°C	10:00

No final de cada reação, 10µL foram separados por eletroforese (PowerPac 300, BIO-RAD) em gel de agarose a 1%, de forma a verificar a amplificação do produto esperado, e os outros 10µL foram enviados para sequenciação. A preparação de cada gel de agarose a 1% incluiu 60 mL de TAE diluído com água destilada a partir do stock 50X TAE Buffer (Omega Bio-tek, Norcross), 0.6g de agarose (GeneOn GmbH, Alemanha) e 2µL de GreenSafe Premium (NZYTech, Lda., Portugal), um corante utilizado na deteção de ácidos nucleicos. No primeiro poço de cada gel foi carregado o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech, Lda., Portugal).

A sequenciação destes fragmentos foi feita a partir do método de Sanger. E, após a mesma, os polimorfismos encontrados foram sujeitos a análise bioinformática recorrendo à plataforma Geneious Prime (2021.1.1, <https://www.geneious.com>).

2.5. Análise Bioinformática

Para a análise de frequências de HLA em Portugal, mais especificamente na região de Viseu, foi utilizada uma base de dados internacional referente a diversas frequências alélicas (<http://www.allelefrequencies.net/default.asp>) (45).

Para a análise de frequências das populações mundiais foi utilizada a mesma base de dados e os alelos selecionados associados a SARS-CoV-2 foram os HLA-A*25, HLA-B*44 e B*46 visto se encontrarem descritos na literatura como alelos de suscetibilidade a esta infeção viral.

Na análise de sequências, as sequências dos alelos HLA humanos foram importadas do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para a plataforma Geneious Prime, onde foram alinhadas com as sequências das amostras do estudo com o software Clustal Omega. Após a análise de possíveis polimorfismos, cada sequência foi comparada com as já depositadas nas bases de dados para identificar os alelos. Esta etapa foi efetuada a partir de uma ferramenta de pesquisa de nucleótidos denominada BLAST, integrada na base de dados IPD-IMGT/HLA (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>) (46).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização da Amostra

No total, a população em estudo consistiu em 102 indivíduos, dos quais 60 sem diagnóstico prévio de SARS-CoV-2 e 42 com indicação de infecção anterior pelo novo coronavírus. Os indivíduos foram divididos em 3 faixas etárias, como descrito anteriormente nos métodos, de forma a poder avaliar o efeito da idade na sintomatologia apresentada. No que concerne aos questionários dos 60 participantes sem diagnóstico prévio de SARS-CoV-2, constatou-se que, na primeira faixa etária, os 20 participantes tinham idades compreendidas entre os 21 e os 37 anos. Todos os participantes do género feminino tinham nacionalidade portuguesa. Para além disso, destacou-se a ausência de complicações médicas neste mesmo género. No género masculino, sete dos participantes eram de nacionalidade portuguesa, um de nacionalidade espanhola, um de nacionalidade italiana e um de nacionalidade brasileira. Notar que um dos indivíduos portugueses estava diagnosticado com uma doença cardíaca, neste caso uma arritmia cardíaca. Nenhum destes integrantes do estudo se encontrava vacinado contra esta infecção viral.

No que diz respeito à segunda faixa etária, dos 40 aos 59 anos, nove dos participantes do género feminino eram de nacionalidade portuguesa e um de nacionalidade brasileira. Esta última tinha como fator de risco uma doença respiratória (asma). Para além disso, duas participantes portuguesas tinham hipertensão arterial, outra participante tinha sinusite e, por fim, uma outra estava diagnosticada com doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC). Nenhuma se encontrava vacinada contra o SARS-CoV-2. No género masculino, todos os participantes eram de nacionalidade portuguesa. Dois dos participantes tinham hipertensão arterial, sendo que um deles sofria também de arritmia cardíaca. Apenas um estava vacinado com a primeira dose da vacina AstraZeneca contra esta infecção viral.

Quanto à terceira e última faixa etária, que incluiu pessoas com mais de 60 anos, e referente ao género feminino, 9 das participantes eram de nacionalidade portuguesa e uma de nacionalidade brasileira. Cinco das participantes de nacionalidade portuguesa tinham hipertensão arterial. Uma das participantes com hipertensão arterial tinha também colesterol elevado e diabetes mellitus tipo II, e outra sofria de insuficiência cardíaca para além de hipertensão. Nenhuma participante do género feminino se encontrava vacinada contra o SARS-CoV-2. No género masculino todos os participantes eram de nacionalidade portuguesa. Dois indivíduos tinham hipertensão arterial, outro tinha

colesterol elevado, outro tinha um bloqueio atrioventricular, outro tinha como patologias clínicas hipertensão, arritmia cardíaca e diabetes mellitus tipo II, e, por fim, um outro padecia de diabetes mellitus tipo II. Apenas um dos participantes se encontrava vacinado com as duas doses da vacina BioNTech-Pfizer contra este vírus.

Por sua vez, em relação aos questionários efetuados aos 42 participantes com diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2, constatou-se que, na primeira faixa etária 10 dos participantes eram do género feminino e 9 do género masculino, todos de nacionalidade portuguesa. As idades variaram entre os 21 e os 39 anos. Para além disso, ainda nenhum tinha sido vacinado contra esta infeção viral. De ressaltar que uma participante do género feminino tinha como doença associada diabetes mellitus tipo I e, por sua vez, um participante do género masculino tinha asma. Neste grupo, todos os indivíduos desenvolveram sintomas ligeiros a moderados referentes à COVID-19, destacando-se que os sintomas mais frequentes para as mulheres foram as dores musculares e anosmia, e que, para os homens, foram as dores de cabeça, cansaço e dores musculares (Figura 6).

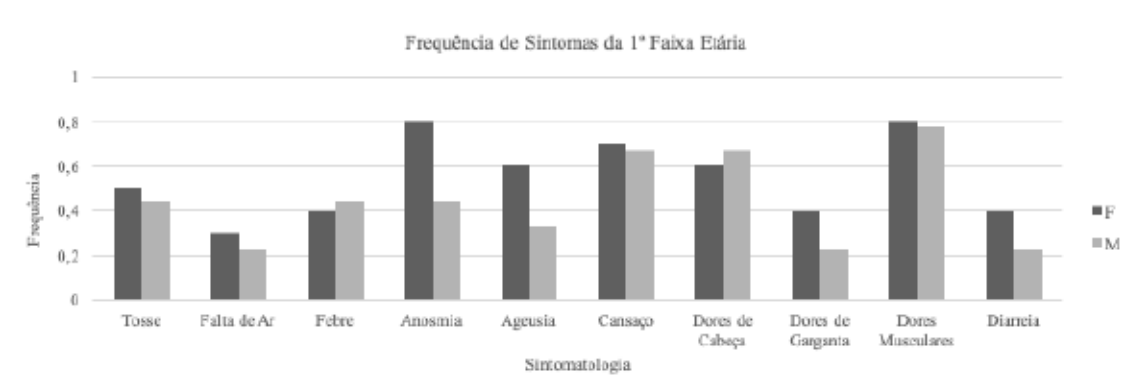


Figura 6 Frequência de Sintomas da 1ª Faixa Etária (18-39 anos)

No que diz respeito à segunda faixa etária, dos 40 aos 59 anos, participaram 4 indivíduos do género feminino e 8 do género masculino. Todos os participantes tinham nacionalidade portuguesa e nenhum se encontrava vacinado contra este vírus. Em relação às doenças associadas, um dos senhores tinha hipertensão arterial e outro sofria de sinusite. Face aos resultados do questionário, dois dos participantes, um de cada género, não tiveram qualquer tipo de sintomatologia, sendo, então, assintomáticos. Notar que um dos senhores assintomáticos tinha hipertensão arterial. Os restantes descreveram sintomas ligeiros a moderados, sendo que os mais frequentes no género feminino foram as dores

RESULTADOS

de cabeça e dores musculares. Já no género masculino o sintoma mais frequente foi a tosse (62,5%) (Figura 7).

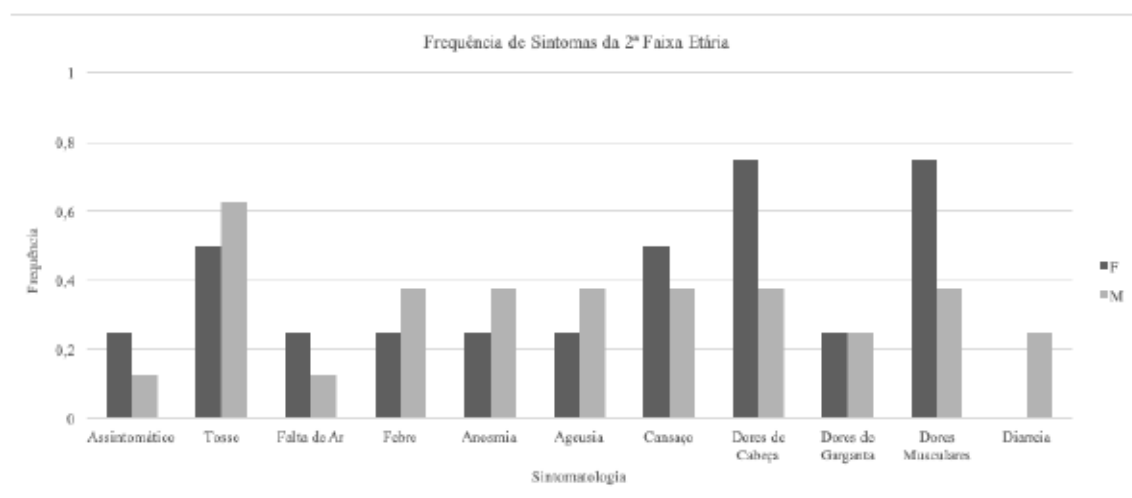


Figura 7 Frequência de Sintomas da 2ª Faixa Etária (40-59 anos)

Quanto à terceira e última faixa etária, que incluiu pessoas com mais de 60 anos, participaram 6 indivíduos do género feminino e 5 do género masculino. No género feminino uma das participantes era de nacionalidade brasileira, sendo que as restantes eram portuguesas. Em relação às doenças de saúde associadas, duas das senhoras eram saudáveis e desenvolveram sintomas ligeiros a esta infeção viral. Duas outras senhoras tinham hipertensão arterial, sendo que uma destas teve igualmente sintomas ligeiros e outra não teve qualquer tipo de sintomas. Uma outra senhora tinha como fatores de risco a hipertensão arterial e diabetes mellitus tipo II e esteve assintomática durante a infeção viral. E, por fim, uma paciente tinha asma e diabetes mellitus tipo II e desenvolveu sintomas tão graves que necessitou de internamento hospitalar. Em relação ao género masculino, todos os participantes eram de nacionalidade portuguesa. Apenas um dos senhores era saudável e este apenas desenvolveu uma sintomatologia ligeira face à COVID-19. Dois dos outros senhores desenvolveram igualmente sintomas ligeiros, um tinha asma e o outro sofria de hipertensão arterial. Os dois casos com sintomatologia mais grave, em que foi necessário internamento hospitalar, foram de um paciente que tinha como fatores de risco hipertensão arterial, bronquite crónica e asma, e de um outro com diabetes mellitus tipo I e uma doença respiratória desconhecida. Face aos resultados dos sintomas ligeiros provocados por esta doença, nas mulheres o sintoma mais frequente foi o cansaço e nos homens foram a febre e as dores musculares. Ressaltar que nesta faixa etária não houve nenhum participante que tivesse tido como sintoma a ageusia (Figura 8).

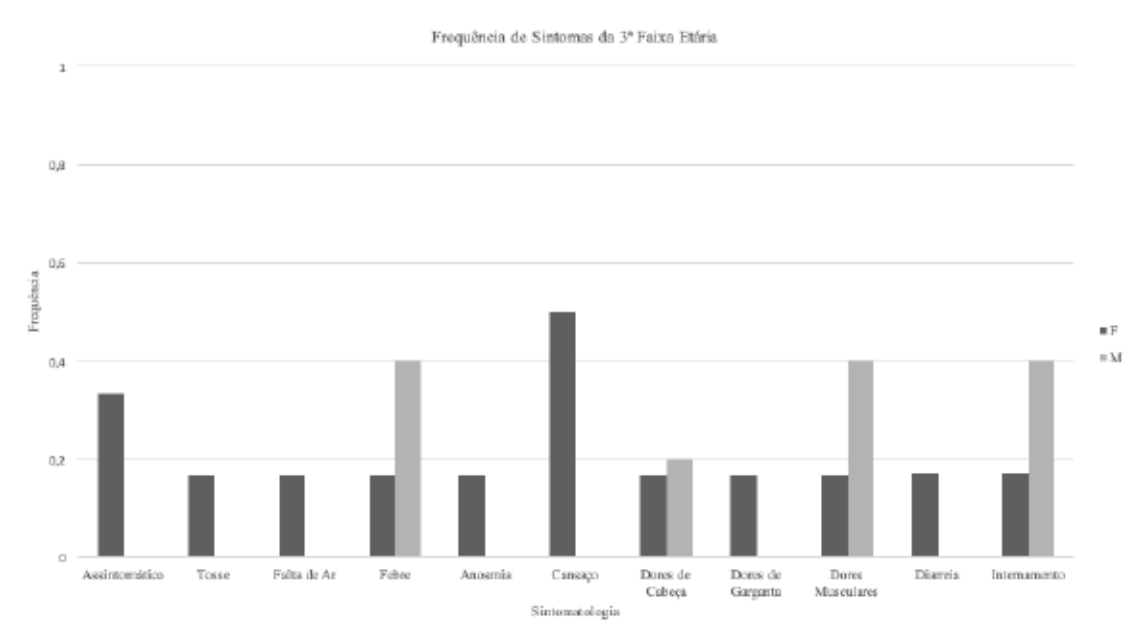


Figura 8 Frequência de Sintomas da 3ª Faixa Etária (≥60 anos)

3.2. Determinação da Carga Viral

No que diz respeito à determinação da carga viral, foi efetuada a amplificação do RNA viral por RT-PCR dos participantes que não tinham sido previamente diagnosticados com esta infeção para determinar a presença ou ausência do novo coronavírus. Após esta amplificação, obtiveram-se como resultado todas as 6 *pools* negativas, ou seja, no momento da recolha das amostras de saliva nenhum participante se encontrava infetado com SARS-CoV-2. Notar que se o resultado da *pool* fosse positivo, significava que pelo menos um dos dez participantes estava infetado. Assim, seria necessário repetir o teste de carga viral individualmente nestes dez participantes para identificar o(s) positivo(s).

3.3. Análise das Frequências de HLA

As frequências dos diferentes alelos HLA foram retiradas da base de dados Allele Frequency (<http://www.allelefreqencies.net>). Relativamente à amostra desta base de dados pertencente à população de Viseu, os dados recolhidos remontam a 2009. A fonte foi proveniente dos registos de doadores de medula óssea e conseguiram aferir um número amostral significativo de 2915 pessoas. Os alelos que se encontravam genotipados em Viseu eram: HLA-A*01, A*02, A*03, A*11, A*23, A*24, A*25, A*26, A*29, A*30, A*31, A*32, A*33, A*34, A*36, A*66, A*68, A*69, A*74, A*80; HLA-B*07, B*08,

RESULTADOS

B*13, B*14, B*15, B*18, B*27, B*35, B*37, B*38, B*39, B*40, B*41, B*42, B*44, B*45, B*46, B*47, B*48, B*49, B*50, B*51, B*52, B*53, B*54, B*55, B*56, B*57, B*58, B*59, B*67, B*73, B*78, B*81, B*82, B*83.

Nos alelos de HLA-A genotipados, é perceptível que há alelos sem qualquer representatividade em Viseu, como o HLA-A*80 e, por outro lado, o alelo observado com mais frequência é o HLA-A*02 (0,284). O alelo HLA-A*03 tem uma frequência de 0,106. O alelo HLA-A*68 tem uma frequência de 0,054. Por sua vez, o alelo HLA-A*32 tem uma frequência de 0,039 nesta localidade. O alelo HLA-A*66 tem uma frequência de 0,014 e o alelo HLA-A*25, tem uma frequência de 0,008 nesta região de Portugal (Figura 9).

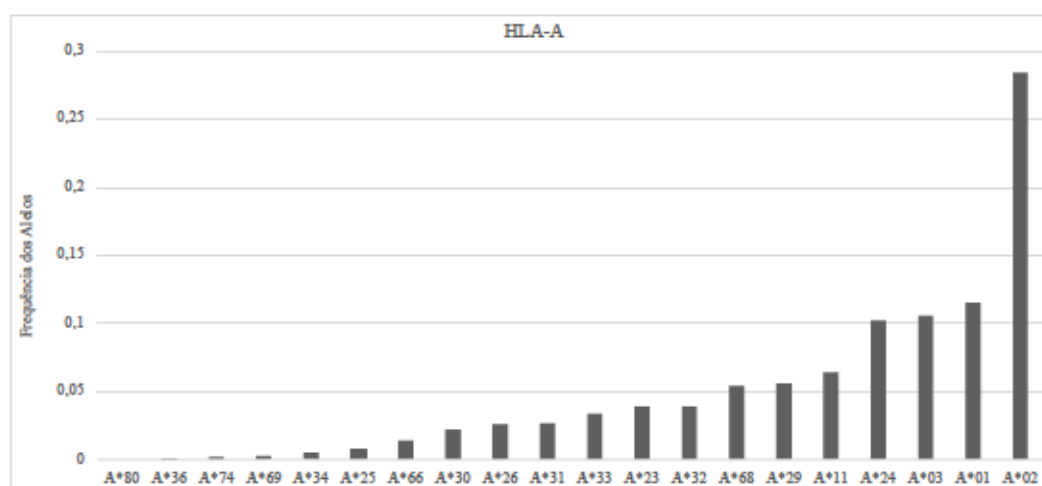


Figura 9 Frequências de HLA-A em Viseu

No que concerne aos alelos de HLA-B genotipados, certos alelos não têm representatividade em Viseu, nomeadamente os HLA-B*46, HLA-B*54, HLA-B*59, HLA-B*67, HLA-B*73, HLA-B*81, HLA-B*82 e o HLA-B*83. Por outro lado, os alelos com a frequência mais elevada nesta região são os HLA-B*51 (0,13) e HLA-B*44 (0,146). Para além dos supracitados, os alelos HLA-B*08, HLA-B*15 e HLA-B*39, têm as respectivas frequências de 0,065, 0,059 e 0,022, em Viseu. Por sua vez, os alelos HLA-B*49, HLA-B*18 e o HLA-B*14 têm como frequências 0,035, 0,038 e 0,059, respetivamente (Figura 10).

GENOTIPAGEM DE HLA PARA AVALIAÇÃO DE RISCO DE INFECÇÃO POR SARS-COV-2

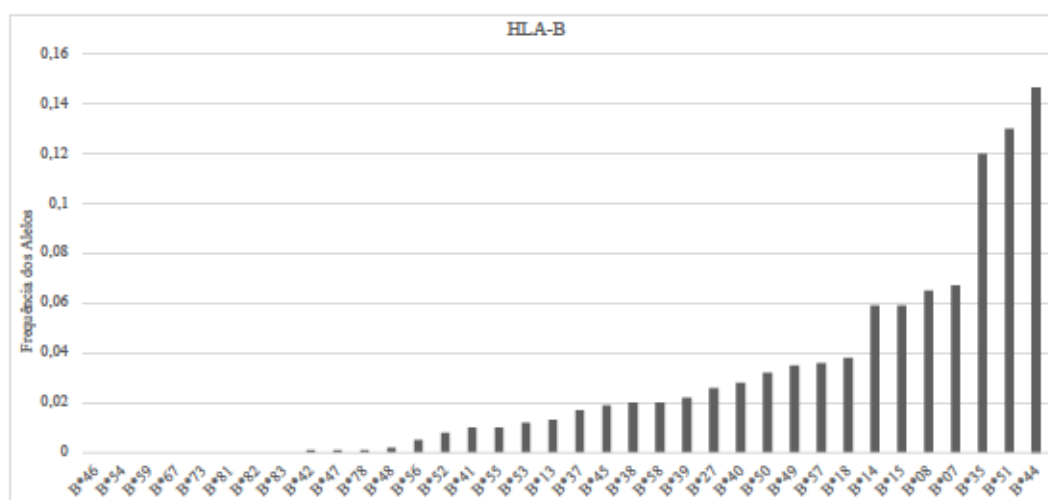


Figura 10 Frequências de HLA-B em Visau

Para a análise de frequências de alelos associados à suscetibilidade à infecção por SARS-CoV-2, foram escolhidos três alelos distintos: HLA-A*25, HLA-B*44 e HLA-B*46. Na tabela seguinte (Tabela 7) estão apresentadas as dez regiões do mundo com maior frequência destes alelos e as suas respetivas frequências, por ordem decrescente.

Tabela 7 Regiões do mundo com maior frequência de HLA-A*25, HLA-B*44 e B*46

HLA-A*25	HLA-B*44	HLA-B*46
Polónia (0,063)	Espanha – Ibiza (0,244)	China – Dai (0,254)
Rússia - República da Carélia (0,046)	Espanha – País Basco (0,240)	China - Província de Guizhou (0,236)
República Checa (0,042)	Espanha - Valles Pasiegos (0,233)	China – Província de Yunnan (0,198)
EUA – São Francisco – Caucasianos (0,039)	Espanha – Guipúscoa (0,232)	Taiwan (0,182)
EUA – Caucasianos (0,036)	Espanha – Girona (0,213)	Singapura (0,172)
Irlanda do Sul (0,036)	Escócia – Órcades (0,2036)	China – Hong Kong (0,163)
Roménia (0,035)	Irlanda do Sul (0,182)	China – Guangzhou (0,155)
Judeus de Israel e da Tunísia (0,0336)	Espanha – Múrcia (0,179)	Nordeste da Tailândia (0,151)
Suíça – Lucerna (0,0327)	Cuba (0,179)	China – Wuhan (0,1502)
Alemanha (0,0326)	Inglaterra – Leeds (0,1753)	EUA – Chineses (0,1343)

Por sua vez, as regiões do mundo com frequências mais baixas do alelo HLA-A*25 incluem a Austrália, os Açores e o Burkina Faso. Do alelo HLA-B*44 são a Argentina,

RESULTADOS

os Camarões e a Índia. E, por fim, do alelo HLA-B*46 são a Bulgária, o Burkina Faso, a República Checa e a Suíça.

3.4. Identificação dos Polimorfismos de HLA

Após a confirmação da amplificação feita a partir da eletroforese em gel de agarose, constatou-se que o conjunto de *primers* utilizado para o gene de HLA-A (exão 3) não funcionou como o esperado e foi necessário otimizar o protocolo anteriormente descrito. Contudo, mesmo depois de terem sido testadas várias temperaturas de *annealing*, continuou sem oferecer bons resultados (Figura 11). Das seis amostras testadas, apenas duas (nº 3 e 4 da figura seguinte) tinham uma banda específica de DNA amplificado com o tamanho esperado, e só estas seguiram para a sequenciação. Notar que era esperado encontrar neste gel uma única banda na região dos 698 pares de bases, correspondente ao tamanho do fragmento de interesse.

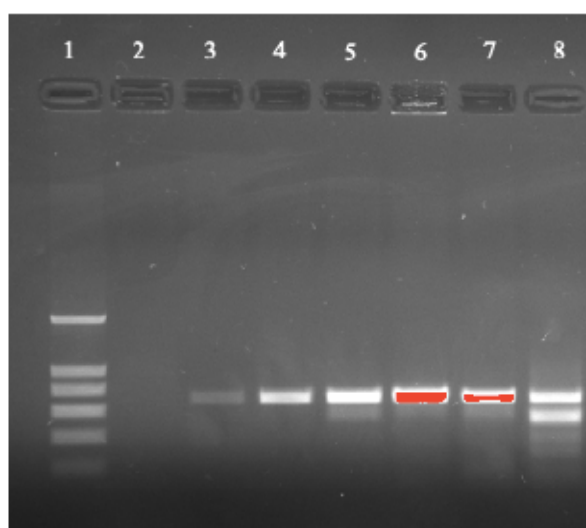


Figura 11 Visualização do produto de PCR de HLA-A em gel de agarose 1%

1 - Ladder I; 2 - Controle Negativo; 3 ao 8 - Amostras de Indivíduos com Diagnóstico Prévio de SARS-CoV-2

Após a sequenciação pelo método de Sanger foi feito o alinhamento das sequências obtidas das duas amostras e comparadas com a sequência de referência de HLA-A de forma a se observarem os polimorfismos presentes (Tabela 8). A qualidade da sequenciação observada foi bastante satisfatória. Esta é vista através da região azul que acompanha as sequências como plano de fundo. No caso de uma qualidade inferior a região azul estaria muito baixa (Figura 12).

Constatou-se que ambos os participantes eram homozigóticos e, sendo assim, conseguiu-se identificar os alelos apresentados. Num dos participantes a região amplificada correspondeu ao alelo HLA-A*66 com uma percentagem de similaridade de 99,8% (amostra 74) e no outro participante correspondeu ao alelo HLA-A*68 com uma percentagem de similaridade de 100%, sendo que o alelo HLA-A*02 também apresenta correspondência com a mesma percentagem de similaridade (amostra 75).

Tabela 8 Polimorfismos HLA-A

Regiões Polimórficas	Nucleótido da Sequência Padrão	Amostra 74	Amostra 75
512, 526, 729	G	C	C
584, 756	A	G	G
692, 755, 932, 948	T	G	G
711, 778	T	C	C
721	G	T	T
806	G	A	A
493	C	A	C
816	A	T	A
895, 952	A	C	A
910	G	A	G
953	C	G	C
807	G	G	C
811	G	G	T
846, 1095, 1099	C	C	A
882, 899	G	G	A
890	T	T	C
920	A	A	T
1094	A	A	G
1097, 1100	A	A	C

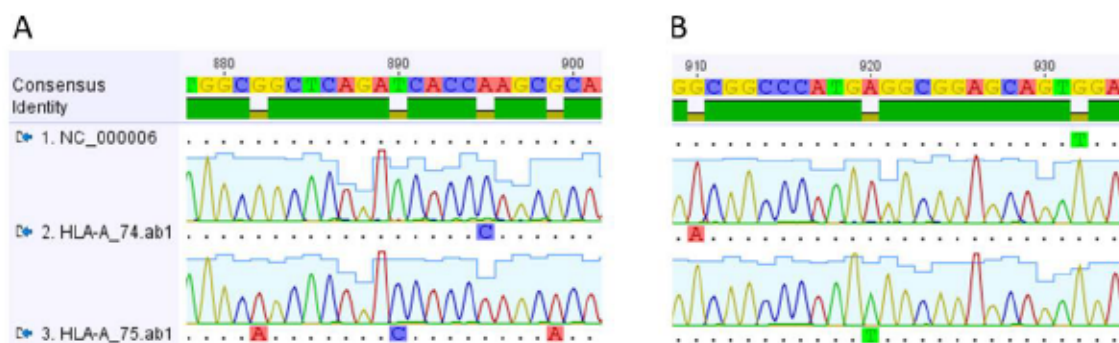


Figura 12 Sequenciação de HLA-A, evidenciando os polimorfismos nas posições 882, 890, 895 e 899 (A), e 910, 920 e 932 (B).

RESULTADOS

Já o conjunto de *primers* utilizado para o gene HLA-B (exão 3) apresentou melhores resultados no PCR. Assim, foram testadas todas as amostras referentes aos participantes com diagnóstico prévio de SARS-CoV-2. Neste caso, o resultado esperado seria encontrar uma única banda na região dos 301 pares de bases, correspondente ao tamanho do fragmento do gene de interesse. Na Figura 13 observou-se que as amostras 6 e 10 não foram amplificadas.

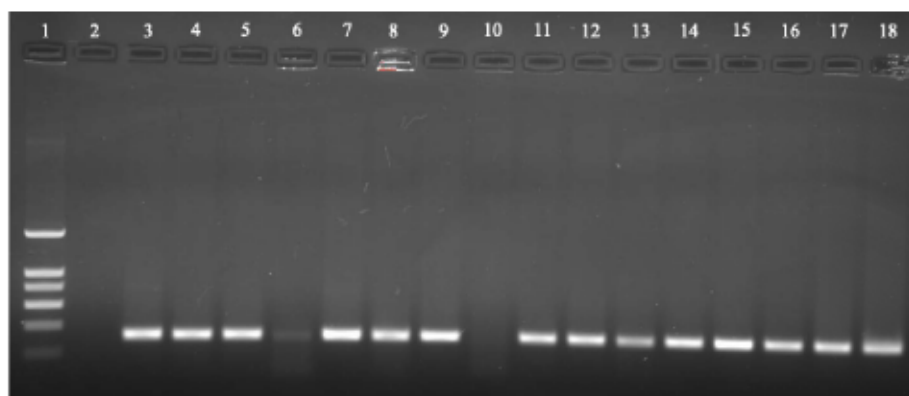


Figura 13 Visualização do produto de PCR de HLA-B em gel de agarose 1%

1 - Ladder I; 2 - Controle Negativo; 3 – Controle Positivo; 4 ao 18 - Amostras de Indivíduos com Diagnóstico Prévio de SARS-CoV-2

As amostras que não foram amplificadas eficientemente não foram para sequenciação. Assim, apenas 33 amostras de HLA-B seguiram para sequenciação. Estas seqüências foram igualmente comparadas com a seqüência de referência de HLA-B retirada do NCBI de forma a se observarem os polimorfismos (Tabela 9). Neste caso a qualidade da sequenciação observada não é tão satisfatória como o esperado e observado nos resultados dos HLA-A (Figura 14). Os participantes para este gene eram todos heterozigóticos, e sendo que o método de sequenciação utilizado foi de Sanger, este não permitiu diferenciar os alelos presentes nesta região. No entanto, conseguiu-se deduzir as regiões polimórficas nas seqüências analisadas.

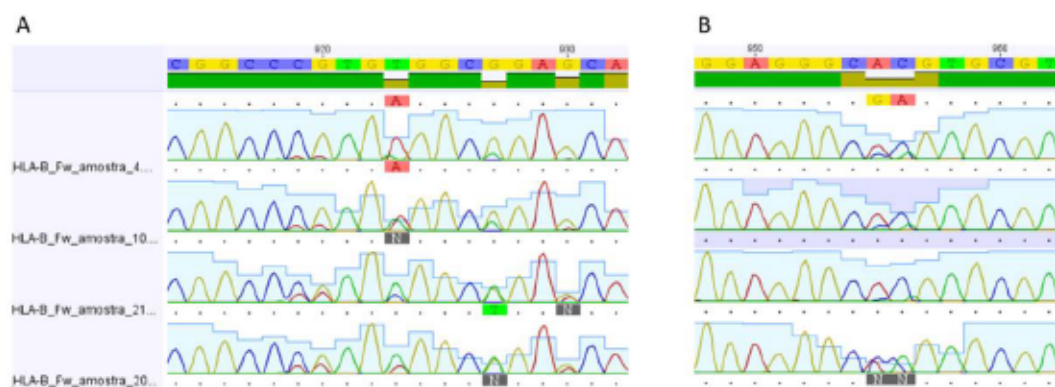


Figura 14 Sequenciação HLA-B, evidenciando os polimorfismos nas posições 923, 927 e 930 (A) e 955 e 956 (B)

GENOTIPAGEM DE HLA PARA AVALIAÇÃO DE RISCO DE INFECÇÃO POR SARS-COV-2

Tabela 9 Polimorfismos HLA-B

Regiões Polimórficas	Nucleótido da Sequência Padrão	Polimorfismo - Substituição -	Amostras
825	C	C/T	Todas
831	G	A/G	4, 7, 16, 67, 68, 69
838	A	C/A	Todas
855	C	T/C	4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 16, 20, 23, 24, 66, 71, 72, 73
859	C	C/A	Todas
873	C	C/A	25
873	C	N*	Todas exceto 25
882	G	C/T	7, 21, 22
882	G	N*	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73
895	A	T/A	Todas
902	G	G/T	7, 73
908	G	T/G	1, 2, 7, 11, 13, 15, 19, 21, 22, 24, 25, 66, 69, 70
909	G	T/G	Todas
919	C	C/A	Todas
920	G	A/G	Todas
923	A	T/A	6, 8, 9, 10, 14, 16, 17, 18, 20, 23, 24, 66, 68, 71, 72, 73
923	A	N*	1, 2, 3, 5, 7, 11, 12, 13, 15, 19, 22, 25, 67, 69
923	A	T/C	21, 70
927	G	T/G	Todas
930	G	A/G	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72
933	G	G/A	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72
934	C	A/C	1, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 12, 23, 24, 25, 71, 72
934	C	N*	2, 6, 7, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 66, 69, 70
935	G	T/G	1, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 23, 24, 25, 66, 67, 68, 71, 72, 73
935	G	T/A	2

RESULTADOS

935	G	A/G	17, 18
935	G	N*	3, 5, 9, 15, 19, 20, 21, 22, 69, 70
955	G	A/C	2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 14, 16, 18, 20, 22, 23, 71, 72
955	G	A/G	1, 13, 15, 25
955	G	A	12, 17, 19, 21, 70
955	G	N*	7, 8, 11, 24, 66, 67, 68, 69, 73
956	A	C/T	2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 23, 71, 72
956	A	C	17, 19, 21, 70
956	A	C/A	1, 13, 15, 25
956	A	N*	8, 11, 24, 66, 67, 68, 69, 73
974	G	G/A	Todas
979	T	C/T	1, 3, 4, 6, 7, 10, 12, 16, 22, 67, 68, 69, 70, 71
999	C	G	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 67, 68, 71, 72, 73
999	C	G/C	1, 11, 13, 15, 19, 21, 24, 25, 66, 69, 70
1001	A	C/T	Todas
1006	G	C	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 67, 68, 71, 72, 73
1006	G	C/G	1, 11, 13, 15, 19, 21, 24, 25, 66, 69, 70
1014	T	G	2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 14, 16, 17, 18, 20, 23, 68, 71, 72, 73
1014	T	G/A	7, 12, 19, 21, 22, 67, 69, 70
1014	T	G/T	24, 66
1014	T	N*	1, 11, 13, 15, 25

* Identificação do nucleótido incerta devido à baixa qualidade de sequenciação nesta região.

Assim, fez-se um total de 27 posições com polimorfismos nestas sequências. Outro resultado interessante, nas posições 935, 955, 956 e 1014 foi a existência de alterações distintas. Ou seja, nestas regiões polimórficas observaram-se vários polimorfismos possíveis em cada posição. Na posição 935 observaram-se indivíduos heterozigóticos com nucleótidos T-G, T-A ou A-G, bem como certos indivíduos com identificação do nucleótido incerta (N) devido à baixa qualidade de sequenciação nesta região. Na posição 955 observaram-se indivíduos homozigóticos com o nucleótido A em vez do G esperado, indivíduos heterozigóticos A-G ou A-C e indivíduos com N. Na posição 956 constataram-se indivíduos homozigóticos com o nucleótido C em vez do A esperado, indivíduos heterozigóticos C-A ou C-T e indivíduos com N. Na posição 1014 observaram-se

indivíduos homozigóticos G em vez do T esperado, indivíduos heterozigóticos G-A ou G-T e indivíduos com N. Para além disso, a amostra com mais polimorfismos presentes, no total de 26 regiões polimórficas, foi a amostra 7. Por sua vez, as duas amostras com menos posições polimórficas foram as 4 e a 73, com 21 regiões polimórficas.

4. DISCUSSÃO

A pandemia COVID-19 e as medidas de confinamento resultaram na redução do acesso a outros cuidados de saúde, que não COVID-19, incluindo a saúde oral. O acesso a este tipo de cuidados de saúde implica, tradicionalmente, um contacto próximo entre os profissionais e os pacientes, para além de incluir procedimentos que geram aerossóis, o que pode aumentar o risco de infeção por SARS-CoV-2. Assim, a Faculdade de Medicina Dentária da UCP associou-se à JS Clínica Médica Lda e à Altice Labs num projeto, o Proteger+ (CENTRO-01-02B7-FEDER-070086), para fazer a triagem de pacientes usando um assistente virtual. Neste projeto está incluído um rastreio gratuito à COVID-19, baseado na análise molecular da saliva, para identificar os pacientes infetados assintomáticos, de modo a serem acompanhados por teleconsulta e assim reduzir o risco de contágio e as taxas de transmissão do vírus. Para além disso, também tem como objetivo a caracterização da suscetibilidade do hospedeiro à infeção pelo vírus SARS-CoV-2. Integrado neste projeto, neste estudo específico pretendeu-se caracterizar uma população de pacientes da Clínica Dentária Universitária e da JS Clínica, em Viseu, e através da genotipagem dos alelos HLA destes indivíduos, tentar identificar possíveis variantes genéticas que conseguissem explicar uma maior ou menor suscetibilidade à COVID-19 e à gravidade ou tipo dos sintomas desenvolvidos.

A COVID-19 apresenta uma grande variabilidade de manifestações clínicas, incluindo indivíduos assintomáticos, indivíduos com uma sintomatologia ligeira, moderada ou severa, até indivíduos com um desfecho fatal (16). Assim, os sintomas observados na população deste estudo também foram distintos entre si. A maioria de todos os participantes com diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2 (64,3%) experienciou sintomas ligeiros. Estes incluíram febre, tosse, cansaço, dores musculares, dores de cabeça, perda de olfato e/ou paladar e diarreia. Os participantes que, para além deste tipo de sintomas, tiveram sintomatologia moderada incluíram os que tiveram falta de ar ou dificuldades em respirar, que perfizeram 19,0% de todos os indivíduos desta amostra. Para além disso, 3 participantes deste estudo (7,1%) tiveram sintomas de tal forma graves que tiveram de ser internados em meio hospitalar. Estes sintomas incluíram dispneia, hipóxia, envolvimento de pelo menos 50% dos pulmões, frequência respiratória inferior a 30 respirações por minuto, dificuldade respiratória severa, entre outros (47). Por fim, ressaltar que 4 indivíduos que participaram neste estudo não desenvolveram qualquer tipo de sintomas, correspondendo a 9,5% do total de participantes. De acordo com os dados publicados na *Annals of Internal Medicine*, o número de assintomáticos

neste estudo foi inferior aos números mundiais, uma vez que cerca de um terço dos infectados são, normalmente, assintomáticos (48).

Além do supracitado, determinados fatores de risco não modificáveis estão associados à suscetibilidade e gravidade do curso desta infecção viral. Tal como se encontra descrito na literatura, o género dos indivíduos é um destes fatores de risco. Está relatado que a gravidade e a taxa de mortalidade são superiores no género masculino, quando comparado com o género feminino. No entanto, as mulheres são mais propícias a desenvolver um maior número de sintomas, sendo estes de uma gravidade inferior (18). Na população deste estudo comprovou-se parcialmente o que se encontra na literatura, ou seja, o género feminino apresentou um maior número de sintomas desta doença, principalmente nos indivíduos pertencentes à primeira e terceira faixa etária, e os sintomas mais graves também foram observados com maior frequência no género masculino. No entanto, na segunda faixa etária deste estudo, os homens descreveram um maior número de sintomas, quando comparados com as mulheres dessa mesma idade.

Outro fator de suscetibilidade e de aumento de gravidade da COVID-19 é a presença prévia de comorbidades, tais como, diabetes mellitus, hipertensão, doenças respiratórias e doenças cardiovasculares (17). Ou seja, indivíduos que padeçam deste tipo de patologias podem ter uma exacerbação de sintomas face a indivíduos saudáveis. Tendo em conta os resultados obtidos neste trabalho, este fator de risco não deve ser considerado como um fator absoluto. Isto porque, dos quatro participantes com hipertensão deste estudo, todos responderam de maneira distinta a esta infecção, dois foram assintomáticos, um apresentou sintomatologia ligeira e outro moderada. A associação destas patologias, sobretudo com patologias respiratórias como a asma ou bronquite, parece estar relacionada com uma maior gravidade de sintomas, sendo necessário internamento hospitalar. Contudo, ressaltar que um participante com hipertensão e diabetes mellitus também não teve qualquer tipo de sintomatologia associada a esta doença. Deve-se ter em conta o número baixo de indivíduos em cada um destes grupos para se poder tirar conclusões definitivas.

Relativamente às diferentes faixas etárias constatou-se o que se encontra descrito na literatura, isto é, com o avanço da idade a prevalência das comorbidades supracitadas é maior. Desta forma, a probabilidade de se desenvolverem sintomas mais graves relativos à COVID-19 é, igualmente, superior. Na população deste estudo, os casos com sintomatologia severa só se verificaram nos participantes mais velhos, incluídos na terceira faixa etária, sendo que o número de indivíduos neste grupo é também mais baixo que nas outras faixas etárias.

Para além dos fatores de risco associados a esta infeção viral, e como citado na introdução, a relação entre o vírus SARS-CoV-2 e o sistema imune do hospedeiro também tem um papel fundamental para a suscetibilidade e gravidade do curso desta infeção (25). Deste modo, a associação dos alelos de HLA a determinadas doenças tem aumentado ao longo dos anos. Comparando o descrito na literatura relativamente aos alelos de HLA mais frequentes na população portuguesa (33) com a análise das frequências dos mesmos feita na população de Viseu, o alelo HLA-A mais frequente, o HLA-A*02, coincide em ambos os estudos, ou seja, para além de ser o mais frequente na população portuguesa, também é o mais frequente na população genotipada de Viseu, com uma frequência de 0,284. Face aos alelos HLA-A*01 e A*03, descritos como tendo uma frequência mais baixa em Portugal do que noutras populações europeias, apenas se consegue aferir que, em Viseu, acabam por ser o segundo e terceiro alelos com frequências maiores, respetivamente. Em relação aos alelos de HLA-B mais frequentes em Portugal, os HLA-B*44 e B*51, também são os mais frequentes na população genotipada em Viseu. No entanto, o alelo HLA-B*27 é descrito como sendo um alelo raro na população portuguesa, mas, na região estudada, tem uma frequência de 0,026. Mesmo que não seja uma frequência muito significativa, existem bastantes alelos menos frequentes em Viseu do que este.

A associação da variabilidade dos HLA à suscetibilidade ao novo coronavírus tem surgido em diversos estudos e diferentes populações. O alelo HLA-A mais frequente na população portuguesa e em Viseu, como visto anteriormente, está descrito como um alelo de proteção à infeção por SARS-CoV-1 (7). Em relação ao SARS-CoV-2, o alelo HLA-A*03, com uma frequência de 0,106 em Viseu, está descrito como sendo um alelo de suscetibilidade para esta infeção. Por sua vez, o alelo HLA-A*32, com uma frequência inferior a 0,05 na região estudada, está descrito como alelo de proteção (37). O alelo HLA-A*25, muito pouco frequente em Viseu, foi tanto associado como alelo de suscetibilidade (36) como alelo de proteção para este vírus (25) em estudos distintos, o primeiro na população italiana e o segundo na população espanhola.

Um dos alelos sem qualquer representatividade em Viseu, o HLA-B*46, está fortemente associado à suscetibilidade tanto de SARS-CoV-1 como de SARS-CoV-2 (7, 25). O HLA-B*07 encontra-se associado à suscetibilidade à infeção de SARS-CoV-1 (7). Os alelos HLA-B mais frequentes na região estudada, os HLA-B*44 e B*51, também estão associados a uma maior suscetibilidade ao SARS-CoV-2, bem como os alelos HLA-B*08 e o B*39 (36, 37). Visto serem alelos frequentes em Viseu e, igualmente, na

população portuguesa podem explicar um risco acrescido para este tipo de infeção viral nesta população. Por sua vez, os alelos HLA-B*14, B*18 e B*49, estão associados à proteção contra esta infeção viral (36). Ressaltar que são menos frequentes em Viseu que os alelos associados à suscetibilidade. O alelo HLA-B*15, com uma frequência de 0,059 em Viseu, foi associado como alelo de suscetibilidade em dois dos estudos disponíveis na literatura, um na população chinesa e outro na população italiana (1, 36) e como alelo de proteção num outro estudo na população espanhola (25).

Na análise de frequências globais de três alelos associados à suscetibilidade de SARS-CoV-2, o HLA-A*25, o HLA-B*44 e o HLA-B*46, constatou-se que são muito frequentes em países que foram bastante afetados com esta infeção viral. O HLA-B*46 é um alelo muito frequente na China, onde se desencadeou a propagação inicial deste vírus. Ressaltar o facto, que na cidade de Wuhan a frequência deste alelo é de 0,1502. Para além disso, é um alelo bastante comum na população asiática. Por sua vez, o HLA-B*44 é mais frequente em Espanha, um dos países com maior incidência de casos desta pandemia, ocupando o décimo lugar a nível mundial. Estima-se que até Junho de 2021 tenham sido infetados mais de 3.753.228 indivíduos espanhóis. O HLA-A*25 é mais frequente na Polónia, que, até à data, ocupa o décimo quarto lugar nos países com maior incidência desta infeção viral, perfazendo cerca de 2.878.276 indivíduos infetados (49).

Assim, uma vez que estes alelos são frequentes em determinadas regiões em que a incidência deste vírus está aumentada, a variabilidade dos alelos poderia explicar um maior risco entre estas populações. No entanto, seriam necessários mais estudos populacionais com um maior número de participantes para se poder chegar a conclusões significativas.

As duas amostras de DNA genotipadas para HLA-A resultaram na identificação de alelos distintos. Numa delas foi identificado o alelo HLA-A*66 com uma similaridade de 99,8% e na outra foi identificado o alelo HLA-A*68 com uma similaridade de 100%, embora o alelo HLA-A*02 também apareça como resultado do BLAST. Estes foram identificados a partir da sequência do exão 3 do gene HLA-A, numa região com 698 pares de bases. Para distinguir estes alelos, teria de ser sequenciado outro fragmento do gene HLA-A. As moléculas de HLA são agrupadas em supertipos se tiverem características semelhantes na ligação de péptidos. Neste caso concreto, os alelos HLA-A*66 e A*68 pertencem ao supertipo HLA-A A03. Para além destes alelos, estão classificados neste supertipo os alelos HLA-A*03, A*11, A*31, A*33, A*34 e A*74 (25). Visto serem indivíduos homocigóticos, nesta região têm dois alelos idênticos deste supertipo.

As amostras apresentaram treze polimorfismos de substituição de base única (SNP), ou seja, a troca de um nucleótido por um outro na cadeia de DNA, em comparação com a sequência de HLA-A de referência retirada do NCBI. Estes polimorfismos comprovam que os genes HLA são altamente variáveis entre si. Para além disso, entre as duas amostras também se encontraram polimorfismos que diferenciam os dois alelos. A amostra 75 foi onde se observou um maior número de regiões polimórficas, correspondendo ao alelo HLA-A*68. No entanto, mesmo que a maioria dos resultados do BLAST tenham identificado este alelo, um dos resultados referenciou a similaridade da sequência da amostra com o alelo HLA-A*02. Isto aconteceu porque, de acordo com a classificação dos supertipos, o HLA-A*02 pertence ao supertipo HLA-A A02, onde também está incluído o alelo HLA-A*68:02 (25). Assim, os alelos HLA-A*68 podem pertencer a supertipos diferentes dependendo das suas proteínas específicas. Ou seja, se o alelo identificado for o alelo HLA-A*68:01 este pertence ao supertipo A03, por sua vez, se o alelo identificado for o alelo HLA-A*68:02 já pertence ao supertipo A02.

A frequência em Viseu dos alelos genotipados é diferente, sendo que o alelo HLA-A*68 tem uma frequência de 0,054 e o HLA-A*66 uma frequência de 0,014. De acordo com a literatura, estes alelos não se encontram relacionados com a infeção por SARS-CoV-2. Contudo, pertencem a indivíduos com respostas clínicas diferentes a esta infeção. O alelo HLA-A*68 pertence a um indivíduo do género masculino, na segunda faixa etária deste estudo, sem comorbilidades associadas, que desenvolveu sintomas moderados relativos à COVID-19. Por sua vez, o alelo HLA-A*66 pertence a um indivíduo do género feminino, da terceira faixa etária sem comorbilidades associadas, que desenvolveu apenas sintomatologia ligeira. O alelo HLA-A*02, como discutido anteriormente é o mais frequente em Viseu e encontra-se descrito como um alelo de proteção à infeção por SARS-CoV-1 (7).

No caso das 33 amostras genotipadas para os HLA-B, como os indivíduos eram heterozigóticos, esta situação acabou por gerar ambiguidades o que impossibilitou a identificação dos alelos presentes nas amostras. A heterogeneidade no gene HLA-B está de acordo com a literatura, que o descreve como sendo o mais polimórfico com mais de 3500 alelos descritos (50). Esta variabilidade tem tendência a aumentar com a descoberta de novos alelos. Os HLA-B também se encontram divididos em supertipos, como acontece nos HLA-A. Assim a similaridade entre os alelos é dividida nestes supertipos. Os alelos mais frequentes em Viseu, o HLA-B*44 e o B*51, pertencem a supertipos distintos, ou seja, têm características distintas na ligação de péptidos (25).

Resumindo, neste estudo os objetivos foram parcialmente cumpridos, uma vez que o mesmo teve algumas limitações do foro técnico. A primeira grande limitação foi a amostra utilizada, isto é, para se conseguir alcançar conclusões mais satisfatórias e diferenciadas este estudo deveria de ter englobado mais participantes e com casos mais severos de COVID-19. Tal não foi possível por duas razões principais. As amostras recolhidas para a realização deste trabalho tiveram origem em consultas médicas de rotina, o que implicou que as pessoas estivessem minimamente bem para a sua presença nas mesmas e, para além disso, as amostras começaram a ser recolhidas num período em que a pandemia começou a estabilizar, havendo menos casos graves.

Além disso, as seguintes limitações referiram-se a contratempos laboratoriais. O conjunto de *primers* escolhido para o gene HLA-A não teve os resultados esperados, o que acabou por interferir na quantidade de amostras sequenciadas e analisadas. Uma sugestão para ultrapassar esta dificuldade seria a otimização destes *primers* ou a aquisição de novos *primers* mais eficazes. Para além disso, nem todas as amostras apresentaram resultados da amplificação ou apresentaram uma banda muito esbatida, indicadora da pouca quantidade da mesma. Nas amostras sem amplificação muito provavelmente o alvo dos *primers* teria polimorfismos. No entanto, seriam necessários mais estudos para se confirmar esta hipótese. Nas amostras em que as bandas se encontravam muito esbatidas, poder-se-ia ainda refazer a amplificação, mas sem a diluição da amostra para tentar aumentar a quantidade de DNA disponível.

E, uma vez que o método de sequenciação utilizado, método de Sanger, não permitiu a determinação dos alelos em indivíduos heterozigóticos, como no gene HLA-B, poder-se-ia optar por uma abordagem diferente, por exemplo, a utilização dos sistemas de NGS, um método mais dispendioso, mas que permite a sequenciação do genoma completo e faz leituras de cada alelo separadamente, não gerando ambiguidades (40). Para além desta solução, poder-se-ia continuar a usar o método de Sanger, mas fazer a sequenciação por alelo individualmente. Contudo, tornar-se-ia num processo bastante longo e igualmente caro tendo em conta a quantidade de alelos existentes.

Futuramente, este estudo deverá ser expandido de forma a colmatar todas as limitações observadas neste trabalho, para identificar as variantes genéticas de HLA associadas à suscetibilidade e gravidade do curso desta infeção viral.

5. CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

A COVID-19 teve e continua a ter um enorme impacto nas pessoas e na economia a nível mundial. Esta é uma doença grave, complexa e multifatorial, onde, mesmo que já se encontrem descritos determinados fatores de risco não modificáveis associados à suscetibilidade a esta patologia, tais como, a idade, o género e a presença prévia de comorbilidades, o curso clínico desta doença está fortemente correlacionado com a relação do vírus SARS-CoV-2 com o sistema imune do hospedeiro. A este respeito, o sistema HLA do hospedeiro desempenha um papel fundamental na regulação da resposta imune, através do reconhecimento, processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos.

Sabendo a grande influência deste sistema nas infeções virais, é imperioso incentivar as pesquisas a nível populacional dos alelos HLA associados à suscetibilidade e proteção face ao SARS-CoV-2 para que, deste modo, se consiga melhorar a atuação contra a propagação desta pandemia. Sabendo que em determinada região são mais frequentes alelos de suscetibilidade a esta infeção, consegue-se deduzir que esta mesma região terá um risco acrescido à propagação do vírus quando comparada com uma região numa situação oposta. Assim, os fatores de risco imunogenéticos são úteis para prever focos de doença e estratificação de pacientes tanto neste como em surtos futuros.

Para além disto, como os polimorfismos HLA medeiam a resposta imunológica comum a vários tipos de infeção, os resultados obtidos nos diferentes estudos podem ter aplicação para além desta pandemia e podem permitir uma melhor gestão de recursos humanos e materiais a nível mundial, na preparação de maior ou menor resposta nesta e em futuras pandemias.

6. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Wang W, Zhang W, Zhang J, He J, Zhu F. Distribution of HLA allele frequencies in 82 Chinese individuals with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *HLA*. 2020;96(2):194-6.
2. Kermali M, Khalsa RK, Pillai K, Ismail Z, Harky A. The role of biomarkers in diagnosis of COVID-19 - A systematic review. *Life Sci*. 2020;254:117788.
3. Lotfi M, Hamblin MR, Rezaei N. COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities. *Clin Chim Acta*. 2020;508:254-66.
4. Liu Y, Ning Z, Chen Y, Guo M, Liu Y, Gali NK, et al. Aerodynamic Characteristics and RNA Concentration of SARS-CoV-2 Aerosol in Wuhan Hospitals during COVID-19 Outbreak. *bioRxiv*. 2020:2020.03.08.982637.
5. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med*. 2020;382(16):1564-7.
6. Dong L, Tian J, He S, Zhu C, Wang J, Liu C, et al. Possible Vertical Transmission of SARS-CoV-2 From an Infected Mother to Her Newborn. *Jama*. 2020;323(18):1846-8.
7. Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *J Pharm Anal*. 2020;10(2):102-8.
8. Hosoki K, Chakraborty A, Sur S. Molecular mechanisms and epidemiology of COVID-19 from an allergist's perspective. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;146(2):285-99.
9. de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2016;14(8):523-34.
10. Li G, Chen X, Xu A. Profile of Specific Antibodies to the SARS-Associated Coronavirus. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(5):508-9.
11. Birra D, Benucci M, Landolfi L, Merchionda A, Loi G, Amato P, et al. COVID 19: a clue from innate immunity. *Immunol Res*. 2020;68(3):161-8.
12. Vellas C, Delobel P, de Souto Barreto P, Izopet J. COVID-19, Virology and Geroscience: A Perspective. *J Nutr Health Aging*. 2020;24(7):685-91.
13. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med*. 2020;382(13):1199-207.
14. Costa K, Carnáuba ATL, Rocha KW, Andrade KCL, Ferreira SMS, Menezes PL. Olfactory and taste disorders in COVID-19: a systematic review. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2020;86(6):781-92.
15. Wu YC, Chen CS, Chan YJ. The outbreak of COVID-19: An overview. *J Chin Med Assoc*. 2020;83(3):217-20.
16. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Oldridge DA, Greenplate AR, Wu JE, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*. 2020;369(6508).

17. Gemmati D, Bramanti B, Serino ML, Secchiero P, Zauli G, Tisato V. COVID-19 and Individual Genetic Susceptibility/Receptivity: Role of ACE1/ACE2 Genes, Immunity, Inflammation and Coagulation. Might the Double X-chromosome in Females Be Protective against SARS-CoV-2 Compared to the Single X-Chromosome in Males? *Int J Mol Sci.* 2020;21(10).
18. Agrawal H, Das N, Nathani S, Saha S, Saini S, Kakar SS, et al. An Assessment on Impact of COVID-19 Infection in a Gender Specific Manner. *Stem Cell Rev Rep.* 2021;17(1):94-112.
19. Bereshchenko O, Bruscoli S, Riccardi C. Glucocorticoids, Sex Hormones, and Immunity. *Front Immunol.* 2018;9:1332.
20. Nguyen LT, Ramanathan M, Weinstock-Guttman B, Baier M, Brownscheidle C, Jacobs LD. Sex differences in in vitro pro-inflammatory cytokine production from peripheral blood of multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci.* 2003;209(1-2):93-9.
21. Snyder PJ, Bhasin S, Cunningham GR, Matsumoto AM, Stephens-Shields AJ, Cauley JA, et al. Effects of Testosterone Treatment in Older Men. *N Engl J Med.* 2016;374(7):611-24.
22. Demichev V, Tober-Lau P, Nazarenko T, Thibeault C, Whitwell H, Lemke O, et al. A time-resolved proteomic and diagnostic map characterizes COVID-19 disease progression and predicts outcome. *medRxiv.* 2020:2020.11.09.20228015.
23. Han Y, Zhang H, Mu S, Wei W, Jin C, Tong C, et al. Lactate dehydrogenase, an independent risk factor of severe COVID-19 patients: a retrospective and observational study. *Aging (Albany NY).* 2020;12(12):11245-58.
24. Xiang J, Wen J, Yuan X, Xiong S, Zhou X, Liu C, et al. Potential biochemical markers to identify severe cases among COVID-19 patients. *medRxiv.* 2020:2020.03.19.20034447.
25. Iturrieta-Zuazo I, Rita CG, García-Soidán A, de Malet Pintos-Fonseca A, Alonso-Alarcón N, Pariente-Rodríguez R, et al. Possible role of HLA class-I genotype in SARS-CoV-2 infection and progression: A pilot study in a cohort of Covid-19 Spanish patients. *Clin Immunol.* 2020;219:108572.
26. Gaspar JMP. Caracterização Fenotípica e Genotípica de Doentes com Espondilite Anquilisante: Universidade de Aveiro; 2014.
27. Morais A, Alves H, Lima B, Delgado L, Gonçalves R, Tafulo S. Estudo de polimorfismos genéticos do HLA (classes I e II) e do TNF- α em doentes com sarcoidose. *Revista Portuguesa de Pneumologia.* 2008;14:727-46.
28. Crux NB, Elahi S. Human Leukocyte Antigen (HLA) and Immune Regulation: How Do Classical and Non-Classical HLA Alleles Modulate Immune Response to Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Infections? *Frontiers in Immunology.* 2017;8(832).

BIBLIOGRAFIA

29. Fernandes APM, Maciel LMZ, Foss MC, Donadi EA. Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes endócrinas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2003;47:601-11.
30. Laszkiewicz NS. Genotipagem de HLA classe I e II para seleção de células precursoras dendríticas para estudo da imunobiologia do vírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV). <http://hdl.handle.net/11449/119574>: Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP; 2011.
31. Gomes DFLT. Detecção do Ag HLA-B27 por citometria de fluxo e PCR genoQuick: Universidade de Aveiro; 2011.
32. Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J*. 2007;48(1):11-23.
33. Spínola H, Middleton D, Brehm A. HLA genes in Portugal inferred from sequence-based typing: in the crossroad between Europe and Africa. *Tissue Antigens*. 2005;66(1):26-36.
34. Arnaiz-Villena A, Martínez-Laso J, Gómez-Casado E, Díaz-Campos N, Santos P, Martinho A, et al. Relatedness among Basques, Portuguese, Spaniards, and Algerians studied by HLA allelic frequencies and haplotypes. *Immunogenetics*. 1997;47(1):37-43.
35. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*. 2010;75(4):291-455.
36. Correale P, Mutti L, Pentimalli F, Baglio G, Saladino RE, Sileri P, et al. HLA-B*44 and C*01 Prevalence Correlates with Covid19 Spreading across Italy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(15):5205.
37. Lorente L, Martín MM, Franco A, Barrios Y, Cáceres JJ, Solé-Violán J, et al. HLA genetic polymorphisms and prognosis of patients with COVID-19. *Med Intensiva (Engl Ed)*. 2021;45(2):96-103.
38. Kwok PY. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2001;2:235-58.
39. Alves C, Veiga S, Toralles MBP, Lopes ACV. O papel do complexo principal de histocompatibilidade na fisiologia da gravidez e na patogênese de complicações obstétricas. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*. 2007;7:357-63.
40. Nelson WC, Pyo CW, Vogan D, Wang R, Pyon YS, Hennessey C, et al. An integrated genotyping approach for HLA and other complex genetic systems. *Hum Immunol*. 2015;76(12):928-38.
41. Miller MB, Schwander K, Rao DC. Genotyping errors and their impact on genetic analysis. *Adv Genet*. 2008;60:141-52.
42. Lynge Pedersen AM, Belstrøm D. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *Journal of Dentistry*. 2019;80:S3-S12.

43. Greabu M, Battino M, Mohora M, Totan A, Didilescu A, Spinu T, et al. Saliva--a diagnostic window to the body, both in health and in disease. *J Med Life*. 2009;2(2):124-32.
44. Nemoda Z, Horvat-Gordon M, Fortunato CK, Beltzer EK, Scholl JL, Granger DA. Assessing genetic polymorphisms using DNA extracted from cells present in saliva samples. *BMC Med Res Methodol*. 2011;11:170.
45. Gonzalez-Galarza FF, McCabe A, Santos E, Jones J, Takeshita L, Ortega-Rivera ND, et al. Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D783-d8.
46. Robinson J, Barker DJ, Georgiou X, Cooper MA, Flicek P, Marsh SGE. IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D948-d55.
47. Fricke-Galindo I, Falfán-Valencia R. Genetics Insight for COVID-19 Susceptibility and Severity: A Review. *Front Immunol*. 2021;12:622176.
48. The Proportion of SARS-CoV-2 Infections That Are Asymptomatic. *Annals of Internal Medicine*. 2021;174(5):655-62.
49. Engineering CfSSa. JHU CSSE COVID-19 PROJECT [Available from: <https://www.arcgis.com/apps/dashboards/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>].
50. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet*. 2004;5(12):889-99.

7. ANEXOS

Anexo I: Parecer favorável da Comissão de Ética para a Saúde da UCP

91	Proteger+	Parecer Favorável
----	-----------	-------------------

Este trabalho pertence ao Projeto Proteger+, que teve o parecer favorável da Comissão de Ética para a Saúde da UCP como se pode observar na página eletrónica. Contudo, ainda se continua a aguardar o documento oficial.

Anexo II: Termo de Consentimento Informado



CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Proteger+

No âmbito da pandemia COVID-19 (infecção por SARS-CoV2, o novo coronavírus identificado em 2019 e reconhecido como pandémico pela Organização Mundial de Saúde), o SalivaTec está a participar no estudo Proteger+ que tem como objetivo principal aumentar a segurança e eficácia do atendimento aos utentes de clínicas generalistas e dentárias com o desenvolvimento de:

- 1- Soluções inteligentes de triagem de utentes;
- 2- Soluções de telemonitorização e teleconsulta para os indivíduos que não cumprirem os critérios para a ida à consulta;
- 3- Soluções que integram informação molecular.

A COVID-19 é atualmente diagnosticada através de amostra colhida por esfregaço (zaragatoa) da nasofaringe e da orofaringe. A recolha das amostras por zaragatoa causa desconforto e pode provocar sangramento ligeiro.

A recolha de saliva é fácil, não invasiva e pode ser realizada pelo próprio doente. A utilização da saliva permitirá, numa única amostra, a realização de testes de carga viral, de resposta imunológica e fatores genéticos.

Este documento pretende informá-lo(a) e propor-lhe a sua participação neste estudo.



A colheita das amostras será efetuada por profissionais devidamente habilitados para tal, não apresentando desconforto nem efeitos secundários. Serão cumpridas as normas em vigor para a conservação e acondicionamento das mesmas.

O(a) doente não será sujeito(a) a procedimentos adicionais àqueles a que seria submetido enquanto suspeito(a) de COVID-19, com exceção da recolha de saliva.

As amostras de saliva serão utilizadas para testes de: i) Carga viral, ii) Avaliação de IgG e IgM anti-SARS-CoV2, e iii) fatores genéticos de suscetibilidade, p.ex. genes HLA e TLR. Os testes serão realizados no laboratório SalivaTec – Universidade Católica Portuguesa (UCP).

Ao(à) participante são garantidos confidencialidade e anonimato.

O(a) participante **é livre de aceitar, ou não**, participar no estudo proposto, podendo mudar de opinião e revogar o seu consentimento, abandonando o estudo se assim considerar oportuno, sem qualquer tipo de penalização ou represália.

Confirmando que expliquei à pessoa abaixo indicada, de forma adequada e inteligível, os procedimentos necessários ao ato referido neste documento. Respondi a todas as questões que me foram colocadas e assegurei-me de que houve um período de reflexão suficiente para a tomada da decisão. Também garanti que, em caso de recusa, serão assegurados os melhores cuidados possíveis nesse contexto, no respeito pelos seus direitos.

ASSINATURA

Nome do profissional responsável pela recolha: _____

Contacto Institucional: _____

Data: ___/___/_____



Eu, _____
Fui informado(a) pelo profissional responsável pela recolha _____
acerca do estudo clínico no qual me é proposto participar.
Fui ainda informado(a) dos riscos possíveis deste estudo.
Pude colocar todas as perguntas ou dúvidas que achei necessárias e entendi todas as
explicações que me foram proporcionadas.
Dou o meu consentimento por escrito para participar neste estudo.

ASSINATURA

(nome completo do participante)

Anexo III: Questionário aplicado no estudo



Anexado ao presente documento pode encontrar:

- Tubo de colheita;
- Etiqueta em branco, onde deve ser colocado o número do processo clínico do paciente;
- Tira de parafilme, para melhor isolamento do tubo;
- Consentimento informado, a ser assinado pelo participante;
- Saco de armazenamento, para transporte da amostra.

**Para o preenchimento das seguintes questões é necessário
a assinatura do consentimento informado de participação.**

Dados do paciente

Nome completo: _____

Nº de Utente de Saúde (SNS): _____ Nacionalidade: _____

ID SalivaTec: _____ Naturalidade: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Telemóvel: _____

Sexo: Masculino Feminino Email: _____

Questionário no âmbito do projeto Proteger +

Data da colheita: ____/____/____ Hora da colheita: ____:____

1. Está infetado com COVID-19? Sim Não
2. Tem alguma suspeita que está infetado com COVID-19? Sim Não
3. Que saiba, nos últimos 20 dias teve contacto com alguém com COVID-19?
Sim Não
4. Já esteve infetado com COVID-19? Sim Não
Se Sim, indicar a data do diagnóstico: ____/____/____

GENOTIPAGEM DE HLA PARA AVALIAÇÃO DE RISCO DE INFECÇÃO POR SARS-COV-2

Se sim, responder às seguintes questões:

Sintomas	Sim	Não	Duração (em dias)
Teve febre?			
Teve tosse?			
Sentiu falta de ar ou dificuldade em respirar?			
Teve dores de cabeça?			
Sentiu cansaço fora do comum?			
Teve perda de olfato?			
Teve perda de paladar?			
Teve diarreia?			
Teve dor de garganta?			
Teve dores musculares?			
Necessitou de internamento em enfermaria?			
Necessitou de internamento em unidade de cuidados intensivos?			

5. Atualmente apresenta algum dos seguintes sintomas?

Sintomas	Sim	Não
Tem tosse?		
Tem febre?		
Sente falta de ar, dificuldade em respirar ou aperto no peito?		
Sente dor de cabeça?		
Tem diarreia?		
Sente cansaço fora do comum?		
Tem perda de olfato?		
Tem perda de paladar?		
Tem ardor nos olhos?		
Tem irritações na pele ou descoloração dos dedos das mãos ou dos pés?		

6. Já foi vacinado para a COVID-19?

Sim Não

Se sim, quando foi a 1ª dose? __/__/____

Se aplicável, quando foi a 2ª dose? __/__/____

Qual o fabricante? _____

ANEXOS

7. Tem problemas cardíacos? Sim Não

Se sim, quais? _____

8. Tem doenças respiratórias? Sim Não

Se sim, quais? _____

9. Tem diabetes? Sim Não

Se sim, indique: Tipo I Tipo II Não sei

10. Tem hipertensão? Sim Não

Anexo IV: Protocolo para Colheita de Amostras Biológicas

Protocolo de utilização de EPI's em ambiente de colheita de amostras	
Sequência de Vestir	Sequência de Despir
<ol style="list-style-type: none"> 1. Máscara FFP2 (1) 2. Macacão de proteção individual (1) 3. Bata descartável (1) 4. Toucas (2) 5. Botas tapa pés descartáveis (1) 6. Luvas primárias (1) 7. Viseira (1) 8. Luvas secundárias (1) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Viseira (1) - desinfecção com álcool <p>Material a colocar no saco de lixo risco biológico III:</p> <ol style="list-style-type: none"> 2. Luvas secundárias (1) 3. Botas tapa pés descartáveis (1) 4. Bata descartável (1) 5. Toucas (2) 6. Luvas primárias (1) 7. Macacão de proteção individual (1) 8. Máscara FFP2 (1)

Procedimentos a adotar na colheita de saliva
<ol style="list-style-type: none"> 1. Higienizar o local de colheita borrifando álcool a 70%. Limpar com papel absorvente; 2. O dador deve higienizar as mãos com toalhetas desinfetantes antes da colheita; 3. Instruir o dador acerca do procedimento de colheita; 4. Verificar a codificação da amostra no tubo; 5. Colocar as luvas secundárias e dar o tubo ao dador; 6. Após a colheita, colocar parafilme para vedar a tampa; 7. Desinfetar o tubo de colheita com toalhetas desinfetantes; 8. Colocar o tubo num saco de proteção / contentor secundário, devidamente codificado, e armazenar na caixa de transporte de amostras 9. Remover as luvas secundárias, descartar e borrifar álcool nas luvas primárias; 10. Colocar novas luvas secundárias entre colheitas.