



**UFAM**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS- UFAM  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA  
BÁSICA E APLICADA**



**ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE BASE ÚNICA (SNV) EM GENES DO  
INFLAMASSOMA DE NLRP1, NLRP3 E CITOCINAS IL- 1 BETA E IL-18  
EM INDIVÍDUOS VACINADOS COM A CORONAVAC**

**JULIANA MIRANDA DA SILVA**

**MANAUS**

**2024**



**UFAM**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS- UFAM  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA  
BÁSICA E APLICADA**



**JULIANA MIRANDA DA SILVA**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE BASE ÚNICA (SNV) EM GENES DO  
INFLAMASSOMA DE NLRP1, NLRP3 E CITOCINAS IL- 1 BETA E IL-18 EM  
INDIVÍDUOS VACINADOS COM A CORONAVAC**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Malheiro Alle Marie**

**MANAUS**

**2024**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586a Silva, Juliana Miranda da  
Análise de polimorfismo de base única (SNV) em genes do inflamassoma de NLRP1, NLRP3 e citocinas IL-1 beta e IL-18 em indivíduos vacinados com a CoronaVac / Juliana Miranda da Silva . 2024  
99 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Adriana Malheiro Alle Marie  
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Variações genéticas. 2. Inflamassoma. 3. SARS-CoV-2 . 4. Vacinas. 5. Anticorpos . I. Marie, Adriana Malheiro Alle. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

*Dedico este trabalho aos familiares e amigos,  
que de alguma forma serviram de apoio na aquisição desta conquista.*

*Agradeço especialmente à minha mãe,  
Tereza Cristina e meu pai, Juarez Alves por todo suporte recebido  
durante esta jornada e desenvolvimento deste projeto e amiga Lígia Rodrigues,  
por estar sempre presente nos momentos difíceis.*

*Muito Obrigada!*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, força suprema que me levou a iniciar e finalizar essa incrível jornada.

Aos meus familiares, em especial, mãe Tereza Cristina e pai Juarez Alves pelo incentivo e apoio recebido durante todo o percurso.

À minha querida amiga Lígia Rodrigues, pela presença, pelo incentivo, pela paciência e compreensão e todo o suporte psicológico e emocional que recebi em todos os momentos.

Aos meus animais de estimação pelo amor incondicional e escape.

A doutora Adriana Malheiro, minha orientadora por ter aceitado me orientar, por ter me dado a oportunidade e por toda ajuda que recebi para a elaboração deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e apoio financeiro para a concretização deste trabalho.

A Fundação de Hemoam e ao laboratório de Genômica onde pude trabalhar na realização deste projeto.

À UFAM, Coordenação e Secretaria do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada e seus secretários Edson e Ana Paula pelo apoio e ajuda recebida.

Á todos os professores do PPGIBA pelos ensinamentos, compartilhamento de ideias e experiências que serviram de degrau para a construção dos conhecimentos adquiridos.

“As piores circunstâncias da vida, as situações mais críticas, os fatos mais difíceis, são sempre maravilhosos para o autodescobrimento íntimo.”

Samael Aun Weor

## RESUMO

Há mais de 3 anos desde o início da pandemia, o vírus SARS-CoV-2 já registrou mais de 700 milhões de casos cumulativos de infecções com aproximadamente 6 milhões de mortes em todo o mundo. No Brasil, somam 37 milhões, com mais de 700 mil óbitos. A vacinação contra a COVID-19 é usada como mecanismo de prevenção, conferindo ao indivíduo proteção contra as formas graves da doença. Em estudos que avaliam a eficácia das vacinas é notória a diferença do perfil de resposta imunológica entre os indivíduos vacinados contra a COVID-19. Entre os fatores que podem contribuir para essa diferença de respostas vacinal se encontram os fatores genéticos, que podem colaborar para respostas imunológicas distintas ao vírus pelos indivíduos. Polimorfismos de nucleotídeo único em genes do inflamassoma são frequentemente descritos na literatura como associados a suscetibilidade, predisposição e proteção à diversas doenças, podendo estar relacionados a diferentes respostas imunes à vacinação e estudos imunogenéticos que avaliem possíveis associações de variantes genéticas à eficácia de vacinas são escassos. Por esta razão, o presente trabalho analisou os polimorfismos de base única (SNVs) em genes do inflamassoma *NLRP3* (*rs10754558*, *rs10802502*, *rs3803265*), *NLRP1* (*rs12150220*, *rs35865013*, *rs2670660*) por PCR quantitativa em tempo real e citocinas *IL1B* (*rs16944*) e *IL18* (*rs187238*), por cadeia da polimerase-polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição em indivíduos vacinados com a CoronaVac, afim que de analisar possíveis associações com perfil de resposta humoral apresentado pelos indivíduos imunizados. Foram analisados dados e amostras de 385 participantes, sendo 193 profissionais da Fundação HEMOAM vacinados com duas doses da vacina CoronaVac e 192 controles saudáveis. As amostras dos indivíduos vacinados foram coletadas em três tempos, no tempo 0 (pré-vacina T0 n= 193), 30 dias (T1 n=193) e 90 dias (T2 n=193) após a segunda dose, para genotipagem e quantificação de anticorpos neutralizantes. Os resultados demonstraram diferenças no perfil de resposta imune humoral apresentado pelos indivíduos vacinados, com decaimento da produção de anticorpos neutralizantes 90 dias após a administração da segunda dose. Observamos diferenças estatísticas relacionadas ao aumento e manutenção da produção de anticorpos neutralizantes nos três tempos, associado ao polimorfismo para *IL1B rs16944* genótipo T/T (T0, T/T vs. C/T p=0,039; T1, T/T vs. C/T p=0,001; T2, T/T vs. C/T p=0,021), *NLRP1 rs12150220* genótipo T/T (T1, T/T vs. A/A, p= 0,007), *NLRP3 rs10802502* genótipo C/C (T1, T/T vs C/C, p=0,016; T2, T/T vs C/C, p= 0,032, *NLRP3 rs3806265* genótipo C/T e T/T (T1 C/C vs. C/T p=0,031; T/T vs. C/C p= 0,045; T2 C/C vs C/T p= 0,009; T/T vs. C/C, p=0,020, enquanto os genótipos C/T *IL1B rs16944*, A/A *NLRP1 12150220*, T/T *NLRP3 10802502* e C/C *rs3806265* parecem influenciar para uma baixa produção de anticorpos, podendo estar relacionados a títulos diminuídos de anticorpos em indivíduos imunizados com a CoronaVac.

**Palavras-chave:** Variações genéticas. Inflamassoma. SARS-Cov-2. Vacina. Anticorpos. Imunidade Inata.

## ABSTRACT

More than 3 years since the start of the pandemic, the SARS-CoV-2 virus has recorded more than 700 million cumulative cases of infections with approximately 6 million deaths worldwide. In Brazil, there are 37 million, with more than 700 thousand deaths. Vaccination against COVID-19 is used as a prevention mechanism, providing the individual with protection against serious forms of the disease. In studies that evaluate the effectiveness of vaccines, the divergence of the immunological response profile among individuals vaccinated against COVID-19 is notable. Among the factors that may contribute to this difference in vaccine responses are genetic factors, which can contribute to different immunological responses to the virus by individuals. Single nucleotide polymorphisms in inflammasome genes are frequently described in the literature as associated with susceptibility, predisposition and protection to various diseases, and may be related to different immune responses to vaccination and immunogenetic studies that evaluate possible associations of genetic variants with vaccine efficacy are scarce. . For this reason, the present work analyzed single base polymorphisms (SNVs) in NLRP3 inflammasome genes (rs10754558, rs10802502, rs3803265), NLRP1 (rs12150220, rs35865013, rs2670660) by real-time quantitative PCR and IL-1beta cytokines (rs16944 ) and IL18 (rs187238), by polymerase chain-restriction fragment length polymorphism in individuals vaccinated with CoronaVac, in order to analyze possible associations with the humoral response profile presented by immunized individuals. Data and samples from 385 participants were analyzed, including 193 professionals from the HEMOAM Foundation vaccinated with two doses of the CoronaVac vaccine and 192 healthy controls. Samples from vaccinated individuals were collected at three times, at time 0 (pre-vaccine T0 n= 193), 30 days (T1 n=193) and 90 days (T2 n=193) after the second dose, for genotyping and quantification. of neutralizing antibodies. The results demonstrated differences in the humoral immune response profile presented by vaccinated individuals, with a decline in the production of neutralizing antibodies 90 days after administration of the second dose. We observed statistical differences related to the increase and maintenance of neutralizing antibody production at the three times, associated with the polymorphism for IL1Brs16944 T/T genotype (T0, T/T vs. C/T p=0.039; T1, T/T vs. . C/T p=0.001; T2, T/T vs. C/T p=0.021), NLRP1 rs12150220 T/T genotype (T1, T/T vs. A/A, p= 0.007), NLRP3 rs10802502 C genotype /C (T1, T/T vs. C/C, p=0.016; T2, T/T vs. C/C, p= 0.032, NLRP3 rs3806265 genotype C/T and T/T (T1 C/C vs. C/ T p=0.031; T/T vs. C/C p= 0.045; T2 C/C vs. C/T p= 0.009; T/T vs. C/C, p=0.020, while the C/T IL- genotypes 1β rs16944, A/A NLRP1 12150220, T/T NLRP3 10802502 and C/C 3806265 seem to influence a decreased production of antibodies, which may be related to low antibody titers in individuals immunized with CoronaVac.

**Keywords:** Genetic variations. Inflammasome. SARS-CoV-2. Vaccine. Antibodies. Innate Immunity.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Taxonomia e árvore filogenética dos coronavírus.....	12
<b>Figura 2</b>	Estrutura genômica dos betacoronavírus SARS-CoV-2, SARS-CoV e MERS-CoV, com demonstração das semelhanças e diferenças genômicas entre as três espécies.....	14
<b>Figura 3</b>	Esquema de origem dos coronavírus e evolução para espécie humana.....	15
<b>Figura 4</b>	Mapa epidemiológico mundial com cumulativo de número de casos e óbitos.....	18
<b>Figura 5</b>	Mapa epidemiológico da COVID-19 no Brasil.....	19
<b>Figura 6</b>	Esquema ilustrativo da estrutura de um coronavírus demonstrando as proteínas estruturais e genoma.....	20
<b>Figura 7</b>	Esquema de representação da proteína S e subunidades S1 e S2; Interação da proteína S com ACE2 humano, ativação pelo TMPRSS2 e entrada do vírus na célula.....	22
<b>Figura 8</b>	Representação esquemática ciclo de vida e replicação do SARS-CoV-2.....	24
<b>Figura 9</b>	Esquema de meio de transmissão do SARS-CoV-2.....	26
<b>Figura 10</b>	Reconhecimento do SARS-CoV-2 por TLR 3, 4, 7 e 8.....	33
<b>Figura 11</b>	Esquema de ativação do Inflamassoma na COVID- 19.....	38
<b>Figura 12</b>	Quantificação de Ac neutralizantes anti- SARS-CoV-2, D0, 30 e 90 dias.....	59
<b>Figura 13</b>	Eletroforese em gel de agarose para o polimorfismo no gene IL1Brs16944 (T/T-304pb), (C/C-190 pb), (C/T-304/190/114 pb).....	92
<b>Figura 14</b>	Eletroforese em gel de agarose para o polimorfismo no gene IL18 rs187238 (C/C -155 pb), (G/G -116 pb), (G/C -155, 116 e 39 pb).....	93
<b>Figura 15</b>	Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene NLRP1 rs12150220. A – Curvas de amplificação de 96 amostras. B - Homozigoto selvagem (AA). C – Homozigoto polimórfico (TT). D – Heterozigoto (AT).....	94
<b>Figura 16</b>	Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene NLRP1 rs35865013. A – Curvas de amplificação de 96 amostras. B - Homozigoto selvagem (AA). C- Homozigoto polimórfico (GG). D – Heterozigoto (AG).....	94
<b>Figura 17</b>	Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene NLRP1 rs2670660. A – Curvas de amplificação de 96 amostras. B - Homozigoto selvagem (AA). C – Heterozigoto (AG).....	95
<b>Figura 18</b>	Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene NLRP3 rs10754558. A – Curvas de amplificação de 96 amostras. B - Homozigoto selvagem (CC). C –	

	Homozigoto polimórfico (GG). D- Heterozigoto (AG).....	96
<b>Figura 19</b>	Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene NLRP3 rs10805502. A – Curvas de amplificação de 96 amostras. B - Homozigoto selvagem (CC). C – Homozigoto polimórfico (TT). D- Heterozigoto (CT).....	96
<b>Figura 20</b>	Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene NLRP3 rs3806265. A – Curvas de amplificação de 96 amostras. B - Homozigoto selvagem (CC). C – Homozigoto polimórfico (TT). D- Heterozigoto (CT).....	97

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Características demográficas da população de estudo, distribuição por gênero, idade e etnia.....	57
<b>Tabela 2</b>	Descrição dos eventos adversos e número de indivíduos que contraíram COVID-19 antes e após a vacinação.....	58
<b>Tabela 3</b>	Tabela de frequência dos alelos e genótipos dos polimorfismos nos genes NLRP1, NLRP3, IL1 $\beta$ e IL18.....	61

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Sinais e sintomas clássicos da COVID- 19.....	26
<b>Quadro 2</b>	Sinais e sintoma de cada variante de importância do SARS- CoV-2.....	26
<b>Quadro 3</b>	Drogas anti-inflamatórias e antivirais usadas para o tratamento de COVID- 19.....	29
<b>Quadro 4</b>	Programação do termociclador para amplificação dos genes de IL-1Beta.....	52
<b>Quadro 5</b>	Programação do termociclador para amplificação dos genes de IL18.....	52
<b>Quadro 6</b>	Descrição dos Primers de IL-1Beta, temperatura de pareamento (Tp) utilizada para amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos que deverão ser obtidos após a PCR e reação de restrição (RFLP).....	53
<b>Quadro 7</b>	Descrição dos Primers de IL18, temperatura de pareamento (Tp) utilizada para amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos que deverão ser obtidos após a PCR e reação de restrição (RFLP).....	53
<b>Quadro 8</b>	Descrição dos genes, referência dos SNVs e localização.....	54

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Razão das medianas de cada tempo e comparação da produção de anticorpos antes e após a vacinação.....	60
<b>Gráfico 2</b>	Razão das medianas de cada tempo e comparação da produção de anticorpos de acordo com a distribuição genotípica para a variante IL18 rs187238.....	66
<b>Gráfico 3</b>	Razão das medianas de cada tempo e comparação da produção de anticorpos de acordo com a distribuição genotípica para a variante IL1Brs19644.....	67
<b>Gráfico 4</b>	Razão das medianas de cada tempo e comparação da produção de anticorpos de acordo com a distribuição genotípica para a variante NLRP1 rs12150220, rs35865013, rs2670660.....	68
<b>Gráfico 5</b>	Razão das medianas de cada tempo e comparação da produção de anticorpos de acordo com a distribuição genotípica para a variante NLRP3 rs10754558.....	68
<b>Gráfico 6</b>	Razão das medias de cada tempo e comparação da produção de anticorpos de acordo com a distribuição genotípica para a variante NLRP3 rs10802502, rs3806265.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>SARS-CoV- 2</b>	Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave
<b>APCs</b>	Células apresentadoras de antígeno
<b>ASC</b>	Proteína do tipo speck contendo CARD associada à apoptose-(Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)
<b>CARD</b>	Domínio de recrutamento e ativação de Caspase - (Caspase activation and recruitment domain)
<b>WHO</b>	Organização mundial de saúde- (World Health Organization)
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>COVID-19</b>	Doença causada pelo coronavírus 2- (Corona virus disease 2019)
<b>PAMPS</b>	Padrões moleculares associados a patógenos - (Pathogen associated molecular pattern)
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico- (Ribonucleic acid)
<b>DAMP</b>	Padrões moleculares associados ao dano – (Damage associated molecular pattern)
<b>CoV</b>	Coronavírus
<b>ORF</b>	Fases abertas de leituras- (Open Reading Frames)
<b>SARS -CoV</b>	Coronavírus da Síndrome respiratória aguda grave – (Corona Virus Severe Acute Respiratory Syndrome)
<b>MERS-CoV</b>	Coronavírus da Síndrome respiratória do Médio Oriente- (Corona Virus Middle East Respiratory Syndrome)
<b>ACE2</b>	Enzima Conversora de Angiotensina 2- ( Angiotensin converting enzyme 2)
<b>ESPII</b>	Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina-1 $\beta$
<b>IL18</b>	Interleucina-18
<b>IFN</b>	Interferon
<b>UTRs</b>	Regiões não traduzidas – ( Untranslated Region)
<b>LRR</b>	Domínio rico em repetições de leucina – (Leucine-rich repeat)
<b>MHC-II</b>	Complexo principal de histocompatibilidade II – (Major Histocompatibility Complex)
<b>NACHT</b>	Domínio de ligação a nucleotídeos central
<b>NF-kB</b>	Fator de transcrição nuclear Kappa B- (Nuclear factor Kappa B)
<b>NLR</b>	Receptores semelhantes a NOD- (NOD like receptor)
<b>NLRP</b>	Receptores semelhantes a NOD com domínio pirina

<b>NOD</b>	Domínio de oligomerização de nucleotídeos
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PYD</b>	Domínio de pyrin
<b>PRR</b>	Receptores de reconhecimento de padrão
<b>qPCR</b>	PCR Quantitativa em Tempo Real
<b>RT-PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa
<b>SNV</b>	Polimorfismo de Base Única- (Single nucleotide polymorphism)
<b>TCD8+</b>	Linfócitos T citotóxicos
<b>TCR</b>	Receptor de célula T
<b>T<sub>H</sub>1</b>	Linfócitos T helper tipo 1
<b>TMPRSS2</b>	Serina protease transmembrana tipo 2
<b>RBD</b>	Domínios de ligação ao receptor
<b>DPOC</b>	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
<b>UV</b>	Luz ultravioleta
<b>NP</b>	Núcleo Proteína
<b>SI</b>	Sistema imunológico
<b>TLRs</b>	Receptores tipo Toll
<b>CLR</b>	Receptor de lectina tipo C
<b>RIG-I</b>	Helicase tipo gene estimulado por ácido retinóico I
<b>NK</b>	Célula Natural Killer
<b>IRF</b>	Fator regulador de interferon
<b>Mrna</b>	RNA mensageiro
<b>NSP</b>	Proteína não estrutural
<b>TNF</b>	Fator de Necrose Tumoral
<b>TCD4+</b>	Linfócito T auxiliar
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>RFLP</b>	Reação de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Coronavírus, taxonomia e estrutura .....</b>	<b>12</b>
2.1.1 Origem, evolução e coronavírus de importância médica.....	14
<b>2.2 SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19.....</b>	<b>16</b>
2.2.1 Aspectos epidemiológicos da COVID-19.....	17
2.2.2 Estrutura do SARS-CoV-2.....	19
2.2.3 Patogênese da COVID-19, mecanismo de entrada e replicação do SARS-CoV-2 na célula humana .....	22
2.2.4 COVID-19 e comorbidades .....	24
2.2.5 Modo de transmissão do SARS-COV-2 .....	25
2.2.6 Manifestações clínicas do SARS-CoV-2.....	26
2.2.7 Diagnóstico Laboratorial .....	27
2.2.8 Tratamentos disponíveis para infecção pelo SARS-CoV-2.....	29
2.2.9 Variantes do SARS-CoV-2 e os seus impactos .....	30
<b>2.3 Mecanismos de reconhecimento e resposta imune contra o SARS-CoV-2.....</b>	<b>31</b>
2.3.1 Reconhecimento e resposta imune inata ao SARS-Cov-2.....	31
2.3.2 Inflamassoma .....	35
2.3.3 Resposta Imune adaptativa ao SARS-CoV-2 .....	39
<b>2.4 Vacinas.....</b>	<b>40</b>
2.4.1 CoronaVac .....	41
2.4.2 Astrazeneca.....	42
2.4.3 Pfizer.....	43
2.4.4 Jansen.....	43
<b>2.5 Imunidade vacinal contra a COVID-19.....</b>	<b>44</b>



2.5.1 Fatores que interferem na resposta imune vacinal.....	45
2.6 Polimorfismo genéticos e COVID-19 .....	47
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>49</b>
4.1 Objetivo Geral.....	49
4.2 Objetivos Específicos .....	49
<b>5. METODOLOGIA.....</b>	<b>50</b>
5.1 Fluxograma de atividades .....	50
5.2 Aspectos éticos.....	50
5.3 Tipo de estudo .....	51
5.4 População de estudo e amostragem.....	51
5.5 Critérios de elegibilidade.....	51
5.6 Coleta das Amostras .....	52
5.7 Extração e quantificação do DNA .....	52
5.8 Genotipagem por PCR-RFLP para estudos de polimorfismos dos genes de IL-1Beta e IL18.....	52
5.9 Genotipagem por PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) para estudos de polimorfismos em genes de NLRP3, NLRP1.....	54
5.9.1 Quantificação de anticorpos neutralizantes. ....	55
5.9.2 Análise dos resultados. ....	55
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
6.1 Dados demográficos.....	56
6.2 Quantificação de Anticorpos neutralizantes .....	57
6.3 Análise da frequência alélica e genotípica dos polimorfismos estudados em indivíduos vacinados e indivíduos controles.....	59
6.4 Análise de associação entre os genótipos das variantes estudadas e a produção de anticorpos neutralizantes nos tempos 0, 30 e 90 dias após a segunda dose. ....	65
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>84</b>
<b>Apêndice 01. Equipe do projeto.....</b>	<b>84</b>
<b>Apêndice 02. Protocolos PCR-RFLP e GEL DE AGAROSE IL1Be IL18.....</b>	<b>85</b>
<b>Apêndice 03. Protocolos qPCR: NLRP1 e NLRP3 .....</b>	<b>90</b>
<b>Apêndice 04: Géis de eletroforese para os polimorfismos envolvendo IL1Be IL18. ...</b>	<b>91</b>
<b>Apêndice 05: Gráficos de discriminação alélica dos polimorfismos nos genes NLRP1 e NLRP3.....</b>	<b>93</b>
<b>Apêndice 06: Questionário e ficha cadastral individual.....</b>	<b>97</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A pandemia de COVID-19, doença infecciosa e inflamatória provocada pelo vírus SARS-CoV-2, já registrou cerca de 763 milhões de infecções cumulativas, com mais de 6 milhões de óbitos em todo o mundo. No Brasil, os números de casos somam 37 milhões e acumulam a cota de mais de 700 mil mortes, (OMS et al., 2023).

A imunização ativa (vacinas) ainda é considerada a arma mais eficaz no combate ao novo coronavírus por proporcionar a ativação do sistema imunológico, sensibilizando-o a montar mecanismos de defesa para combater de forma específica o SARS COV-2, sendo assim, indispensável no enfrentamento da pandemia, (TORAIH et al., 2020).

Existem diversos fatores que podem afetar a imunidade induzida pela imunização, entre eles destacam-se os fatores intrínsecos ao hospedeiro e dentro destes, encontram-se os polimorfismos genéticos. Diversos estudos apontam que essas variações genéticas podem interferir na resposta imunológica, muita das vezes levando a suscetibilidade em doenças infecciosas, inflamatórias, autoimunes e cânceres, (ANDRADE, 2019; CONCEIÇÃO, 2013; PONTILLO, 2014).

Os inflamassomas são complexos multiproteicos que se agrupam no citoplasma em resposta ao reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPS) e padrões moleculares associados a danos (DAMPS), levando a liberação das citocinas pró-inflamatórias *IL1B* e *IL18* em sua forma ativa, o que desencadeia um dos principais mecanismos efetores da imunidade inata, a inflamação, (ALVES, 2020).

Estudos demonstram a participação ativa dos receptores do tipo Nod, em especial o de NLRP3, em mediar a formação de inflamassoma, na infecção pelo SARS-CoV-2 e no desenvolvimento da COVID-19 grave. Variações genéticas em genes da via do inflamassoma vem sendo frequentemente associado à suscetibilidade a diversas doenças de importância clínica, (ANDRADE, 2019; JUNQUEIRA et al., 2021).

Embora os inflamassomas estejam ativos e participem da patogênese da COVID-19, bem como sejam associados a diversas doenças, não há até o momento estudos que relacionem SNVs em genes de *NLRP1*, *NLRP3* e citocinas *IL1B* e *IL18* com o perfil de resposta imune apresentada por indivíduos vacinados, sendo assim, ainda não está claro as possíveis influência que essas variantes genéticas podem exercer na resposta adaptativa dos indivíduos imunizados.

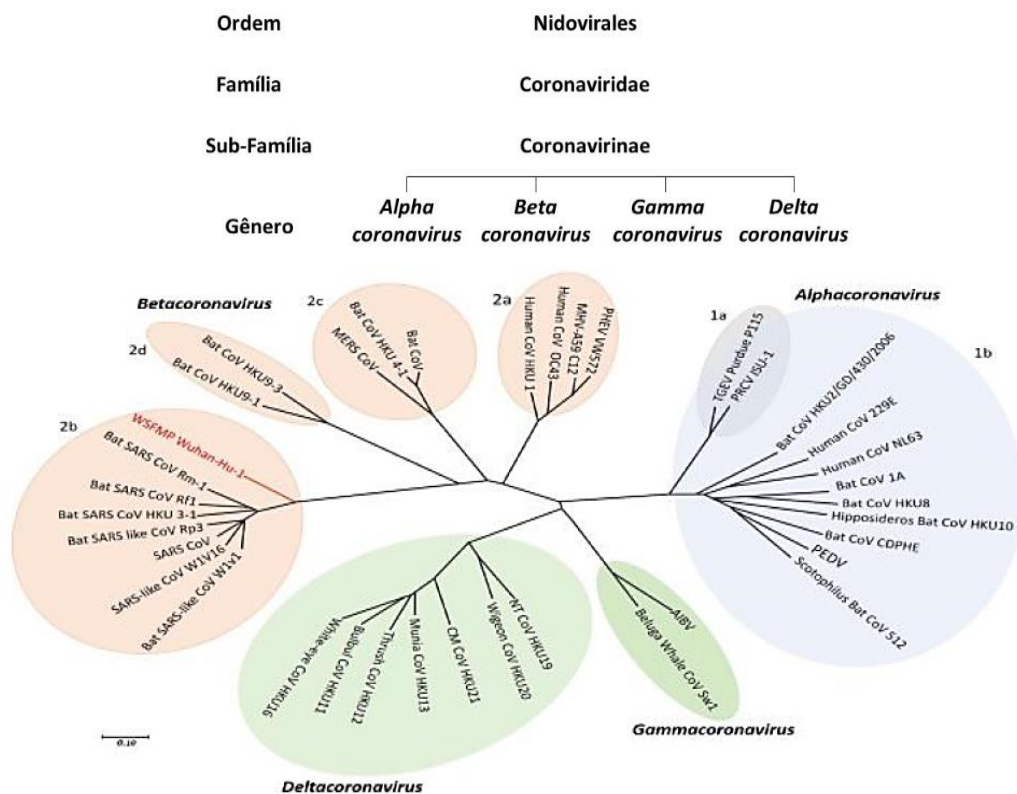
Desta forma, nesse estudo descrevemos a frequência dos polimorfismos em genes do inflamassoma mediado pela proteína de *NLRP3* (*rs10754558*, *rs10802502*, *rs3806265*),

*NLRP1*(*rs12150220*, *rs35865013*, *rs2670660*), bem como das citocinas *IL1B* (*rs16944*) e *IL18* (*rs187238*) em profissionais de saúde vacinados com a CoronaVac e sua associação com a produção de anticorpos neutralizantes nesses indivíduos.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Coronavírus, taxonomia e estrutura

Os coronavírus fazem parte da ordem Nidovirales, família Coronaviridae e subfamília taxonômica Orthocoronavirinae, este último se divide em quatro gêneros principais: Os *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*. Os gêneros Alpha e Beta estão entre os que mais infectam seres humanos e animais, e onde estão inseridas as sete espécies que causam infecções em humanos, (SHEREEN et al., 2020).



**Figura 1:** Taxonomia e árvore filogenética da família Coronaviridae segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus. A imagem, demonstra a árvore filogenética de 37 coronavírus com seqüências nucleotídicas parciais de RNA polimerase dependentes de RNA. Os coronavírus são classificados em quatro gêneros, Alfa, Beta (linhagens a, b, c e d), Gama e Delta. A árvore foi construída pela união de parentesco. A barra de escala à esquerda, indica o número estimado de substituições por 20 nucleotídeos.

**Fonte:** Adaptado de Sheren et al., 2020.

No gênero *Alphacoronavirus*, por exemplo, se encontram as espécies HCoV-229E e

HCov -NL63, que infectam seres humanos causando infecções respiratórias comuns e de menor gravidade, (PALÚ, 2021).

No gênero *Betacoronavírus* se encontram as espécies HCoV-OC43 e HCoV- HKU1 que assim, como os descritos acima, também causam infecções comuns de menor gravidade, mas também se encontram as espécies de implicações clínicas mais relevantes como a SARS CoV, SARS-CoV-2 e MERS-CoV, (DA SILVA et al., 2021).

Na espécie SARS-CoV se encontram as cepas SARS-CoV e SARS-CoV-2 que causam a Síndrome respiratória aguda grave (SARS) e a doença do coronavírus 2019 (COVID-19), respectivamente. Outra espécie relevante é a MERS-CoV, causadora da Síndrome Respiratória do Médio Oriente, (PEREIRA DA CRUZ; TOMÉ, 2021).

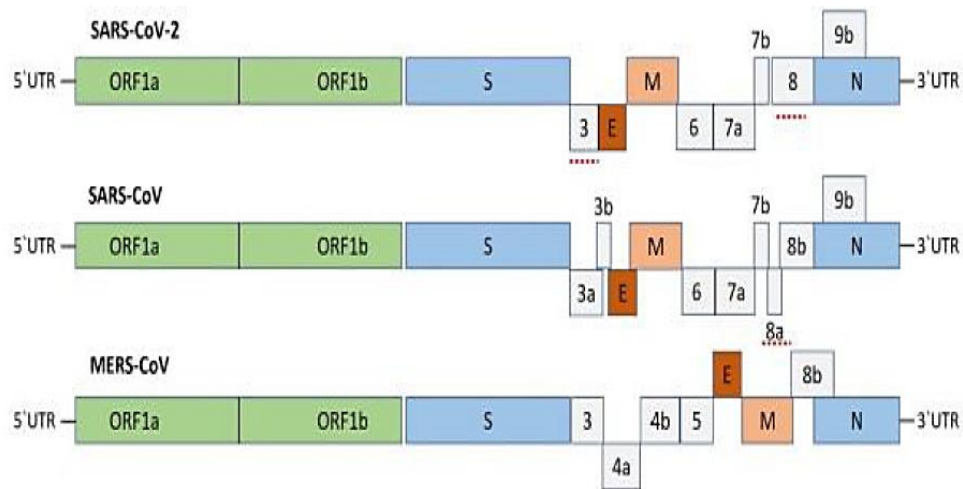
A maioria dos Coronavírus (CoVs) que infectam seres humanos causam usualmente infecções leves e moderadas, no entanto, alguns indivíduos apresentam evolução de maior gravidade, (SANTOS et al., 2021).

Os casos que evoluem para gravidade geralmente apresentam como característica clínica em comum, o acometimento principalmente das vias respiratórias, no entanto, outros órgãos também podem ser afetados como o trato gastrointestinal, hepático e sistema nervoso central, (GÓES, 2012).

Os CoVs, fazem parte de uma grande família de vírus descobertos em meados da década de 60, responsáveis por causar infecções respiratórias em seres humanos e animais. São vírus que possuem envelope e medem aproximadamente cerca de 100 a 160 nm de diâmetro sendo revestidos por proteínas de superfície, dentre estas se encontram a proteína E (proteína de envelope), a proteína S que forma as projeções de espículas que dão característica de coroa ao vírus e de onde deriva seu nome, (GÓES, 2012; PALÚ, 2021).

Os CoVs também apresentam uma proteína M e N (proteína de membrana e nucleocapsídeo, respectivamente), esta última ancora o genoma viral, um RNA de fita simples de sentido positivo contendo 30 kb aproximadamente e essa característica genômica confere ao vírus a capacidade de ter seu material genético diretamente transcrito e traduzido, logo após entrar na célula hospedeira, (DA SILVA et al., 2021).

Na sua estrutura genômica, na porção 5', seus dois terços iniciais apresentam genes que codificam uma poliproteína. As ORF1a e ORF1b estão envolvidas na transcrição e replicação do genoma viral e quando traduzidas são clivadas em mais 16 proteínas não estruturais dando origem a replicase. Esta, por sua vez, é constituída por um conjunto de enzimas responsáveis por realizar a transcrição e tradução do genoma pelo complexo de transcriptase viral, (AZEVEDO, 2020).



estrutura genômica dos *betacoronavírus* SARS-CoV-2, SARS-CoV e MERS-CoV, com demonstração das semelhanças e diferenças genômicas entre as três espécies. Os genomas iniciam com a região não traduzida da extremidade 5' (5' -UTR), seguido dos quadros abertos de leitura (ORFs) 1a e b (Verde) responsáveis pela codificação das proteínas não estruturais (NSP) necessárias para a replicação que são altamente conservadas entre as espécies. Após, estão os genes que codificam as proteínas estruturais incluindo a proteína espícula (Azul), seguido de envelope (Laranja), membrana (Marrom) e proteínas do nucleocapsídeo (Azul). Os genes que codificam as proteínas acessórias (em branco) são exclusivos de cada cepa de coronavírus em termos de número, organização genômica, sequência e função.

**Fonte:** Shereen et al., 2020.

Como mostrado na figura 1 a parte 5' é relativamente conservada entre os coronavírus e as diferenças entre as espécies é observada principalmente na sua porção 3', onde se encontram os genes responsáveis pela codificação das proteínas estruturais (ORFs estruturais), como as proteínas de superfície, envelope e spike, bem como de membrana e nucleocapsídeo, sendo os genes S e M os que apresentam as principais diferenças estruturais observadas, conferindo características a cada espécie, (PALÚ, 2021; SHEREEN et al., 2020).

A porção 3' também codifica as proteínas não estruturais, que não possuem uma função específica na replicação, mas que demonstraram ser necessárias para o processo de recombinação do vírus, (PEREIRA DA CRUZ; TOMÉ, 2021).

### 2.1.1 Origem, evolução e coronavírus de importância médica.

A emergência de novas espécies ou cepas virais se dá por um processo natural de adaptação e evolução, onde cepas que apresentam melhor capacidade de adequar-se ao meio e maior virulência durante a passagem por diferentes organismos, são selecionadas,

(AZEVEDO, 2020).

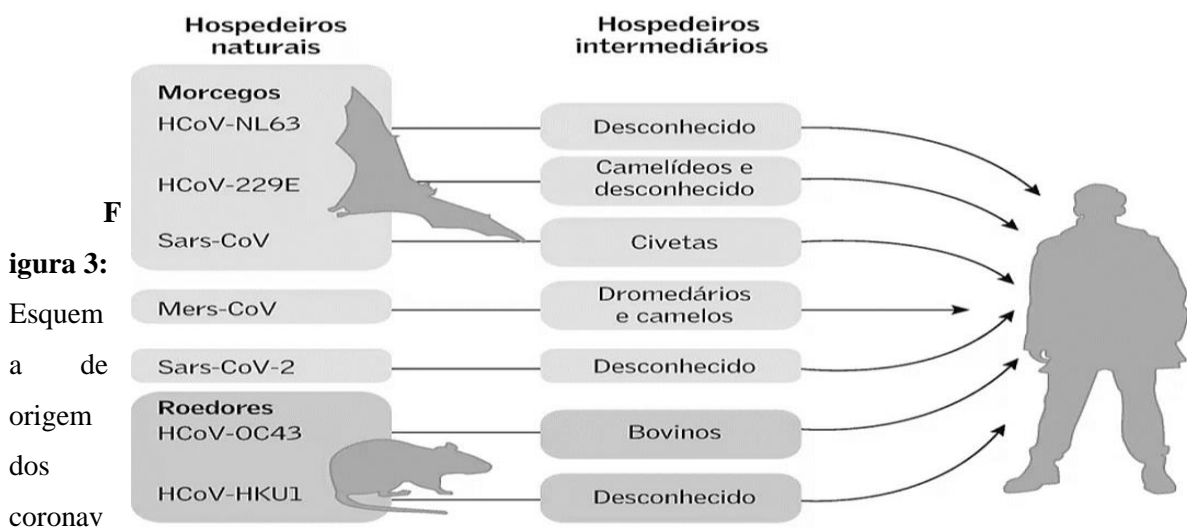
Em geral, os vírus emergentes têm como material genético moléculas de RNAs o que lhes conferem uma elevada capacidade de mutação, seja por erros de transcrição e tradução ou recombinação gênica, (SHEREEN et al., 2020).

Existem alguns fatores que podem contribuir para a emergência de doenças ocasionadas por cepas virais previamente caracterizadas ou não, uns inerentes ao próprio hospedeiro, como, por exemplo, o aumento de indivíduos imunossuprimidos na população, resultando em suscetibilidade a infecções diversas; outros inerentes a espécie viral, como as alterações genéticas que podem conferir ao microrganismo uma maior capacidade de adaptação e virulência como ocorreu com o sarampo e Zika vírus, (BORGES, 2020).

As modificações no ecossistema ocasionado pelo homem, como a destruição da biodiversidade, expansão demográfica, poluição e conseqüentemente, aquecimento global, podem induzir a infecções de novos hospedeiros vertebrados, servindo de vetores ou reservatórios e assim, levar a uma adaptação, favorecendo a emergência de novos vírus, uma vez que perturbações ecológicas podem induzir a novos ciclos de transmissão e conseqüente adaptação, (GRÄF, 2020).

Entre os hospedeiros naturais dos coronavírus se encontram os morcegos e roedores, todas as sete espécies conhecidas que infectam os seres humanos evoluíram de coronavírus de outros animais, (SHEREEN et al., 2020).

Algumas espécies de coronavírus vêm ganhando ênfase mundial em razão de sua emergência, grande variabilidade clínica, tratamento divergente e sua capacidade de propagação, (BORGES, 2020).



vírus e evolução para espécie humana.

**Fonte:** International Journal of Biological Science., 2020.



Há três cepas de coronavírus emergentes de importância médica capazes de ocasionar doenças em humanos, apresentando um impacto elevado à saúde pública, sendo o primeiro, responsável por surtos de Síndrome Respiratória Aguda Grave em 2002 e 2003 na China, SARS-CoV-1, a MERS-CoV, que levou a surtos de Síndrome Respiratória do Oriente Médio em 2012 e, de consequência mais grave, o novo coronavírus SARS-CoV-2, responsável pela pandemia de COVID-19, que assim como a SARS-CoV-1 também teve origem na China, (BORGES, 2020; GRÄF, 2020; SHEREEN et al., 2020).

O agrupamento das espécies de coronavírus é feito por meio de análises filogenéticas, essas análises incluíram as três espécies emergentes no grupo dos *betacoronavírus*. As três espécies apresentam relações de parentesco tendo a SARS-CoV 79% de homologia genética com o SARS-CoV-2 e a MERS-CoV 51,8% de semelhança genética, (PALÚ, 2021).

Estudos associam a emergência do SARS-CoV às mutações surgidas em genes de coronavírus de morcego, o qual é o reservatório natural de grande parte dos coronavírus, (R. FEHR ANTHONY, 2015).

O SARS-CoV tem uma proteína de superfície denominada proteína S que interage com um receptor celular humano conhecido como Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2), essa interação promove a entrada do vírus na célula, (LI et al., 2003).

Esses mesmos fatores virais que facilitam a ocorrência de mutações genéticas no genoma viral permitiram, por exemplo, a emergência de uma nova cepa de SARS-CoV. O SARS-CoV-2 apresenta mutações que conduziram a troca de aminoácidos na proteína S do vírus que conferiu uma maior especificidade de interação com o receptor celular humano ACE2, resultando em aumento da capacidade do vírus de infectar células humanas, maior virulência e alto poder de contágio entre pessoas, (GRÄF, 2020; WALLS et al., 2020).

Sendo assim, a disseminação intra e inter-espécie, bem como os processos de recombinação gênica, fatores intrínsecos dos hospedeiros, e desequilíbrio ecológico são fatores essenciais que favorecem o pulo entre espécies e emergência de novas linhagens de coronavírus. Esses processos ajudam na sobrevivência e seleção de novas linhagens, (CORMAN et al., 2018).

## **2.2 SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19**

No final de 2019, a China teve um surto de pneumonia severa de causa desconhecida que acometia principalmente adultos, que posteriormente através de estudos foi demonstrado que se tratava de um coronavírus, (PALÚ, 2021).

A SARS-CoV-2, responsável pela doença infecciosa denominada COVID-19, se

disseminou rapidamente para vários países, sendo em 11 de março de 2020 declarado pandemia pela Organização Mundial de Saúde, (BORGES, 2020).

Ainda há muitas incertezas sobre a origem do SARS-CoV-2, mas análises genéticas apontaram uma similaridade genômica que varia de 80 a 90% com coronavírus de morcegos que causam síndrome respiratória aguda grave: bat-SL-CoVZC45 e bat-SL-CoVZXC2, indicando assim, que os morcegos são os reservatórios do agente etiológico da COVID-19, o SARS-CoV-2, (PEREIRA DA CRUZ; TOMÉ, 2021).

A dúvida sobre como o SARS-CoV-2 conseguiu fazer esse pulo entre espécies e qual animal seria o hospedeiro intermediário que teria auxiliado o vírus nesse processo evolutivo que atinge seres humanos ainda está em discussão, mas pesquisas apontam que o mamífero pangolim seria o animal responsável por este feito, (AZEVEDO, 2020).

Nas epidemias de SARS e MERS, observou-se interação reduzida da proteína de superfície dos vírus com o receptor da mucosa respiratória humana, tendo como consequência o contágio diminuído. Essa interação diminuída foi um dos motivos principais do crescimento do contágio não ser tão elevado como da COVID-19, (PIMENTEL et al., 2020).

A evolução da nova cepa de coronavírus é um resultado da seleção natural que geram mutações na estirpe viral de um coronavírus de morcego que conferiu ao SARS-CoV-2 uma elevada capacidade de interação com o receptor celular da mucosa respiratória, esse modelo chave fechadura garantiu ao vírus um alto poder de contágio, fazendo com que o vírus pudesse ser disseminado com facilidade para diversas partes do mundo, (GRÄF, 2020; SHEREEN et al., 2020).

Diferentemente da SARS-CoV, o novo coronavírus consegue acionar uma protease transmembrana chamada furina que está presente em qualquer tipo celular, a utilização da furina pré-ativa as proteínas de superfície do vírus favorecendo disseminação viral entre as células, (SHANG, 2020), bem como favorecendo o escape da resposta imunológica humoral promovida pelo hospedeiro, gerando maior capacidade de liberação de partículas virais, sendo apontado como um dos fatores que fazem a COVID-19 ser mais transmissível do que a SARS-CoV, (PEREIRA DA CRUZ; TOMÉ, 2021).

### 2.2.1 Aspectos epidemiológicos da COVID-19

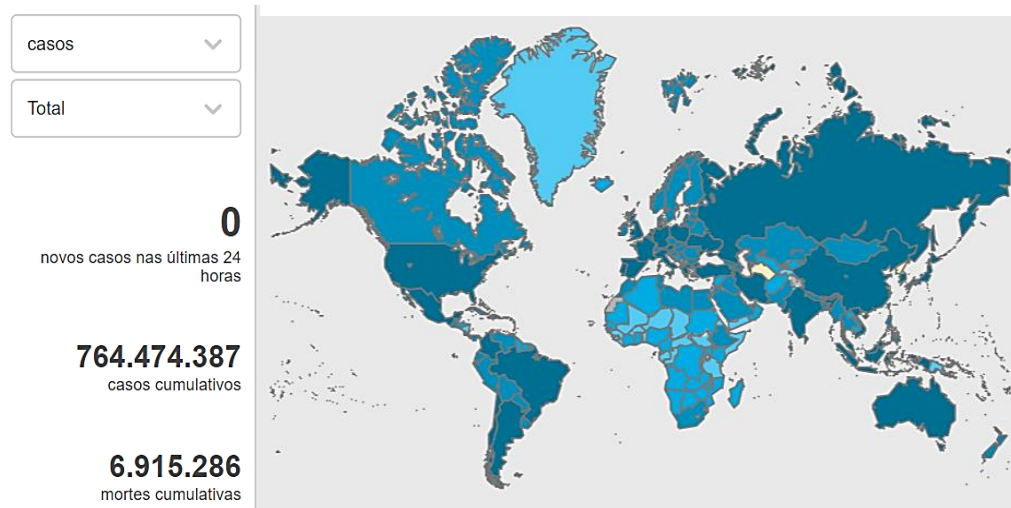
Apesar de possuir uma letalidade mais baixa, em relação à SARS-CoV-1 e MERS-CoV, o SARS-CoV-2 apresentou uma maior sustentabilidade biológica na espécie humana, o que proporcionou a sua rápida propagação para diversos países e devido ao crescimento

exponencial do número de casos a Organização mundial de saúde (OMS) declarou em janeiro de 2020 o surto causado pelo novo coronavírus como uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), em fevereiro de 2020, a OMS nomeou a infecção causada pelo novo coronavírus 2 de COVID-19, (PALÚ, 2021).

A alta capacidade de contágio do SARS-CoV-2, unida a inexistência de imunidade prévia, vacinas e tratamento específico para a população, fez com que o número de casos e óbitos crescesse rapidamente em todo o mundo, declarado em 11 de março de 2020 pela Organização Mundial de Saúde, situação de pandemia, (PIMENTEL et al., 2020).

O início de 2021 foi marcado pela segunda onda de infecções pelo SARS-CoV-2 no Brasil, sendo muito mais grave que a primeira, e apesar de já existir vacina disponível, a sua aquisição e distribuição seguia em ritmo lento, possibilitando assim, o avanço da doença em todo o país, (CLÍNICAS, 2021).

A cidade de Manaus, capital do Amazonas, foi a cidade mais afetada pela segunda onda de COVID-19 no país ocasionada pela nova variante do SARS-CoV-2, denominada de P.1 (variante Gama) que levou ao colapso do serviço de saúde e falta de oxigênio, ocasionando a morte de várias pessoas, (MOURA et al., 2021).



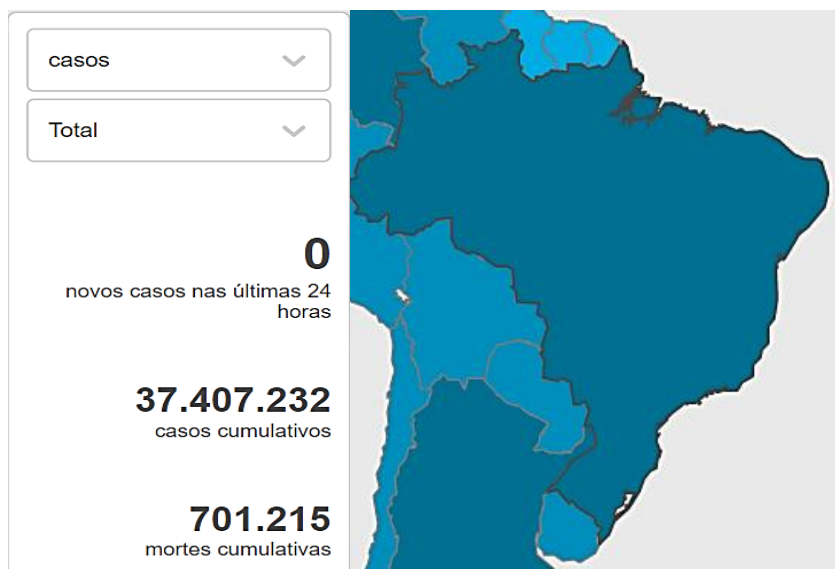
**Figura 4:** Mapa epidemiológico mundial com acumulativo de número de casos e óbitos.

**Fonte:** WHO et al., 2023.

Em 3 anos desde seu início, mais de 700 milhões de casos cumulativos de infecção pelo SARS-CoV-2 já foram confirmadas e mais de 6 milhões de indivíduos vieram a óbito pela doença a nível global. Ao todo, mais de 13 bilhões de doses de vacina foram aplicadas em todo o mundo. Os Estados Unidos lideram em número de casos cumulativos e mortes, (WHO et al., 2023).

No Brasil, os números de casos cumulativos somam mais de 37 milhões e o número de mortes acumulam uma cota de mais de 700 mil. Para conter o avanço da doença, vacinas estão sendo aplicadas na população e, no Brasil atualmente, mais de 500 milhões de doses de vacinas já foram administradas, (OPAS et al., 2023).

Dentre as variantes do SARS-CoV-2 de preocupação que seguem circulando nas populações destacam-se: Alfa, Beta, Gama, Delta e Ômicron. A Organização mundial de saúde declarou em 26 de novembro de 2021 a variante B.1.1.529, também conhecida como ômicron, a variante do SARS-CoV-2 de maior preocupação, por apresentar um maior quantitativo de mutações, ocasionando maior capacidade infectiva e escape do sistema imunológico, (WHO et al., 2022).



**Figura 5:** mapa epidemiológico da COVID-19 no Brasil

**Fonte:** WHO et al., 2023.

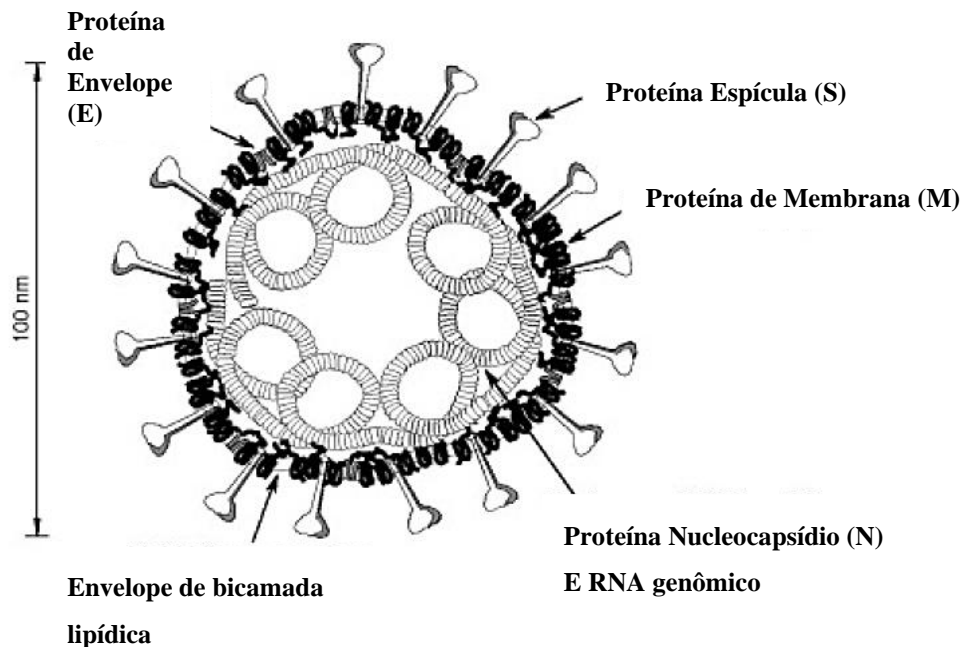
### 2.2.2 Estrutura do SARS-CoV-2

O vírus SARS-CoV-2 é um vírus envelopado de RNA e seu material genético é composto por apenas uma fita de RNA de polaridade positiva (RNA+) e é assim classificado devido à direção 5' 3', isso permite que o material genético viral seja lido diretamente pelos complexos ribossômicos de eucariotos, (SHEREEN et al., 2020). O gene do SARS-CoV-2, codifica cerca de 29 proteínas virais distintas, sendo quatro dessas, proteínas estruturais, que estão relacionadas a estrutura do vírus e regulação da sua função, sendo as proteínas de Membrana (M), envelope (E), proteína de espícula ou spike (S) e a nucleoproteína (N),

(HELMY et al., 2020; LI et al., 2020).

As duas últimas, desempenham um papel importante para o vírus, a proteína S é responsável pela entrada do vírus na célula por meio da ligação à enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), sendo importante no processo de infecção e a proteína de nucleocapsídeo participa do processo de regulação, replicação e estruturação viral, (BORGES, 2020).

O genoma dos CoVs, estão relacionados a várias cópias de nucleoproteína que originam um nucleocapsídeo helicoidal, e esse nucleocapsídeo é revestido pelo envelope viral, que por sua vez é constituído de uma bicamada lipídica, que ancoram as proteínas de superfície M, E S, (PEREIRA DA CRUZ; TOMÉ, 2021).



**Figura 6:** Esquema ilustrativo da estrutura de um coronavírus demonstrando as proteínas estruturais e genoma.

**Fonte:** Adaptado de Masters et al., 2006.

O gene que codifica a RNA polimerase do SARS-CoV-2 possui similaridade de 98,7% com RNA polimerase de morcego *Rhinolophus* sp. O seu genoma viral, apresenta no mínimo 10 ORFs, códons sequenciais, sem códons de parada que codificam polipeptídeos, estando boa parte do genoma do vírus concentrado nas duas primeiras Open Reading Frames (ORFs), (AZEVEDO, 2020).

O vírus SARS-CoV-2 apresenta na extremidade 5' e 3' de seu RNA genômico

regiões não traduzidas (UTRs). As ORFs 1a e 1b que tomam dois terços do genoma viral, estão localizadas após a UTR da extremidade 5' e são traduzidas em duas poliproteínas denominadas pp1a e pp1ab que dão origem a 16 proteínas não estruturais que participam do processo de transcrição e replicação viral, (LI et al., 2020). Na extremidade 3' se encontra o genoma que codifica as proteínas estruturais e algumas proteínas acessórias que ainda não possuem função específica, mas são importantes para os processos de recombinação do vírus,, (HELMY et al., 2020).

No SARS-CoV-2, as proteínas estruturais desempenham papéis distintos, a proteína E, por exemplo, participa do processo de produção de novos vírus e brotamento, possui menor tamanho e se encontra em menor quantidade na partícula viral que as demais proteínas, mesmo estando presente em quantidades elevadas na célula durante o processo de replicação, (BORGES, 2020).

A proteína M, além de participar da montagem de novas partículas, define o local de brotamento e formato do envelope (na qual essa proteína se encontra de forma abundante), bem como auxilia na ancoragem do nucleocapsídeo por meio da interação com a proteína N, (PIMENTEL et al., 2020).

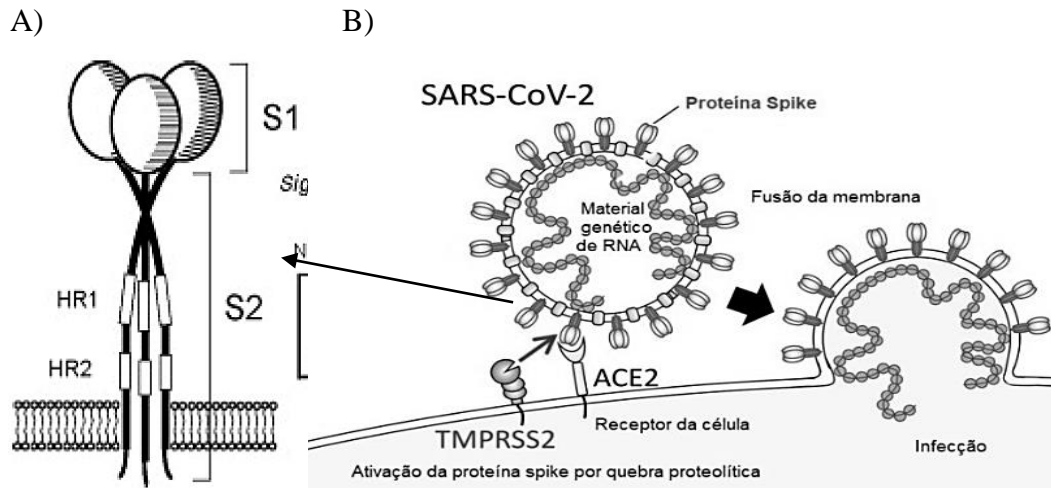
A proteína N ao ancorar o RNA genômico, gera o nucleocapsídeo, sua função principal está na participação da tradução e síntese do RNA, além de reprimir RNA de interferência, facilitando o processo de replicação viral, (LI et al., 2020).

Já a proteína S é uma das chaves que possibilita a entrada do vírus na célula. Esse processo de ligação ocorre em duas etapas, a primeira se dá através da interação da proteína S com o receptor celular humano ACE 2 e a segunda etapa se dá através da serina protease (TMPRSS2) que cliva e ativa essa proteína atuando como priming da mesma, que consequentemente permite a ligação específica da proteína S ao ACE2, facilitando a adesão viral à membrana plasmática e entrada do vírus na célula, (GRÄF, 2020; PALÚ, 2021).

No SARS-CoV-2 a proteína espícula (S), mantém preservado alguns domínios e resíduos de aminoácidos com o SARS-CoV, no entanto, mutações em algumas regiões concederam uma afinidade ao ECA 2 humano bem mais elevada em relação ao SARS-CoV, (GRÄF, 2020).

Como demonstrado abaixo na figura 7, a proteína espícula possui duas subunidades denominadas S1 e S2. A primeira integra os domínios de ligação ao receptor (RBD), que é altamente imunogênico e responsável por mediar a interação da proteína viral com receptor celular humano (ACE2), definir tropismo, bem como o potencial de disseminação viral, (HOFFMANN et al., 2020). Este domínio pode ser alvo de atuação de anticorpos que ao se

ligarem a essa região, neutralizam a interação da proteína S com o receptor ACE2. A subunidade S2 possui peptídeo de fusão, domínio transmembrana e domínio citoplasmático, (LI et al., 2020).



**Figura 7:** A) Esquema representativo da proteína S e subunidades S1 e S2; B) Interação da proteína S com ACE2 humano, ativação pelo TMPRSS2 e entrada do vírus na célula.

**Fonte:** Adaptado de The University of Tokyo., Masters et al., 2006

### 2.2.3 Patogênese da COVID-19, mecanismo de entrada e replicação do SARS-CoV-2 na célula humana

O SARS-CoV-2 entra no organismo pelas vias aéreas por meio dos cílios apicais, se ligando a proteína transmembrana ACE2. O gene que codifica a Enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), é expresso em células epiteliais de diversos órgãos como, intestinos, vasos sanguíneos, células epiteliais renais, mas principalmente e de maneira mais abundante nas células epiteliais pulmonares, (SOUTH et al., 2020).

Nas células epiteliais pulmonares é onde comumente ocorre o reconhecimento e ligação da proteína S ao receptor celular ACE2. Após a entrada do vírus na célula, este passa a se replicar nas células epiteliais alveolares, danificando-as, além disso, a resposta imunológica frente à infecção pelo SARS-CoV-2, pode favorecer significativamente a patogênese da COVID-19, (DA SILVA et al., 2021).

A entrada dos CoVs de modo geral, se inicia com a adsorção, ou seja, com a interação da região RBD da subunidade S1 da proteína S com receptor de membrana celular, (R. FEHR ANTHONY, 2015). No SARS-CoV-2, há uma segunda interação da proteína S, que sofre a

ação das proteases celulares em sítios de clivagem entre as subunidades S1 e S2, que é necessário para a entrada do vírus na célula, pois durante a proteólise, os peptídeos de fusão são exibidos, mediando a fusão do envelope com a membrana celular do hospedeiro, (ROUJIAN LU, XIANG ZHAO, 2020).

No SARS-CoV-2, a clivagem pode ocorrer por Serina Protease Transmembranar 2 (TMPRSS2) que permite a entrada do vírus por fusão, por catepsinas lisossomais, que permite uma entrada alternativa do vírus por endocitose, e por furinas, (HOFFMANN et al., 2020; SHANG, 2020).

A ação de entrada do vírus na célula é seguida do desnudamento do RNA genômico, que consiste na liberação do RNA viral no citoplasma celular, e por ser composto de RNA de fita simples de polaridade positiva seu genoma pode ser transcrito pelas estruturas celulares de imediato, começando pelas ORF1a e ORF1b dando origem as poliproteínas pp1a e pp1b, que em seguida são clivadas em proteínas não estruturais, das quais se enquadram enzimas do complexo replicase-transcriptase e proteases, (NIEMI et al., 2021; R. FEHR ANTHONY, 2015; SHANG, 2020).

A formação do complexo replicase-transcriptase é importante por garantir um ambiente colaborativo para que a síntese do RNA viral ocorra, gerando o RNA genômico que é usado para montar novas partículas e RNA subgenômico, que age como RNA mensageiro (mRNA), isto é, servindo de molde para tradução tanto das proteínas estruturais como das proteínas acessórias. As enzimas que participam desse complexo são: RNA polimerase, RNA dependente, o domínio da RNA helicase e a exoribonuclease, (R. FEHR ANTHONY, 2015).

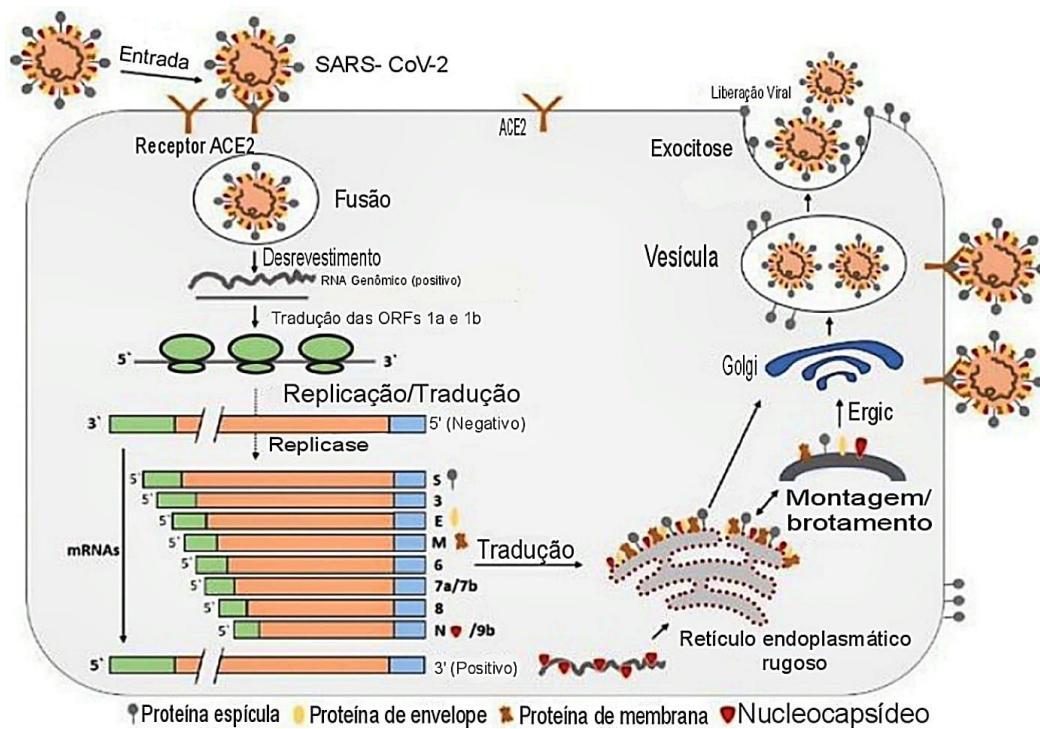
A tradução do RNA subgenômico nas proteínas estruturais E, M e S, ocorre no retículo endoplasmático rugoso, após é direcionado para o complexo de Golgi onde ocorre a finalização das novas partículas, seguindo para ser secretado, (HOFFMANN et al., 2020). No decorrer desse processo, é possível que as regiões das subunidades S1 e S2 da proteína S sejam pré ativadas por furinas no meio trans-Golgi (compartimento intermediário do retículo endoplasmático Golgi), pois estas proteases apresentam afinidade pelos sítios polibásicos das subunidades S1 e S2. A afinidade por regiões polibásicas das subunidades da proteína S pelas proteases furinas ocorre apenas no vírus SARS-CoV-2 e é devido mutações que conferiram a adição de quatro aminoácidos na proteína S, (LI et al., 2020; NIEMI et al., 2021).

As novas partículas virais que apresentam uma pré-ativação da proteína S são mais eficientes em mediar a fusão célula a célula, contribuindo assim, para a transmissão do vírus, uma vez que este processo permite a evasão da resposta imune, o que pode ser considerado como um fator de contribuição para a patogenicidade do SARS-CoV-2, (CARRIJO-



CARVALHO, 2020).

As partículas virais maduras são montadas por meio da combinação da proteína N com o RNA e durante esse processo as proteínas de envelope (E) e membrana (M) participam da montagem, brotamento e composição do envelope de novos vírus, que em seguida são conduzidos para a superfície da célula e liberados por exocitose, (SHEREEN et al., 2020).



**Figura 8:** Representação esquemática ciclo de vida e replicação do SARS-CoV-2

**Fonte:** Hereen et al., 2020

#### 2.2.4 COVID-19 e comorbidades

A infecção por SARS-CoV-2 pode se manifestar de variadas formas, podendo incluir desde uma infecção assintomática, que ocorre aproximadamente em 80% dos indivíduos infectados, a um quadro leve e moderado, que abrange cerca de 20% dos pacientes e o quadro grave da doença, em que 5% aproximadamente dos pacientes acometidos necessitam de atendimento especializado devido à insuficiência respiratória e outras complicações, (BRODIN, 2021; CARRIJO-CARVALHO, 2020).

Grande parte dos indivíduos que evoluem para quadros graves possuem comorbidades como Diabetes, Cardiopatias, DPOC, Hipertensão arterial, Imunossupressão entre outros que contribuem para complicações relacionadas à patogênese, (WHO, 2020).

Indivíduos diabéticos, por exemplo, apresentam elevado índice de inflamação, esta condição pode contribuir para o agravamento da doença, pois a infecção causada pelo vírus pode induzir a respostas imunológicas exacerbadas, podendo levar à chamada tempestade de citocinas, que culminam em intenso dano tecidual e conseqüentemente à Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo, entre outros agravos. Além das doenças de base, a idade avançada também é um fator de risco para o desenvolvimento de casos graves devido à imunossenescência, (MANIK; SINGH, 2022; SHEREEN et al., 2020).

#### 2.2.5 Modo de transmissão do SARS-COV-2

Os primeiros relatos de infecção pelo SARS-COV-2 ocorreram na província de Hubei em Wuhan, na China, em um mercado de animais silvestres. Análises apontam que a interação direta de humanos com animais possíveis hospedeiros intermediários do vírus ou o consumo de animais silvestres teria sido a primeira via de transmissão do novo coronavírus, (GONDIM et al., 2020; ZHANG et al., 2020), contudo, as trajetórias de transmissão percorridas pelo vírus durante o pulo entre espécies que vai de hospedeiro natural, à hospedeiro intermediário e por fim infecção em seres humanos ainda permanecem não completamente elucidados, (GRÄF, 2020).

A transmissão pelo SARS-COV-2 acontece através das vias aéreas, ocorrendo de uma pessoa infectada para outras estando esta sintomática ou não, por meio do contato com gotículas contendo partículas virais expelidas pelo indivíduo no ambiente ao tossir, falar ou espirrar, bem como por meio de contato com objetos ou superfícies contaminadas, (PEREIRA DA CRUZ; TOMÉ, 2021). As partículas virais do SARS-COV-2 conseguem sobreviver por um período que varia de acordo com o objeto ou superfície em que foram depositados, o que contribui para o contágio que ocorre nesse caso, por meio do contato ou manuseio dessas superfícies e objetos contaminados e interação com mucosas como a boca ou os olhos, (KIMBALL et al., 2020). Já no caso de partículas suspensas o contágio se dá por meio da inalação dessas partículas virais. Essa característica facilitou a disseminação rápida do SARS-COV-2 para diversos países, (DOREMALEN, 2020).



**Figura 9:** Esquema de meio de transmissão do SARS-COV-2

**Fonte:** Fiocruz et al., 2020

### 2.2.6 Manifestações clínicas do SARS-CoV-2

Segundo a Organização Mundial de Saúde, os indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 apresentam sintomas clássicos como febre, tosse seca, e fadiga, podendo também, no entanto apresentar outros sintomas que variam de obstrução nasal, dificuldade de deglutição, dor de garganta, coriza, batimento de asa de nariz, produção de escarro, dispnéia, perda de olfato e paladar, entre outros, que geralmente se apresentam em torno do 2º ao 14º dia de infecção. Em alguns casos, sintomas inespecíficos também podem estar presentes e isso inclui mialgia, cefaléia, diarreia, vômito, náusea, linfonodomegalia entre outros, (OPAS et al., 2021). A febre é o sintoma mais presente na infecção por COVID-19, sendo relatado por 92,8% dos indivíduos, o segundo sintoma mais presente é a tosse seca com 69,8% dos relatos, seguido de dispnéia 34,5%, mialgia 27,7% e diarreia 6,1%, (WHO et al., 2021).

COMUNS	INCOMUNS
Tosse	Diarreia
Febre	Dor de garganta
Coriza	Dor de Cabeça
Fadiga	Dificuldade de Respirar

### **Quadro 1:** Sinais e sintomas clássicos da COVID-19

**Fonte:** OMS., et al 2021.

Os pacientes que evoluem para casos graves apresentam inicialmente dispnéia e são geralmente indivíduos que possuem comorbidades como hipertensão arterial, cardiopatias, diabetes, imunossupressão ou indivíduos idosos, (PALÚ, 2021).

Os sinais e sintomas clássicos da COVID-19 se mantêm mesmo com o aparecimento de novas variantes, no entanto outros sintomas bastante relatados no início da pandemia como a perda de olfato e paladar deixaram de serem descritos com o avanço das novas variantes, dando lugar a outros como demonstrado no quadro 2, (OMS et al., 2021).

<b>Alfa</b>	perda ou alteração do olfato e do paladar, febre, tosse persistente, calafrios, perda de apetite e dor muscular;
<b>Beta</b>	febre, tosse, dor de garganta, falta de ar, diarreia, vômito, dor no corpo, cansaço e fadiga;
<b>Gama</b>	febre, tosse, dor de garganta, diarreia, vômito, dor no corpo, cansaço e fadiga;
<b>Delta</b>	febre, coriza, dor de cabeça, espirros, dor de garganta e tosse persistente;
<b>Ômicron</b>	cansaço extremo, dor no corpo, dor de cabeça, coriza, congestão nasal e dor de garganta.

**Quadro 2:** Sinais e sintoma de cada variante do SARS CoV 2: Beta, Gama, Delta e Ômicron.

**Fonte:** Zolin et al., 2022

### 2.2.7 Diagnóstico Laboratorial

Existem três principais métodos diagnósticos para a detecção de infecção pelo SARS CoV-2, um baseado em técnica de biotecnologia e detecção de RNA viral (RT-PCR), o teste sorológico para a detecção de anticorpos anti proteína S e N do SARS-CoV-2, geralmente utilizado para verificar imunidade após infecção, e os testes rápidos para detecção de antígeno viral e anticorpo contra o vírus. A transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) é o método padrão ouro para diagnóstico laboratorial de infecção pelo vírus SARS- CoV-2, (HELMY et al., 2020).

#### 2.2.7.1 RT-PCR para detecção do SARS-CoV-2

A técnica biotecnológica utilizada para detectar o genoma viral do SARS-CoV-2 é chamada de RT-PCR. A coleta do material biológico é realizada com o auxílio de um swab que é introduzido na cavidade orofaríngea e garganta a fim de coletar secreções que contenham o material genético do vírus. O material coletado é submerso em tubos estéreis

contendo meio de transporte líquido, armazenado a 2-8 graus e levado para análise, (AZEVEDO, 2020).

De modo geral, o processamento do material coletado segue as seguintes etapas: Inativação, extração do RNA, transcrição reversa e amplificação. Nessa primeira etapa é adicionado à amostra biológica o reagente Trizol, que leva à lise das células presentes no meio, sendo os restos celulares (precipitado) separado do material genético (sobrenadante) por meio de centrifugação. O seguimento da etapa de extração se dá por precipitação e purificação do material genético com etanol a 100%, onde são realizadas três centrifugações para obter o RNA precipitado no fundo do tubo, sendo esse precipitado eluído posteriormente em água estéril, (VIEIRA; EMERY; ANDRIOLO, 2021).

O material genético extraído é submetido ao processo de transcrição reversa do RNA viral, onde este é convertido em cDNA (DNA complementar) para processamento da reação da cadeia da polimerase, é neste último, que ocorre a amplificação dos fragmentos de interesse. Para isso, o cDNA é colocada em microtubos contendo um mix de componentes necessários para a amplificação dos genes, como primers, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, taq DNA polimerase, bem como as sondas específicas para os genes do SARS- CoV-2. Após esse processo o material é colocado em um termociclador que irá realizar cópias do genoma viral. A positividade do teste é detectado por meio da luminescência emitida pela sondas e tamanho do fragmento, essa luminescência é proporcional a amplificação do material genético do vírus, (AZEVEDO, 2020; CLÍNICAS, 2021).

#### 2.2.7.2 Teste sorológico para detecção do SARS-CoV-2

Quanto ao teste sorológico para a identificação de infecção prévia ou imunidade ao novo coronavírus, são voltados para a detecção de anticorpos contra as proteínas S e NP, (JUNQUEIRA et al., 2021). A presença de anticorpos acusa o contato prévio com o vírus, pois eles são produzidos em resposta à infecção, sendo encontrado no sangue, amostra biológica utilizada para a realização do exame. Os anticorpos de interesse nesse teste são IgM, IgG e IgA, (PEREIRA DA CRUZ; TOMÉ, 2021).

Para a realização deste teste é necessário que o indivíduo esteja com no mínimo de oito a dez dias desde o início dos sintomas, critério que ajuda a aumentar a sensibilidade do teste, uma vez que a produção dos anticorpos inicia a partir do sétimo dia de exposição, por isso realizar o teste para detecção de anticorpos antes disso, pode gerar um exame com

falso negativo, (WHO et al., 2022).

Os testes rápidos também são utilizados para detecção de infecção pelo vírus SARS-CoV-2 e atuam de duas formas, na detecção de anticorpos que indicam resposta imune adaptativa tardia contra o vírus (IgG) e na detecção imunoglobulinas de fase aguda (IgM) que acusam uma infecção, recente ou em andamento. Contudo, esse tipo de teste possui baixa confiabilidade devido à reduzida sensibilidade e especificidade apresentada por ele quando comparado a outros métodos diagnósticos, (WHO et al., 2022).

#### 2.2.8 Tratamentos disponíveis para infecção pelo SARS-CoV-2

Por se tratar de uma doença nova, a inexistência de tratamentos específicos para a COVID-19 e ausência de vacinas foi um dos principais obstáculos enfrentados no primeiro ano de pandemia, (MANIK; SINGH, 2022).

Atualmente já existem alguns tratamentos disponíveis, no entanto a maioria são exclusivas para uso em pacientes graves, principalmente para inibir uma resposta imune exacerbada desencadeada pela infecção, (OPAS et al., 2021), dentre estes, se encontram os antivirais e antiinflamatórios que apresentam eficácia comprovada em estudos clínicos para inibir a replicação viral e tratar as complicações desencadeada pela doença. Além destes, temos uma variedade de vacinas disponíveis para grande parte da população, (WHO et al., 2022).

As vacinas são de extrema importância no combate ao SARS-CoV-2, mas ainda é indispensável a busca por medicamentos que consigam tratar a doença, sobretudo os seus agravos, principalmente, devido à presença cada vez mais constante de variantes do vírus de importância médica, (NIEMI et al., 2021).

Como já mencionado anteriormente, existem alguns medicamentos aprovados que auxiliam no combate tanto da infecção viral quanto das reações que ele provoca no organismo. Os antiinflamatórios por exemplo são utilizados para regular a inflamação exagerada desencadeada pela resposta imunológica do indivíduo frente a infecção que em casos graves é potencialmente letal, (JUNQUEIRA et al., 2021; ZHENG et al., 2021).

Durante o processo infeccioso, mediadores químicos são liberados no organismo para sinalizar a invasão, a inflamação ocorre com o intuito de estimular o sistema imunológico, recrutando as células de defesa para o local da infecção, no entanto em alguns casos, o sistema imune não consegue controlar ou finalizar o processo infeccioso de forma rápida, devido a múltiplos fatores que variam de comorbidades a imunossupressão, fazendo com que

o processo inflamatório dure por mais tempo e por vezes de maneira desregulada o que pode lesionar tecidos e órgãos vitais e levar o indivíduo a óbito, (MANIK; SINGH, 2022; SILVA et al., 2020).

É exatamente no controle da inflamação excessiva que atuam os antiinflamatórios nos casos graves de COVID-19. Das drogas antiinflamatórias- esteróides e não esteroidais aprovadas e utilizadas no tratamento da COVID-19 se encontram a Dexametasona, Hidrocortisona, Baricitinibe e o anticorpo monoclonal Tocilizumabe, (WHO et al., 2022).

DROGA ANTIINFLAMAÓRIAS	DROGAS ANTIVIRAIS
<b>Dexametasona</b>	Paxlovid
<b>Hidrocortisona</b>	Molnupiravir
<b>Tocilizumabe</b>	Remdesivir
<b>Baricitinibe</b>	

**Quadro 3:** Drogas antiinflamatórias e antivirais usadas para o tratamento de COVID-19

**Fonte:** OMS., 2022

As drogas antivirais também são medicamentos essenciais no combate à infecção, pois interferem na replicação do vírus dentro das células mantendo a carga viral baixa e facilitando a ação do sistema imune, dentre as drogas antivirais aprovadas para esta finalidade se encontram o Paxlovid, Molnupiravir e Remdesivir, (WHO et al., 2022).

### 2.2.9 Variantes do SARS-CoV-2 e os seus impactos

A circulação do vírus durante os três anos de pandemia fez com que o SARS-CoV-2 acumulasse algumas mutações no seu genoma, dando origem a novas variantes que acenderam um alerta e geraram preocupação na comunidade médica e científica, (KUPFERSCHMIDT; WADMAN, 2021).

As primeiras variantes surgiram entre dezembro de 2020 à janeiro de 2021, sendo a primeira a B.1.1.7 identificada no Reino Unido, a segunda foi a variante B.1.351 da África do Sul e a terceira a P.1 no Brasil, mais precisamente em Manaus, responsável pelo colapso do sistema de saúde público da cidade e também pela segunda onda de covid 19 no país, (CLÍNICAS, 2021). Depois destas, outras surgiram e se espalharam de forma rápida, sendo as principais responsáveis pelo aumento do número de casos mesmo após a vacinação avançada em muitos países. Compreendem como variantes de importância a Alfa, Beta,

Gama, Delta e Ômicron, (CALLAWAY, 2021; NIEMI et al., 2021).

O aparecimento dessas novas variantes gerou preocupação, principalmente em relação a capacidade de evasão da imunidade adquirida por vacinação ou infecção natural, podendo nesse caso, levar ao crescimento exponencial de números de casos e mortes em todo mundo, sendo assim, o escape do sistema imunológico foi o principal fator de preocupação com o surgimento das novas variantes, (CALLAWAY, 2021; SABINO et al., 2021).

Por esse motivo o sequenciamento genômico para rastrear e identificar as novas cepas em circulação são importantes, pois permitem compreender o processo de evolução do vírus, identificando onde ocorre as novas mutações, sua disseminação no globo e as implicações que podem ser resultantes delas, auxiliando assim, na tomada de decisões sobre as políticas públicas em saúde. Estar com o esquema de vacinação completo é de fundamental importância para evitar o surgimento de novas variações do SARS-CoV-2, (CALLAWAY, 2021; WHO et al., 2021).

### **2.3 Mecanismos de reconhecimento e resposta imune contra o SARS-CoV-2**

A resposta do organismo frente a infecção pelo SARS-CoV-2 ainda não está completamente caracterizada, mas diversos trabalhos constataam a significativa atuação da resposta imune inata durante o processo infeccioso e evidências corroboram para o levantamento da hipótese de que seria exatamente o perfil de atuação e intensidade dessa primeira resposta um dos principais determinantes de desfecho favorável ou evolução da doença, (MATRICARDI; DAL NEGRO; NISINI, 2020).

O SARS-CoV-2 possui antígenos capazes de ativar o sistema imunológico, dentre estes se encontram alguns principais como a proteína S e seus domínios de ligação ao receptor celular (RBD), subunidades S1 e S2, bem como a NP, (BORDALLO et al., 2020; SILVA et al., 2020).

Além dessas, algumas estruturas virais também atuam como um sensibilizador do SI (sistema imunológico), como por exemplo, a proteína E que age como um canal iônico servindo de fator de ativação do complexo inflamassoma responsável pela liberação das formas ativas da citocina *IL1B* e *IL18*, (JUNQUEIRA et al., 2021; ZHENG et al., 2021).

#### **2.3.1 Reconhecimento e resposta imune inata ao SARS-Cov-2**

A imunidade inata induz a primeira ação de defesa contra o vírus por meio do reconhecimento das partículas virais. Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) são



proteínas e fatores solúveis que conseguem reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), mas também padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e incluem os receptores transmembranar Toll-like (TLRs), receptores de lectina tipo C (CLRs), helicase tipo gene estimulado por ácido retinóico I (RIG-I), receptores citosólicos NOD (NLRs) entre outros, que estão mais expressamente presentes em células fagocíticas como macrófagos e células dendríticas, (JUNQUEIRA et al., 2021; MANIK; SINGH, 2022).

Ao detectar PAMPs e DAMPs, por meio dos receptores de reconhecimento de padrões, uma resposta imunológica inicial é ativada de imediato, levando a uma série de sinalizações celulares com liberação de citocinas e quimiocinas, (AZEVEDO, 2020). As células que foram invadidas, também produzem citocinas que atuam estimulando a transcrição e secreção de fatores que orquestram a resposta antiviral, como o interferons tipo I (alfa e beta) e interferon tipo III, (BORDALLO et al., 2020).

Os Interferons (IFNs) promovem estados anti patogênicos tanto nas células acometidas, quanto nas células vizinhas, inibindo a replicação viral e induzindo a produção de citocinas pró inflamatórias por meio da ativação de fatores de transcrição, como o fator regulador de interferon IRF 3 e 7, fator nuclear NF-kB, (CARRIJO-CARVALHO, 2020). As citocinas pró inflamatórias vão atuar no recrutamento das células imunes inatas e adaptativas para o local da infecção, potencializando a resposta dessas células, (PEREIRA DA CRUZ; TOMÉ, 2021). A imunidade inata desempenha um controle da infecção viral por meio dos interferons tipo I e III, células NK e macrófagos, (ABBAS, 2016).

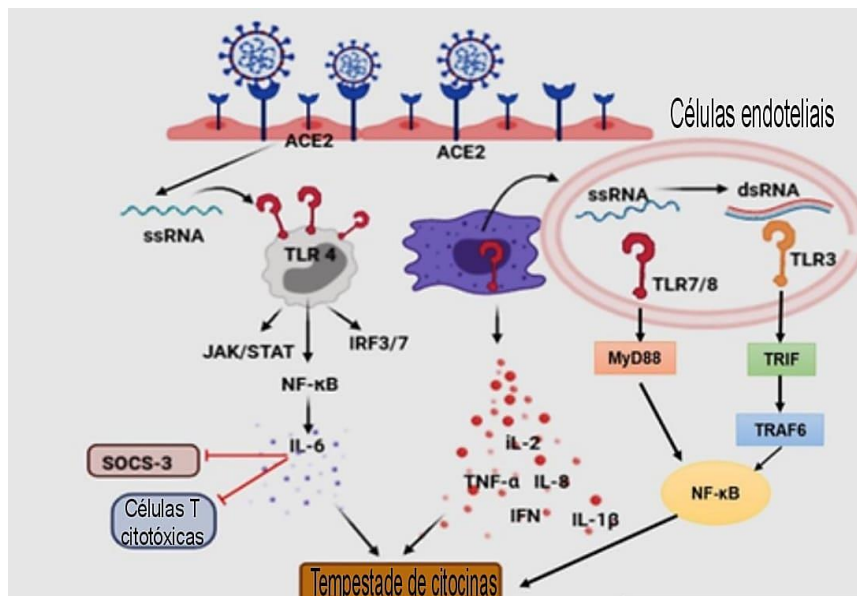
O principal meio de entrada do SARS-CoV-2 no organismo se dá pelas vias aéreas superior e inferior, sendo assim as células do trato respiratório são as primeiras a sofrerem a invasão viral e como já explicado anteriormente, o vírus usa o receptor celular humano ACE2 para entrada na célula, (HOFFMANN et al., 2020).

O SARS-CoV-2 e os coronavírus em geral são reconhecidos pelo sistema imune inato por meio dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que se encontram tanto na membrana plasmática quanto no citosol da célula, (GRÄF, 2020). Dentre os PRRs mais caracterizados no reconhecimento do SARS-CoV-2 e outros coronavírus, estão os receptores tipo Toll (TLRs), RIG-I e NLRs, que identificam diversos componentes e estruturas do vírus levando a ativação e sinalização celular, (PALÚ, 2021).

Os receptores Toll-like exercem uma atuação importante no reconhecimento de padrões moleculares de coronavírus, essas proteínas transmembranares estão presentes na membrana plasmática e membranas endossomais, (ZHENG et al., 2021). Entre os receptores do tipo Toll like (TLRs) que foram associados a resposta contra o SARS-CoV-2 até o

momento, estão o TLR3, 4, 7 e 8, (MANIK; SINGH, 2022).

O genoma e proteínas do SARS-CoV-2 podem ser reconhecidos por meio do TLR3, TLR4, TLR7 ou TLR8. Ao interagir com PAMPs e DAMPs esses receptores desencadeiam sinalizações intracelulares que culminam com a estimulação do fator nuclear NF- $\kappa$ B e fatores reguladores de interferons que levam a síntese de IFN I e III que são os principais mediadores de respostas antivirais, (FRICKE-GALINDO; FALFÁN-VALENCIA, 2021).



**Figura 10:** Reconhecimento do SARS-CoV-2 por TLR 4, receptor de superfície ativando sinalização via JAK/STAT, IRF3/7 e NF- $\kappa$ B para indução do processo inflamatório. Os TLRs 3,7 e 8 receptores endossomais, induzem a sinalização via moléculas adaptadoras como MyD88, TRIF e TRAF 6.

**Fonte:** Adaptado de Moumita Manik et al., 2021.

Apesar de ser conhecido por detectar principalmente LPS bacteriano, alguns estudos indicam a ativação do TLR4 ocorrendo por interação direta com a proteína S ou detecção de fosfolípido oxidado, tendo sido associado a imunopatogênese desencadeada pelo SARS-CoV-2, por induzir a uma resposta inflamatória exacerbada, (ZHANG; ZHAO; ZHAO, 2021). Ao ser ativado esse receptor de reconhecimento aciona fatores de transcrição IRFs, NF- $\kappa$ B e AP-1 responsáveis por regular a secreção de citocinas pró inflamatórias como a IL-6 e IFN I, (ÖZTÜRK; TAŞOVA; AYAZ, 2020). Os receptores do tipo toll sinalizam por vias dependentes e independentes de moléculas adaptadores como MyD88 e TRIF, (MANIK; SINGH, 2022).

O reconhecimento por TLR7/8 aciona via MAPK-NF- $\kappa$ B dependente da molécula

adaptadora MyD88, enquanto o TLR3 sinaliza por TRIF e TRAF6 que culmina na produção de algumas interleucinas como a *IL-6*, *IL-8*, *IL-1-IL-12*, *TNF alfa*. A *IL-6* é uma das principais citocinas elevadas em pacientes com COVID-19 grave, (ZHENG et al., 2021).

Em alguns casos a resposta inicial desencadeada pelo vírus é bastante expressiva e mal direcionada, devido a intensa ativação de células fagocíticas como macrófagos e neutrófilos, resultando em dano pulmonar e liberação exacerbada de citocinas pró inflamatórias que ao chegar na circulação sistêmica afeta diversos órgãos levando a imunopatologia, (CARRIJO-CARVALHO, 2020; SOUSA CARVALHO; DÂMARIS, 2020).

A compreensão dos fatores e mecanismos envolvidos na progressão e gravidade da doença está em discussão, mas as evidências da associação entre a gravidade da doença e a resposta imune desregulada estão bem consolidadas, (SILVA et al., 2021). Estudos indicam que indivíduos que evoluem para casos graves apresentam uma resposta imune ao SARS-CoV-2 exacerbada com intensa liberação de citocinas pró-inflamatórias que seriam a principal razão do dano pulmonar apresentado nesses indivíduos, (BORDALLO et al., 2020; MANIK; SINGH, 2022).

A evolução para as demais fases da COVID-19 está diretamente associada principalmente a proporção da resposta imune inicial, quando essa resposta é bem conduzida os indivíduos permanecem na fase I até o controle e resolução do processo infeccioso, (BOST et al., 2021), onde se tem uma coordenada produção e secreção de citocinas pró inflamatórias como *IFN gama* e *TNF- alfa* e citocinas antiinflamatórias como *IL-10*, que unido a atividade da respostas adaptativas conseguem atuar de forma eficaz no combate a infecção, (SOUSA CARVALHO; DÂMARIS, 2020). No entanto, quando essa resposta inicial é desregulada, há uma progressão para as fases II e III, caracterizado principalmente pelo aumento das citocinas *IL-6*, *IL-8*, *IL1B*, *TNF alfa*, *G-CSF*, *IP10*, *MCP1*, *MIP1A*, (SOARES BRANDÃO; GODOI, 2020). Indivíduos do sexo masculino apresentam maiores propensões a evolução para casos graves da doença em relação ao sexo feminino, indicando que os fatores genéticos, hormonais e ambientais podem estar associados a diferenças de respostas ao SARS-CoV-2 nesses indivíduos, (BRODIN, 2021)

Os macrófagos e neutrófilos desempenham um papel importante no combate a infecção, no entanto os indivíduos que evoluem para os casos graves da COVID-19 têm lesão pulmonar agravada em decorrência da hiperativação e ação exacerbada dessas células contribuindo assim, para a síndrome da angústia respiratória, (JUNQUEIRA et al., 2021). Os neutrófilos, por exemplo, induzem a quebra de colágeno do tecido pulmonar por meio da produção da proteína MMP9, que é aumentada pela secreção de TNF por outras células,

(SILVA et al., 2021). O aumento dessa proteína e outras citocinas elevam o recrutamento dessas células para o local da infecção para atuar na fagocitose, degranulação de elastase, mieloperoxidase e espécies reativas de oxigênio, bem como a produção de armadilhas de neutrófilos extracelulares (NETs) que auxiliam no combate a infecção, (BORDALLO et al., 2020), mas quando a ação dessas células é desregulada ou prolongada geram lesão pulmonar contribuindo para o agravamento da doença.

Os efetores antivirais mais relevantes da imunidade inata são os Interferon. Os IFNs são proteínas que são classificadas conforme o tipo de célula que o produz, sendo IFN beta (fibroblastos), IFN alfa (leucócitos) e IFN gama (linfócitos). Alguns estudos in vivo e in vitro, demonstraram que o SARS-CoV-2 é bastante vulnerável a essa substância, que atua como um eficiente inibidor da replicação viral, (MANIK; SINGH, 2022; SOUSA CARVALHO; DÂMARIS, 2020).

Os interferons tipo I, alfa e beta, podem atuar de duas maneiras, sendo a primeira por meio de uma ribonuclease que degrada o mRNA do vírus ou através de uma proteína cinase que inibe a síntese de proteínas, ambos levam à morte do vírus e da célula infectada, (SEKINE et al., 2020; SILVA et al., 2020).

O SARS-CoV-2 utiliza algumas estratégias de escape dos mecanismos de reconhecimento e efetores da imunidade inata, um dos principais são a inibição da sinalização de interferon por proteínas não estruturais do vírus (NSP), principalmente Nsp5 e Nsp16 e a estrutural NP viral, (BORDALLO et al., 2020), que atuam inibindo vias de sinalização que interferem na transcrição, tradução e transporte de proteínas do indivíduo, resultando na redução da produção de IFNs e conseqüentemente atraso na resposta referente a produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação de respostas inatas e adaptativas eficientes, (PADOAN et al., 2020; SHANG, 2020).

### 2.3.2 Inflamassoma

Outro mecanismo inato responsável pelo reconhecimento e ativação do sistema imune frente a infecção pelo SARS-CoV-2 é o inflamassoma, que são complexos multiproteicos que se ativam em resposta a infecções ou dano celular, recrutando assim, as moléculas efetoras pró caspase 1 que pode ser ativada diretamente ou por meio de ASC, uma proteína de adaptação relacionada a apoptose celular, (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002; SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

Esses sensores intracelulares apresentam três domínios principais composto por um

domínio N-terminal de ligação proteína a proteína, como o domínio pirina (PYD) ou recrutamento de caspase (CARD), um domínio de ligação e oligomerização (NOD ou NAHCT) e uma região C-terminal composto por repetições ricas em leucinas (LRRs), (ANDRADE, 2019).

Existe uma variedade de NLRs que são relacionados à ativação do complexo inflamassoma, no entanto os mais descritos na literatura são os inflamassomas de *NLRP3*, *NLRP1* e *NLRC4*, (ALVES, 2020).

O *NLRP1* apresenta uma região N-terminal pirina (PYD) que interage com a proteína ASC (interação proteína -proteína) e esta por sua vez faz ligação com as caspases inflamatórias 1 e 5, e caspases apoptóticas 2,3 e 9. O *NLRP1* é formado na presença de MDP e toxina letal de *Bacillus Anthrax*, (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002).

O receptor *NLRC4* é um adaptador, similar a ASC e é por intermédio dele que a informação dos demais inflamassomas são transmitidos, resultando em ativação da caspase - 1. Ele identifica de forma indireta algumas proteínas específicas de patógenos como fungos e bactérias, (SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

Já o inflamassoma de *NLRP3*, pode ser acionado por estímulos exógenos e endógenos como ATP, alumínio, cristais de colesterol entre outros, e realiza a clivagem de pró-caspase 1 por meio da ASC, (RAJAMÄKI et al., 2013).

Esses receptores NLRs capazes de montar o complexo inflamassoma são essenciais para o reconhecimento de PAMPs e DAMPs no interior da célula, bem como na indução de uma resposta imunológica, (ABBAS, 2016).

A caspase 1 faz parte de uma família de caspases proteicas que usa resíduos de cisteína de seu sítio ativo para realizar a clivagem de outras proteínas em determinado sítio a partir de resíduos de aspartato. A ação efetora mais mencionada da caspase-1 é a clivagem das proteínas pró-*IL1B* e pró-*IL18*, sendo assim, a sinalização de NLRs pelo complexo inflamassoma resulta na secreção dessas citocinas pró inflamatórias em sua forma ativa *IL1B* e *IL18*, (ALVES, 2020). O recrutamento da molécula efetora pró-caspase-1 feito por interação ao NLR ou por meio de interação com a molécula adaptadora ASC, resulta em uma catálise de aproximação que origina uma protease ativada, (RAJAMÄKI et al., 2013).

No entanto, para que essa via de sinalização ocorra é necessário que a pró-*IL1B* e pró-*IL18* estejam presentes no citoplasma da célula. A formação delas é dependente de sinalização via NF-KB, podendo ser estimulada tanto por TLRs quanto pela citocina Fator de Necrose Tumoral (TNF), (RAJAMÄKI et al., 2013).

A citocina pró inflamatória *IL18* é considerada como uma indutora da produção de

Interferon Gama por macrófagos após estimulação por microorganismos, mas também é mencionada como a citocina que estabelece a conexão da imunidade inata com a adaptativa, (BAUERNFEIND et al., 2009).

A regulação da atuação do inflamassoma é realizada por fatores variados, podendo ser induzida pelo microambiente. A regulação positiva do complexo pode ser mediada pela proteína do choque térmico (hsp-90), bem como a proteína SGT-1 pertencente ao sistema ubiquitina-ligase, já a inibição da ativação, regulação negativa pode ser mediada pela caspase 12 e proteínas PYD, CARD8 ou Bcl-2, (ALVES, 2015).

Erros de regulação da ativação do inflamassoma favorece o desequilíbrio da homeostase, resultando no desenvolvimento de doenças inflamatórias, pois a ativação excessiva ou mal conduzida do complexo, resulta em inflamação exacerbada, principalmente devido a degranulação de células como neutrófilos e mastócitos, levando a injúria tecidual e patologia imuno mediadas, já que se estabelece nesse processo uma retroalimentação inflamatória que prejudica o controle e resolução do processo e reequilíbrio da homeostase, (ALVES, 2020; LOPES CONCEIÇÃO, 2010).

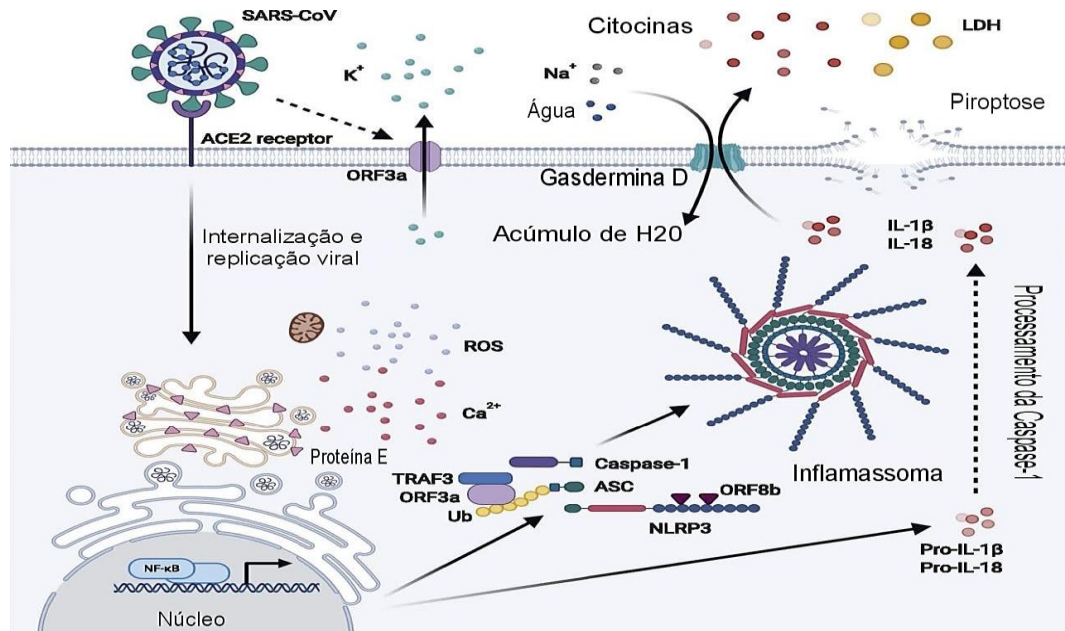
#### 2.3.2.2 Inflamassoma e SARS-CoV-2

A ativação do complexo inflamassoma pela COVID-19 se dá principalmente via *NLRP3* induzida pela proteína viral E, ORF-8b e viroporina 3a, podendo resultar em piroptose, um processo de morte celular envolvendo Gasdermina D, (JUNQUEIRA et al., 2021).

Estudos associaram a fisiopatologia da COVID-19 com a ativação exacerbada do complexo inflamassoma. Rodrigues e colaboradores descobriram a participação ativa do inflamassoma na infecção pelo SARS-CoV-2, tanto em casos leves e mais ativamente aos casos graves, em que pode ser demonstrado a ligação da ativação excessiva do complexo com uma resposta imune exacerbada denominada como tempestade de citocinas nesses pacientes, (RODRIGUES et al., 2020).

Neste estudo foi demonstrado que o inflamassoma mediado pela proteína 3 (*NLRP3*) é acionado na infecção pelo novo coronavírus e ativo em indivíduos com a doença. A ativação do inflamassoma de *NLRP3* foi verificada em pacientes que tinham quadro de leve, moderado à grave, sendo a ativação do complexo e seus produtos detectada em células do sistema imunológico, bem como em tecidos de indivíduos que vieram a óbito, (RODRIGUES et al., 2020).

De modo geral, os dados deste e outros estudos demonstram que a infecção por SARS-CoV-2 desencadeia a ativação do inflamassoma, após este infectar células do sistema imune, levando à piroptose, (VAN DEN BERG; TE VELDE, 2020).



**Figura 11:** Esquema de ativação do Inflamassoma na COVID-19

Fonte: Adaptado de Yap, Jeremy K et al., 2020

### 2.3.2.1 Atuação dos polimorfismos de Inflamassoma no desenvolvimento de doenças

Ao longo dos anos diversos estudos jogaram luz ao entendimento de como os inflamassomas podem colaborar para o desenvolvimento e manutenção de patologias auto inflamatórias, autoimunes e infecciosas. As variações genéticas encontradas em componentes do inflamassoma, bem como a desregulação de sua função vêm sendo fortemente associadas a diversas doenças, (RODRIGUE-GERVAIS; SALEH, 2010).

Polimorfismos encontrados no gene de *NLRP1* por exemplo, têm sido relacionados a patologias associadas ao cérebro, bem como a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças inflamatórias e autoimunes, indicando que polimorfismos nesses genes podem colaborar para uma propensão genética a doenças multifatoriais, (KAMADA, 2013).

Já polimorfismos no gene de *NLRP3* são comumente relatados e relacionados a várias doenças inflamatórias, como diabetes tipo I, artrite reumatóide, doença celíaca entre outros, (PONTILLO, 2014).

Além desses, os polimorfismos detectados nos genes das citocinas liberadas pelo complexo inflamassoma *IL1B* e *IL18* também tem sido associado à susceptibilidade a

doenças como LES e doença de Crohn, (SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

### 2.3.3 Resposta Imune adaptativa ao SARS-CoV-2

Após o reconhecimento do vírus pelos PRRs, as APCs (células apresentadoras de antígenos), macrófagos e células dendríticas induzem a produção e liberação de citocinas que direcionam os linfócitos TCD4 ao seu encontro para que ocorra a apresentação de antígeno via complexo de histocompatibilidade II, (ABBAS, 2016), sendo assim, as APCs são as principais responsáveis por mediar a interação da imunidade inata e adaptativa.

As células TCD4+ ao serem ativadas coordenam os mecanismos efetores das células B, com diferenciação em plasmócitos e produção de anticorpos específicos para o antígeno viral e ativação de células T citotóxicas, (SOUSA CARVALHO; DÂMARIS, 2020). Na resposta imune mediada por células, temos as células T auxiliar (CD4+) na função Th1 mediando a resposta imune adaptativa e as células T citotóxicas (CD8+), exercendo o importante papel no controle da infecção por meio da eliminação das células infectadas pelo vírus, (VABRET, 2020).

As células T CD4 exercem um papel fundamental no direcionamento do tipo de resposta imune que será produzido. Essas células podem se diferenciar em 3 subpopulações celulares, Th1, Th2, Th17, essa diferenciação é mediada pelas citocinas produzidas em resposta a infecção e presente no meio, bem como a produção de citocina pela própria célula T CD4, (WASTOWSKI; DONADI, 2014).

A linfopenia observada na COVID-19 é mais expressiva em casos graves da doença, onde se observa uma redução de células TCD4+ e CD8. Os pacientes internados em UTI apresentam maior depleção de células T CD4+, (FORTHAL, 2021), e a resposta robusta mediada por células T CD8 parece ser mais expressiva em mulheres do que homens, onde se correlacionou com desfechos desfavoráveis para o sexo masculino, (SANTOS et al., 2021).

Em seu estudo, Moderbacher et al., observaram que as respostas específicas de células T CD4+ e CD8+ para o vírus SARS-CoV-2 estão relacionadas a casos leves da doença, no entanto o desequilíbrio da resposta dessas células pode colaborar para desfechos desfavoráveis em indivíduos idosos.

Na infecção pelo vírus SARS-CoV-2, o perfil de imunoglobulinas produzidas, segue o padrão das demais infecções virais com geração principalmente de IgM e IgG, sendo que a imunoglobulina IgG exerce um papel protetor, pois é detectado meses após a infecção, mas a duração da resposta humoral durante a infecção ou mediada pela vacina ainda não está muito



bem estabelecida, (SILVA et al., 2020).

A principal ação efetora dos anticorpos é a neutralização, as imunoglobulinas G anti proteína viral S e anti N bloqueiam a ligação do vírus ao receptor celular ACE2, impedindo com que este entre na célula, limitando a infecção e facilitando o reconhecimento da partícula viral pelo sistema imunológico e promovendo sua fagocitose pelos macrófagos, (SOARES BRANDÃO; GODOI, 2020). Os anticorpos também podem estimular o sistema complemento, que além de danificar o envelope viral, opsoniza as partículas virais, facilitando assim, a fagocitose. Desta forma a resposta mediada por anticorpos, também chamada de resposta imune humoral, exerce um papel significativo na proteção após segunda infecção, (CARRIJO-CARVALHO, 2020).

A concentração das imunoglobulinas IgA e IgM na COVID-19 alcançam seu pico entre 2 a 3 semanas após manifestação de sintomas, podendo ser encontrado em grande parte dos indivíduos infectados, sendo que a IgM decai por volta de 4 a 5 semanas, (MODERBACHER et al., 2020). Já a imunoglobulina IgG é detectada em cerca de 50% dos indivíduos por volta do décimo dia, atingindo seu pico em aproximadamente 21 dias após o início dos sintomas, (SANTOS et al., 2021).

Grande parte dos indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2, produzem respostas humorais direcionadas para a imunoglobulina IgG, mas após o pico, é observável o decaimento dos níveis desse anticorpo ao longo do tempo, permanecendo detectável por um período que varia de 4 a 7 meses, (MODERBACHER et al., 2020).

## **2.4 Vacinas**

A imunização é um mecanismo que confere ao indivíduo a capacidade de converter-se imune ou resistente a uma doença infecciosa através da administração de vacina, (OMS et al., 2022). As vacinas agem estimulando o sistema defesa do organismo a montar respostas específicas que conferem proteção ao indivíduo contra as doenças infecciosas, (FILHO et al., 2022), fazendo com que este, ao se deparar com o mesmo agente infeccioso com todo o seu potencial de virulência, não adoça ou desenvolva as formas graves e venha a óbito, sendo assim extremamente importante no combate a diversas doenças que acometem os seres humanos e animais, (OPAS et al., 2022).

Todas as vacinas passam por um processo de avaliação que tem como finalidade assegurar que os imunizantes obedeçam aos parâmetros de qualidade consideráveis, bem como segurança e eficácia, por meio de dados gerados por ensaios clínicos, fabricação e

controle de qualidade, (SANTOS FILHO; VIEIRA, 2021). No caso da COVID-19, a avaliação considera a gravidade e risco que a emergência representou e o benefício que o uso do imunizante traria em comparação aos riscos potenciais, (WHO et al.,2022).

Os imunizantes contra a COVID-19 foram desenvolvidos com o intuito de sensibilizar o sistema imunológico para reconhecer e bloquear e combater o vírus SARS-COV-2, a maioria dos imunizantes foram desenvolvidos utilizando tecnologias diferentes, (OPAS., et al 2022).

Há uma diversidade de vacinas validadas para uso contra a COVID-19 pela Organização mundial de saúde (OMS). O uso emergencial dessas vacinas teve início em dezembro de 2020 e o número de doses já administradas em todo mundo somam mais de 13 bilhões, (WHO et al., 2023).

Os imunizantes utilizados no Brasil são: Comirnaty (Pfizer/Wyeth), Coronavac (Butantan), Janssen Vaccine (Janssen-Cilag) e Oxford/Covishield (Fiocruz e Astrazeneca), (Ministério da Saúde et al., 2022).

A administração das vacinas contra a COVID-19 obedece a critérios de prioridade, sendo incluídos nesse grupo os indivíduos que possuem maior risco de contrair o vírus (maior exposição) ou adoecer gravemente por COVID-19, como pessoas idosas, profissionais de saúde e indivíduos que possuem doenças de bases, (OPAS et al.,2022). As vacinas oferecem variados graus de proteção contra a COVID-19 prevenindo a ocorrência de doença leve, grave, bem como hospitalização e morte, (SAÚDE.,2022).

#### 2.4.1 CoronaVac

O Brasil deu início a sua campanha de vacinação no dia 17 de janeiro de 2021 com a vacina chinesa em parceria com o Instituto Butantan, CoronaVac. Foi a primeira vacina a ser aplicada nas populações de risco, incluindo profissionais de saúde, e hoje representa quase a metade das 500 milhões de doses vacinais administradas no país contra a COVID-19. Além do Brasil, a vacina é utilizada em mais 41 países, (BUTANTAN et al., 2022).

A vacina Coronavac (Butantan), utiliza a tecnologia de antígeno de vírus inativado. A suspensão injetável é administrada via intramuscular e é recomendada para imunização ativa e prevenção da doença causada pelo vírus SARS-CoV-2 em pessoas com faixa etária igual ou superior a 6 anos de idade, com aplicação de no mínimo duas doses, (BUTANTAN et al., 2022).

Essa tecnologia utilizada pela CoronaVac (Vírus inativado) é considerada estável,

segura e causa poucos eventos adversos, sendo utilizada em diversas outras vacinas há mais de 60 anos, como a da poliomielite, gripe e raiva, (BUTANTAN et al., 2022).

Segundo a AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), os testes sobre a imunogenicidade da vacina estão em andamento e estudos conduzidos em países que fazem o uso do imunizante mostraram resultados favoráveis, sendo possível observar um parâmetro do mundo real sobre a capacidade da CoronaVac de estimular o sistema imunológico a montar respostas específicas e produzir anticorpos neutralizantes, bem como a proteção conferida pelo imunizante nas mais diversas faixas etárias, (SAÚDE et al., 2022). No Brasil por exemplo, um estudo multicêntrico de fase III demonstrou que em um período de 14 dias após a aplicação das duas doses da vacina, a eficácia apresentada é de 51% [intervalo de confiança de 95% (IC): 36%-62%] contra infecções sintomáticas, 100% (IC 95%: 17%-100%) contra as formas graves da doença e 100% (IC 95%: 56%-100%) para prevenção de hospitalizações em grupos com e sem presença de doenças de bases, (BULA DA VACINA).

Em um estudo caso-controle contando com 164.151 participantes vacinados com a CoronaVac e BNT162b2 (PFIZER) demonstraram serem eficazes contra desfechos graves da infecção pela variante Omicron do SARS-CoV-2, no entanto se observou que a titulação de anticorpos neutralizantes apresenta um declínio após 6 meses da administração da segunda dose. (WEI et al., 2023)

#### 2.4.2 Astrazeneca

O imunizante produzido pela Oxford e a empresa farmacêutica AstraZeneca ChadOx (Oxford-AstraZeneca) utiliza a tecnologia de vetor viral recombinante. No Brasil, a produção do imunizante é feita em parceria com o Instituto FioCruz, (FIOCRUZ et al., 2022). O vetor viral utilizado é um adenovírus recombinante de chimpanzé, sem capacidade de replicação e que expressa a proteína S do vírus SARS-CoV-2, (FIOCRUZ et al., 2022).

A vacina é recomendada para a imunização ativa contra a COVID-19, são administradas no mínimo duas doses via intramuscular, devendo a segunda dose ser aplicada no intervalo de 4 a 12 semanas após a administração da primeira. A faixa etária que a vacina ChadOx cobre é a partir de 18 anos de idade, (BULA DA VACINA).

Estudos clínicos randomizados realizados em 3 país incluindo o Brasil, demonstraram a eficácia e segurança da vacina ChadOx em indivíduos com idade de 18 a 55 anos, nesse estudo 11.636 participantes foram acompanhados por um período aproximadamente de 4

meses e nenhum dos participantes que receberam o imunizante precisou ser internado por COVID-19, e foi evidenciado a redução da forma sintomática da doença, apresentando uma eficácia média de 70% comparado com o grupo controle, (FIOCRUZ., et al 2022).

#### 2.4.3 Pfizer

A vacina contra a COVID-19 Pfizer BioNTech (BNT162b2), da empresa Comirnaty Pfizer em parceria com o instituto alemão BioNTech, é recomendada para a imunização ativa de indivíduos na faixa etária maior ou igual a 5 anos com a finalidade de proteger contra a doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, (SAÚDE et al., 2022).

É um imunizante que tem como tecnologia o RNA mensageiro sintético com (mRNA) de cadeia simples, imerso em nanopartículas lipídicas. Sua estrutura 5 cap é altamente purificada e é produzida através de transcrição in vitro por meio de moldes de DNA correspondente sem uso de células, que codificam a proteína S do SARS-CoV-2, (WHO et al.,2022).

Trata-se de uma suspensão injetável (cerca de 3ug, 10ug e 30ug) que é aplicado via intramuscular. A vacina é aplicada em duas doses, sendo que a segunda deve ser administrada em um intervalo de tempo inferior ou equivalente a 21 dias após a administração da primeira. A faixa etária que o imunizante cobre é a partir de 5 anos de idade, (SAÚDE et al., 2022).

Resultados obtidos sobre a eficácia da vacina Pfizer em estudos de fase 1,2 e 3 randomizado, multinacional, multicêntrico, controlado por placebo em populações de faixa etária igual ou superior a 12 anos, comprovaram a eficácia da vacina de no mínimo 80% nesses indivíduos, (SAÚDE et al., 2022).

#### 2.4.4 Jansen

A vacina Janssen (Ad26.COV2.S) é um imunizante monovalente, produzido pela empresa farmacêutica Johnson & Johnson, utiliza a tecnologia de vetor de um adenovírus humano tipo 26 recombinante, com incapacidade de replicação, que codifica a proteína S do vírus SARS CoV 2, (BULA DA VACINA).

O imunizante é recomendado para a imunização ativa e prevenção da doença causada pelo novo coronavírus 2, COVID-19, em indivíduos com idade igual ou superior a 18 anos. A suspensão injetável é administrada via intramuscular e aplicada no mínimo em dose única, (SAÚDE et al.,2022). A dose de reforço da vacina pode ser aplicada em indivíduos com

idade acima de 18 anos em um intervalo de 2 meses após a administração da vacinação primária.

Os resultados obtidos em estudos clínicos multicêntrico, randomizados para avaliar a eficácia, imunogenicidade e segurança da vacina em 44.325 indivíduos, demonstraram que 28 dias após a vacinação foram encontrados anticorpos neutralizantes em 90% dos participantes da pesquisa, permanecendo estável até 71 dias após a administração da dose única, (BULA DA VACINA).

A eficácia apresentada pelo imunizante para prevenção de infecção assintomática 28 dias após a vacinação é de 28,9% (IC 95%: 20,0; 36,8), e para todas as infecções com diferentes cepas variantes do SARS-CoV-2 é de 41,7% (IC 95%: 36,3; 46,7), (Janssen et al., 2022).

## **2.5 Imunidade vacinal contra a COVID-19**

Segundo o CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS (CDC), embora progressos com o desenvolvimento de vacinas contra o SARS-COV-2 tenham sido alcançados, questões sobre por quanto tempo dura a proteção oferecida pelo imunizante contra a COVID-19 permanece sob investigação e como o surgimento de variantes de preocupação do vírus poderiam ser capazes de escapar da imunidade natural ou mediada pelas vacinas, impactando assim na proteção adquirida contra o SARS-CoV-2, (CDC, 2021).

Embora grande parte dos estudos realizados para verificar a eficácia da imunidade contra a COVID-19 desencadeada tanto pela infecção natural como pela vacina tenha como parâmetro os níveis séricos de anticorpos neutralizantes circulantes contra o SARS-COV-2, não está bem estabelecido qual nível de anticorpos neutralizantes conferem proteção contra a doença causada pelo vírus, (BENOTMANE; BRUEL, 2021; CALLAWAY, 2021).

Indivíduos que contraíram o SARS-COV-2 e desenvolveram as formas leves da doença permaneceram com níveis detectáveis de anticorpos neutralizantes até onze meses depois da infecção, no entanto foi observado que o nível sérico de anticorpos decai com o tempo, de forma constante nos 4 meses seguintes e gradualmente aos 7 meses, (TURNER et al., 2021). Em um estudo da resposta humoral mediada pela vacina contra a COVID-19, Turner e colaboradores avaliaram a duração da resposta desencadeada pela vacina da Pfizer-BioNTech e detectaram imunoglobulinas tipo IgG contra a proteína S do vírus até 4 meses após a administração da primeira dose e 3 meses após a vacinação completa (duas doses). Nesse estudo, indivíduos previamente expostos ao SARS-COV-2, desenvolveram níveis

séricos de anticorpos mais robustos que os não expostos, (TURNER et al., 2021).

Em uma coorte para verificar a imunogenicidade de uma dose do imunizante de vetor viral produzido pela (Oxford/AstraZeneca) observou-se um índice maior de soroconversão, após a administração de uma dose para a forma selvagem do vírus entre os indivíduos sem exposição prévia, contudo os níveis de anticorpos neutralizantes para as variantes Alfa e Beta do SARS-COV-2 apresentou declínio considerável, (JEEWANDARA et al., 2021). Já os indivíduos que foram previamente expostos ao vírus, observou-se um nível maior de anticorpos em resposta ao vírus selvagem e as variantes Alfa e Beta após a aplicação de apenas uma dose da vacina, (JEEWANDARA et al., 2021).

Planas e colaboradores em seu estudo para verificar a eficácia de duas vacinas (AstraZeneca e Pfizer) diante da variante Delta, observou um aumento da capacidade desta variante, de escapar de anticorpos neutralizantes de indivíduos vacinados.

A neutralização mostrou-se três vezes menos potente em relação a variante alfa, no entanto, os indivíduos vacinados com duas doses de AstraZeneca ou Pfizer apresentaram eficácia para neutralização de 95%, (PLANAS et al., 2021).

Um ensaio clínico de fase III realizado na Turquia, demonstrou que a CoronaVac apresentou em indivíduos de faixa etária de 18 a 59 anos uma boa resposta humoral com produção de anticorpos neutralizantes contra o SARS-COV-2 por até 4 meses. Não houve casos de hospitalizações, nem óbitos no grupo de vacinados, e as infecções após a aplicação de duas doses foram menores em relação ao grupo controle, apresentando uma eficácia de 85%, (TANRIOVER, 2021).

Outro estudo conduzido por Li e colaboradores, demonstrou que os anticorpos neutralizantes contra o novo coronavírus produzidos após a administração de duas doses da vacina CoronaVac, apresentou um declínio após 6 meses em indivíduos com mais de 60 anos, no entanto constataram que o aumento da eficácia é possível com a aplicação de uma terceira dose da vacina após 6-8 meses, (LIU X, 2021).

### 2.5.1 Fatores que interferem na resposta imune vacinal

A resposta imune à vacinação pode variar entre os indivíduos e tem sido demonstrado por alguns estudos, que alguns fatores podem influenciar a resposta adaptativa (humoral e celular) mediada pelas vacinas, (FILHO et al., 2022).

Alguns fatores envolvidos são intrínsecos e extrínsecos ao hospedeiro como

gênero, idade, doenças de base, genética, microbiota, imunidade preexistente e uso de alguns medicamentos, por exemplo. Os fatores ambientais, comportamentais e nutricionais também exercem influência nessa resposta do organismo a vacinas, (SANTOS FILHO; VIEIRA, 2021).

Alguns desses estudos que investigam a associação de fatores intrínsecos do indivíduo a resposta imune mediada por vacinas, são voltados a fatores genéticos. A genética é um fator importante a ser considerado, na COVID-19 e os fatores genéticos já vem sendo associados tanto a proteção como a suscetibilidade à doença, (STAWISKI et al., 2020). Alguns estudos que associam fatores genéticos e resposta vacinal, analisam polimorfismos de nucleotídeo único em genes de mecanismos importantes da imunidade inata como PRRs e genes que codificam citocinas e sua relação com a variação de respostas a vacinas nos indivíduos, (OVSYANNIKOVA, 2014).

Ovsyannikova e colaboradores (2014) avaliaram a associação de polimorfismos de genes da imunidade inata ao perfil de resposta induzida pela vacina contra a rubéola e identificaram que alguns SNVs encontrados em genes de TLRs, exerciam influência no desempenho de respostas imunes inatas e adaptativas, impactando no tipo, direção e viés de resposta produzida pelo indivíduo após vacinação, (OVSYANNIKOVA, 2014).

Dhiman e colaboradores (2008) investigaram o papel de polimorfismos de receptores toll nas respostas imunes mediadas pela vacina contra o sarampo e o SNV do gene de *TLR3* rs5743305 foi apontado como um fator de risco relacionado a respostas imunes baixas em vacinados contra o sarampo com baixa produção de anticorpos neutralizantes.

A proteção conduzida pela vacina é decorrente da adequada interação estabelecida entre a imunidade inata e adaptativa. A eficácia da vacina é avaliada por meio da resposta imune induzida por ela, através da quantificação de títulos de anticorpos neutralizantes, soroconversão, avidéz de anticorpos, anticorpos funcionais, ativação de células T e B, bem como produção de citocinas que participam da resposta inflamatória, entre outras, (SANTOS FILHO; VIEIRA, 2021).

É nessa análise de eficácia, que pode ser observada essa nítida variação de resposta vacinal entre os indivíduos tanto de forma quantitativa como qualitativa, e essas variações existentes podem ter consequências tanto na eficácia de proteção da vacina, quanto na durabilidade da proteção oferecida por ela, (FILHO et al., 2022).

Compreender a intervenção que esses fatores podem provocar na resposta vacinal é necessário para aprimorar a imunogenicidade e conseqüentemente a eficácia das vacinas, (OVSYANNIKOVA, 2014).

## 2.6 Polimorfismo genéticos e COVID-19

O projeto Genoma Humano identificou polimorfismos de base única que a princípio não possuíam uma função específica, mas com o decorrer do tempo, muitos desses polimorfismos foram descritos com atuação importante na resposta imune contra patógenos, (ÖZTÜRK; TAŞOVA; AYZAZ, 2020).

Fatores intrínsecos ao hospedeiro tais como os genéticos, notavelmente os polimorfismos, vem ganhando importante destaque por estar associado à suscetibilidade ou proteção a infecções por diversos patógenos, (NIEMI et al., 2021).

Os polimorfismos em genes relacionados à resposta imunológica, principalmente PRRs como TLR e NOD e genes de citocinas, vêm sendo associados em diversos estudos a susceptibilidade a diversas doenças imunológicas e infecciosas, (CARTER-TIMOFTE et al., 2020; PONTILLO, 2014).

Alguns estudos reforçam que os polimorfismos genéticos podem influenciar tanto na resposta imune quanto na suscetibilidade à severidade da doença ocasionada pelo novo coronavírus, predispondo ao seu agravo ou agindo como fator protetor, (DEVAUX , CHRISTIAN A, 2020; FRICKE-GALINDO; FALFÁN-VALENCIA, 2021).

Alguns estudos apontam que fatores genéticos podem estar associados à patogênese da COVID-19. No ECA2 humano, por exemplo, foram verificadas por ferramenta de bioinformática algumas eventuais variantes genéticas na população que podem atuar elevando ou diminuindo a expressão ou afinidade de interação do ECA2 com a proteína S do coronavírus, conseqüentemente elevando ou reduzindo a suscetibilidade dessa população à doença, (DEVAUX , CHRISTIAN A, 2020; STAWISKI et al., 2020).

Presume-se que pacientes jovens com boas condições de saúde que sucumbem à doença desenvolvendo as formas graves da COVID-19 possuem variantes genéticas, que levam a uma disfunção da imunidade, predispondo o indivíduo a infecção por diferentes patógenos, como é o caso da síndrome proliferativa ligada ao cromossomo X, que vem sendo apontada como um fator de suscetibilidade a infecções virais, (CASANOVA, JEAN-LAURENT, C. SU, 2020).

Polimorfismos em genes do Inflamassoma *NLRP3* e *NLRP1* e citocinas pró inflamatórias *IL1B* e *IL18* componentes da imunidade inata, já vêm sendo relacionados a resposta imunes prejudicadas, propensão à gravidade, bem como resistência a diversas doenças infecciosas e não infecciosas, (JUNQUEIRA et al., 2021; RODRIGUES et al., 2020). Apesar dos SNVs (polimorfismos de base única) em genes do Inflamassoma estarem



associados a diversas doenças, a relação deles com a COVID-19 ainda é pouco estudada.

SNVs em vias de sinalização e produção de interferons também são relatados na literatura como falhas da resposta imune inata a vírus. Essas variações genéticas podem interferir nas transcrições e resultar em modificações de ativação celular e produção e secreção de citocinas, (NIEMI et al., 2021; ZHANG; ZHAO; ZHAO, 2021).

A relação dos fatores genéticos com a variabilidade de manifestação clínica ou progressão da COVID-19, bem como os erros de resposta imune associados a essas variantes genéticas como um fator que predispõe a manifestação clínica ou a variação do perfil de resposta do indivíduo à infecção na COVID-19 ainda é pouco estudada e os dados existentes ainda são limitados, portanto não está bem elucidado qual o papel e relevância que esses fatores podem desempenhar no desenvolvimento da doença ou imunidade ao novo coronavírus, (CARRIJO-CARVALHO, 2020; FRICKE-GALINDO; FALFÁN-VALENCIA, 2021).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

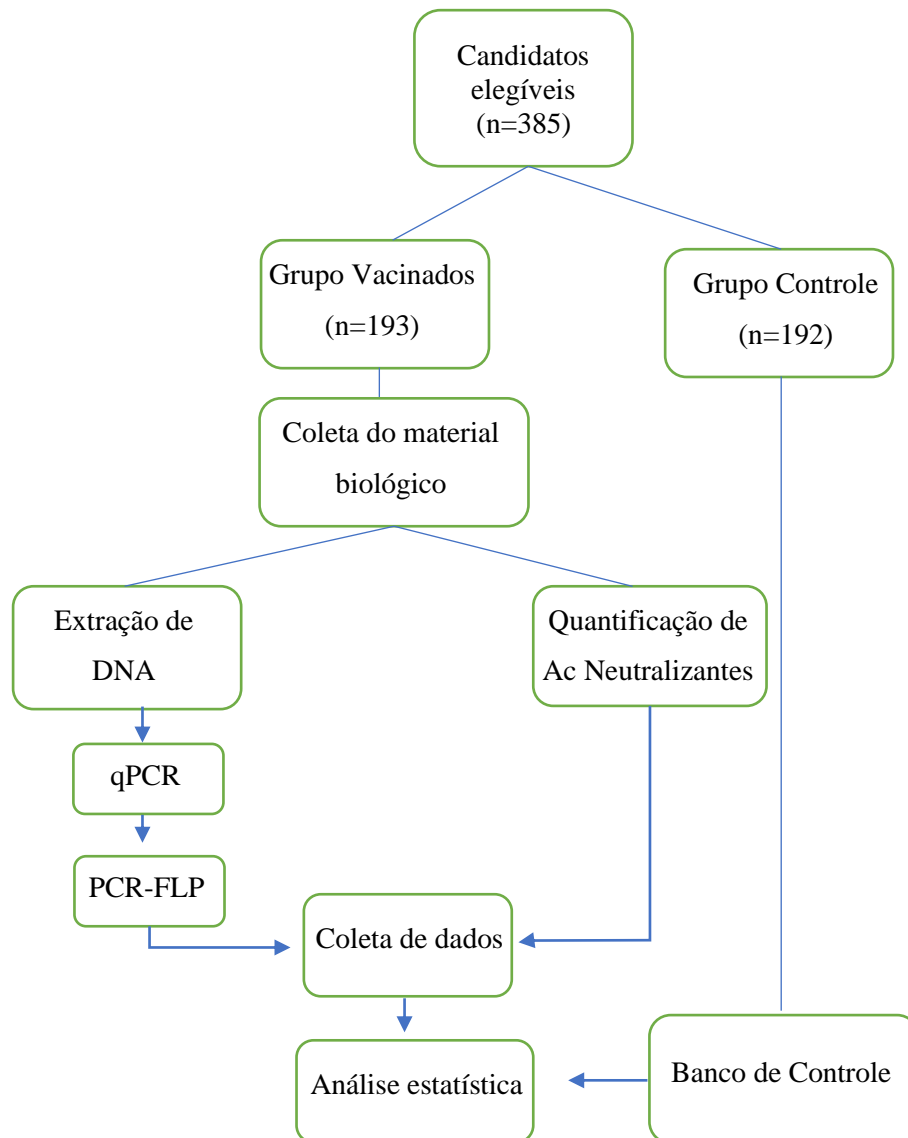
Avaliar a associação entre polimorfismos em genes do inflamassoma *NLRP1*, *NLRP3* e das citocinas *IL1B* e *IL18* a produção de anticorpos neutralizantes em indivíduos vacinados com a CoronaVac.

### 4.2 Objetivos Específicos

- ✓ Estimar a frequência das variantes *NLRP1* (*rs12150220*, *rs35865013* e *rs2670660*), *NLRP3* (*rs10754558*, *rs10802502* e *rs3806265*), *IL1B*(*rs16944*) e *IL18* (*rs187238*) no grupo controle e em indivíduos vacinados com a CoronaVac;
- ✓ Quantificar a produção de anticorpos após a vacinação com a CoronaVac na população de estudo;
- ✓ Verificar possível associação entre as variantes estudadas com a produção de anticorpos nestes indivíduos;

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Fluxograma de atividades



### 5.2 Aspectos éticos

O presente estudo, faz parte de um projeto maior coordenado pela Dra Adriana Malheiro Alle Marie, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) e intitulado: Análise da resposta imune e eficácia da vacina contra COVID-19 em profissionais da Saúde da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, sob respectivo número

de CAAE: 42728021.0.0000.0000 e número de parecer: 4.526.128.

As amostras do grupo controle, foram coletadas antes da pandemia de COVID-19, e são referentes a um projeto maior coordenado pela Dra Laura Patricia Viana Chaves, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) e intitulado: Avaliação do perfil Celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na Cidade de Manaus, sob respectivo número de CAAE: 0024.112.000-10.

Todos os participantes da pesquisa foram informados sobre o estudo e a relevância do mesmo, consentindo a participação através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

### **5.3 Tipo de estudo**

Trata-se de um estudo observacional, descritivo, do tipo longitudinal, realizado em profissionais de saúde vacinas vacinados contra a COVID-19 com a vacina CoronaVac. O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Genômica da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM).

### **5.4 População de estudo e amostragem**

A população de estudo é composta por um grupo de 193 trabalhadores da Fundação Hemoam, que receberam as duas doses da vacina CoronaVac contra a COVID-19, de acordo com os critérios propostos pelo Ministério da Saúde e de acordo com o Plano Nacional de Vacinação, e um grupo controle composto por 192 doadores de sangue saudáveis. Trata-se de uma amostragem não probabilística por conveniência.

### **5.5 Critérios de elegibilidade**

Foram incluídos no grupo de vacinados, os servidores da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas que se apresentavam saudáveis, >18 anos, de ambos os gêneros, que tomaram as duas doses da vacina CoronaVac, e que aceitaram participar do estudo voluntariamente assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.

Foram excluídos do grupo de vacinados: indivíduos que possuíam alguma imunodeficiência, doença infecciosa em curso, que não tomaram o imunizante ou deixaram de realizar a coleta em alguns dos tempos, Zero, 30 e 90 dias.

Como grupo controle foram incluídos as genotipagens realizadas para as variantes em estudo de 192 doadores saudáveis de ambos os gêneros maiores de 18 anos que realizaram doação de sangue no HEMOAM entre o período de janeiro a dezembro de 2015 e que concordaram participar da pesquisa.

### **5.6 Coleta das Amostras**

A coleta dos dados foi realizada através de questionário individual, que dispõem de informações importantes para o levantamento de um perfil da população de estudo, como dados demográficos, infecção prévia, reinfeção e reação após vacinação. As amostras biológicas foram coletadas dos servidores durante o período de fevereiro a outubro de 2021 pela equipe do projeto. A coleta foi realizada por punção venosa de aproximadamente 4mL de amostra de sangue em tubos com sistema a vácuo contendo EDTA (BD Vacutainer EDTA K2®), com Gel Separador (Gel BD SST® II Advance) e ativador de coágulo (BD Vacutainer® Prp I-prf). As amostras foram coletadas antes da vacinação tempo zero (n= 193), 30 dias (n=193) e 90 dias (n=193) após a segunda dose da vacina, para genotipagem e sorologia.

### **5.7 Extração e quantificação do DNA**

A extração do DNA Genômico das amostras de sangue foi realizada pelo método Brazol. Basicamente, as células foram submetidas à lise por Brazol e clorofórmio e levadas a centrifugação e o sobrenadante gerado foi retirado e lavado com etanol para obtenção de precipitado. Após a extração das amostras, o DNA foi analisado por leituras a 260/280 nm com o espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific™). Foi considerado uma unidade de Densidade Ótica (DO) como equivalente a 50 ng/μL de DNA. As faixas de absorvância de 260/280 (faixa de absorção de compostos orgânicos, açúcares, ureia e sais) e 260/230 (faixa de absorção de proteínas) foram aplicados para avaliar a pureza do DNA, em seguida o DNA extraído foi congelado a -80° de C e armazenado até a realização da genotipagem.

### **5.8 Genotipagem por PCR-RFLP para estudos de polimorfismos dos genes de *IL1B* e *IL18*.**

Os polimorfismos dos genes de *IL1B* e *IL18* foram analisados através da amplificação

da região de interesse pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida pela reação de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP). As reações de PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) foram realizadas de acordo com os protocolos descritos por Folwaczny et al., (2005), Bhat et al., (2014). Para as reações foram utilizados primers específicos para os SNVs *IL1Beta* (*rs16944*), *IL18* (*rs187238*). O programa de ciclagem utilizado seguiu a descrição dos quadros 4 e 5, já os Primers específicos que foram utilizados para a amplificação do polimorfismo de *IL18 rs187238* região (-137 G/C) e *IL1Beta rs16944* região (-511 T>C) estão descritos nos quadros 6 e 7.

Temperatura	Tempo	Ciclo
95°C	4':00"	1
95°C	0:30"	35
56°C	0:30"	
72°C	0:30"	
72°C	10':00"	1
4°	∞	1

**Quadro 4:** Programação do termociclador para amplificação dos genes de interesse para *IL1B*.

Temperatura	Tempo	Ciclo
95°C	15':00"	1
94°C	0:30"	35
60°C	0:30"	
72°C	1:30"	
72°C	10':00"	1
4°	∞	1

**Quadro 5:** Programação do termociclador para amplificação dos genes de interesse para *IL18*.

IL-1Beta	LSR <sup>1</sup> e ER <sup>2</sup>	Primers	Sequência 5'-3'	Tp <sup>3</sup> (°C)	PCR	RFLP	Ref.
IL1-Beta	Rs16944	IL-1BF	TGGCATTGATCTGGTTCATC	56°C	304pb	304 pb 190 pb	1

						104 pb	
	<i>AvaI</i>	IL-1BR	GTTTAGGAATCTTCCCCTT				

**Quadro 6:** Descrição dos Primers de *IL1B*, temperatura de pareamento (Tp) utilizada para amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos que deverão ser obtidos após a PCR e reação de restrição (RFLP). 1. Localização do sítio de restrição; 2 Enzima de Restrição; 3 Temperatura de pareamento; Ref: Referências: 1 Bhat e colaboradores (2014).

IL18	LSR <sup>1</sup> e ER <sup>2</sup>	Primers	Sequência 5'-3'	Tp <sup>3</sup> (°C)	PCR	RFLP	Ref.
IL18	Rs187238	IL18F	CACAGAGCCCCAACTTTTACGG CAGAGAA	60°C	155pb	155 pb 116 pb 34 pb	1
	<i>Mbo II</i>	IL18R	GACTGCTGTCGGCACTCCTTGG				

**Quadro 7:** Descrição dos Primers de *IL18*, temperatura de pareamento (Tp) utilizada para amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos que deverão ser obtidos após a PCR e reação de restrição (RFLP). 1. Localização do sítio de restrição; 2 Enzima de Restrição; 3 Temperatura de pareamento; Ref: Referências: 1 e 2: 1. Folwaczny e colaboradores (2005)

Os produtos da PCR foram submetidos à reação de RFLP. Os produtos da reação de RFLP foram visualizados em gel de agarose (a 3% para *IL1B* e 2,5% para *IL18*) e corado com brometo de etídio.

### 5.9 Genotipagem por PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) para estudos de polimorfismos em genes de *NLRP1*, *NLRP3*.

A genotipagem dos polimorfismos em genes de *NLRP3* (*rs10754558*, *rs108805502*, *rs3806265*) e *NLRP1* (*rs12150220*, *rs35865013*, *rs2670660*) foi realizada através da técnica de PCR em tempo real, utilizando sondas fluorescentes TaqMan alelo-específicas que permitem a discriminação dos SNVs em estudo. As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas em microplacas de 96 poços. O termociclador Applied Biosystems QuantStudio™ 3 da Thermofisher Scientific fois utilizado para amplificação dos fragmentos de interesse e interpretação dos resultados. As variações genéticas estudadas estão descritas no quadro abaixo.

**Quadro 8:** Descrição dos genes, referência dos SNVs, localização.

SNV	Localização	[VIC/FAM]	Tipo
<b>NLRP1</b> rs12150220	chr17:5582047	GGAGCTTGAAGAGCTTG GTAGAGG[ <b>A/T</b> ]GTGAGGCA GAGATTTCTGGGGGGAA	Mutação de sentido errado, substituição de transversão, intragênica
<b>NLRP1</b> rs35865013	chr17:5512596	GGTAAAGGAGATGGGTGG GTGGGGC[ <b>A/G</b> ]TGAAGGAC CCGAAAGACAAGGCCAG	Substituição de transição, íntron, intragênico
<b>NLRP1</b> rs2670660	chr17: 5615686	ACAAGTGATCTACCAGTCTTT TAAA[ <b>A/G</b> ]TTCTATTATTTAAA ACCCAA ACATGC	Região promotora
<b>NLRP3</b> rs10754558	chr1:247448734	GACAATGACAGCATCGGGTG TTGTT[ <b>C/G</b> ]TCATCACAGCGC CTCAGTTAGAGGA	Substituição de transversão, UTR 3, Intragênica
<b>NLRP3</b> rs10805502	chr1:2474488993	ATTTATTTATTTAAATTTTTGT AA[ <b>C/T</b> ]AGTTTTGTTTTCTAATA AGAAAAAT	Substituição de Transição, UTR 3, Intron, Intragênico
<b>NLRP3</b> rs3806265	chr1: 247423034	ATGCTTGGCAGGTGGACAGCAG AAG[ <b>C/T</b> ]TGTTTTGAAACTAGGA GTGCAGAAA	Substituição de transição, íntron, intragênico

### 5.9.1 Quantificação de anticorpos neutralizantes.

O teste para detecção de anticorpos neutralizantes foi realizado usando o Kit SARS-COV-2 IgG II *Quant ARCHITECH Abbott* que detecta anticorpos IgG, anticorpos neutralizantes do domínio RBD da subunidade S1 da proteína *Spike* do SARS-CoV-2. O teste apresenta um cutoff de 50 AU/mL e a interpretação dos resultados é negativo (<50 AU/mL) e positivo (>50 AU/mL). O teste de imunoenensaio de micropartículas por quimioluminescência foram feitos no laboratório de sorologia do HEMOAM.

### 5.9.2 Análise dos resultados.

Os dados sociodemográficos foram apresentados em tabelas, e elaborados no programa Microsoft Excel (Microsoft Corporation). As variáveis categóricas são expressas em valor absoluto (n) e frequência relativa (%). O software GraphPad Prism (versão 9.0.1) foi utilizado para a análise estatística. O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição dos dados. Dessa forma, considerando a distribuição não



gaussiana dos dados, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre os grupos, e o teste de Wilcoxon para análises pareadas.

O software R Studio foi utilizado para a análise da frequência genotípica e alélicas, e o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) na população de estudo. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Dados demográficos

Como descrito na tabela abaixo, 68% da população de estudo no grupo de vacinados são do sexo feminino contra 66% no grupo controle. Já o sexo masculino representa 32% da população no grupo de vacinados contra 34% no grupo controle. No grupo de vacinados a mediana + IQR foi de 40 (29 – 50) para indivíduos entre 18 e 59 anos de idade, e de 63 (61 – 69) para indivíduos acima de 60 anos. Já no grupo controle os indivíduos com idade entre 18 e 59 anos apresentaram mediana + IQR de 35 (24 – 47) e 64 (61– 67) para indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos.

**Tabela 1:** Características sociodemográficas da população de estudo.

	<b>Grupo controle (n=192)</b>	<b>Grupo de vacinados (n=193)</b>
<b>Características sociodemográficas</b>		
<b>Idade, mediana + IQR</b>		
18-59 anos	35 (24 – 47)	40 (29 – 50)
>60 anos	64 (61 – 67)	63 (61 – 69)
<b>Omissos, N (%)</b>		
	1 (0,7%)	3 (15%)
<b>Sexo, N (%)</b>		
Masculino	65 (34%)	61 (32%)
Feminino	127 (66%)	132 (68%)
<b>Etnia, N (%)</b>		
Branços	91 (47,3%)	86 (44,5%)
Pardos	87 (45,3%)	91 (47,1%)
Negros	13 (6,7%)	12 (6,2%)
Omissos	1 (0,7)	3 (1,5%)

Ainda na tabela 1 consta que 44,5% da população do grupo de vacinados são caucasianas, 47,1% são pardos e apenas 6,2% dos indivíduos vacinados são negros, já na população do grupo controle 45,3% dos indivíduos são pardos, 47,3% são caucasianos e 6,7% negros. Alguns sinais e sintomas de reações adversas apresentados após vacinação foram relatados por alguns participantes do grupo de vacinados e a intensidade variou de leve a moderada. Reações adversas de maior gravidade após a administração das doses não foram descritas.

Dos 193 indivíduos imunizados, 94 dos participantes apresentaram uma ou mais reações adversas conforme demonstrado abaixo na tabela 2, representando 49% da população de estudo. Os eventos adversos mais mencionados foram: dor local da aplicação (46,6%), febre (1,55%), eritema local (1,55%), dor muscular (1,55%), e mal-estar (0,5%). A infecção prévia (antes da vacinação) foi relatada por 105 participantes, que afirmaram terem contraído COVID-19 antes da administração das doses, representando 54% da população de estudo, enquanto os quadros de reinfecções entre as doses da vacina foram descritas apenas por 8 participantes, representando assim, 4% da população de estudo, conforme demonstrado na tabela 2.

**Tabela 2:** Descrição dos eventos adversos relatados pelos voluntários após a administração da vacina.

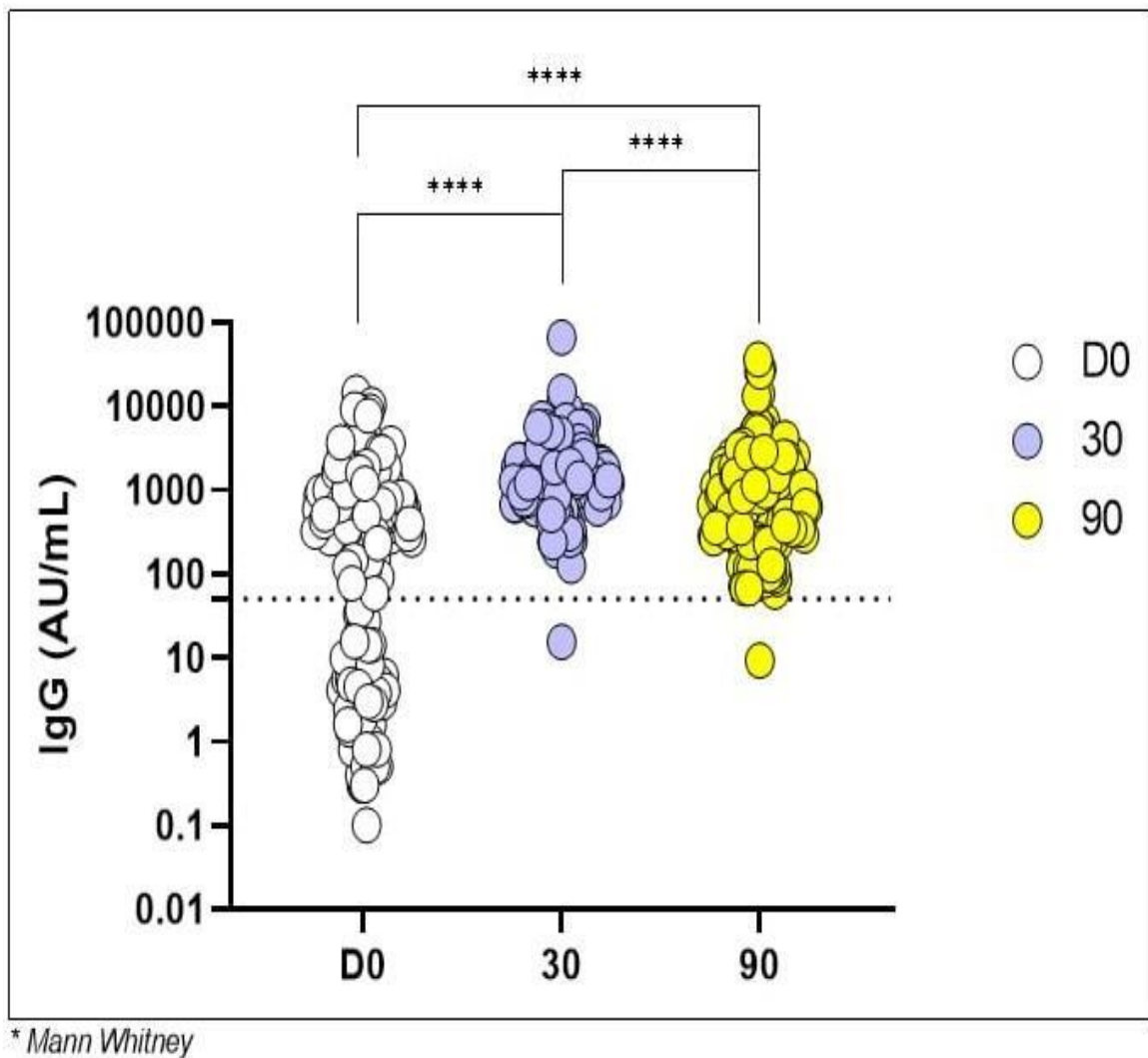
Reações Adversas, N (%)	Grupo de vacinados (n=193)		
	Sim	Não	Omissos
Febre	3 (1,55%)	173 (89,6%)	17 (8,8%)
Dor no local	90 (46,6%)	86 (44,5)	17 (8,8%)
Eritema local	3 (1,55%)	173 (89,6%)	17 (8,8%)
Dor muscular	3 (1,55%)	173 (89,6%)	17 (8,8%)
Mal-estar	1 (0,5%)	175 (90,6%)	17 (8,8%)
<b>Infecção prévia, N (%)</b>	105 (54,4%)	71 (36,7%)	17 (8,8%)
<b>Reinfecção após vacinação, N (%)</b>	8 (4,1%)	167 (86,5%)	18 (9,3%)

## 6.2 Quantificação de Anticorpos neutralizantes

Analizamos a titulação de anticorpos neutralizantes dos indivíduos vacinados. Nas figuras 12 e 13, observamos que 122 indivíduos apresentavam anticorpos contra SARS-CoV-

2 (>50 AU/mL) no período anterior as vacinas, e essa diferença é estatisticamente significativa, quando comparada a 30 e 90 dias após a administração da segunda dose da vacina. Observou-se também que, a produção de anticorpos aumentou 30 dias após a segunda dose da vacina, e essa diferença é estatisticamente significativa quando comparada aos demais tempos. Entretanto, ao observarmos a produção de anticorpos aos 90 dias após a administração da segunda dose, vemos que esta apresenta uma diminuição da sua concentração/titulação, mas esta produção ainda é superior ao tempo pré-vacina e há diferença estatisticamente significativa nas comparações ( $p < 0,05$ ).

**Figura 12:** Quantificação de anticorpo neutralizante anti-SARS-CoV-2 dos tempos pareados D0, 30 e 90 dias, indicando as amostras que testaram positivo e negativo nos três

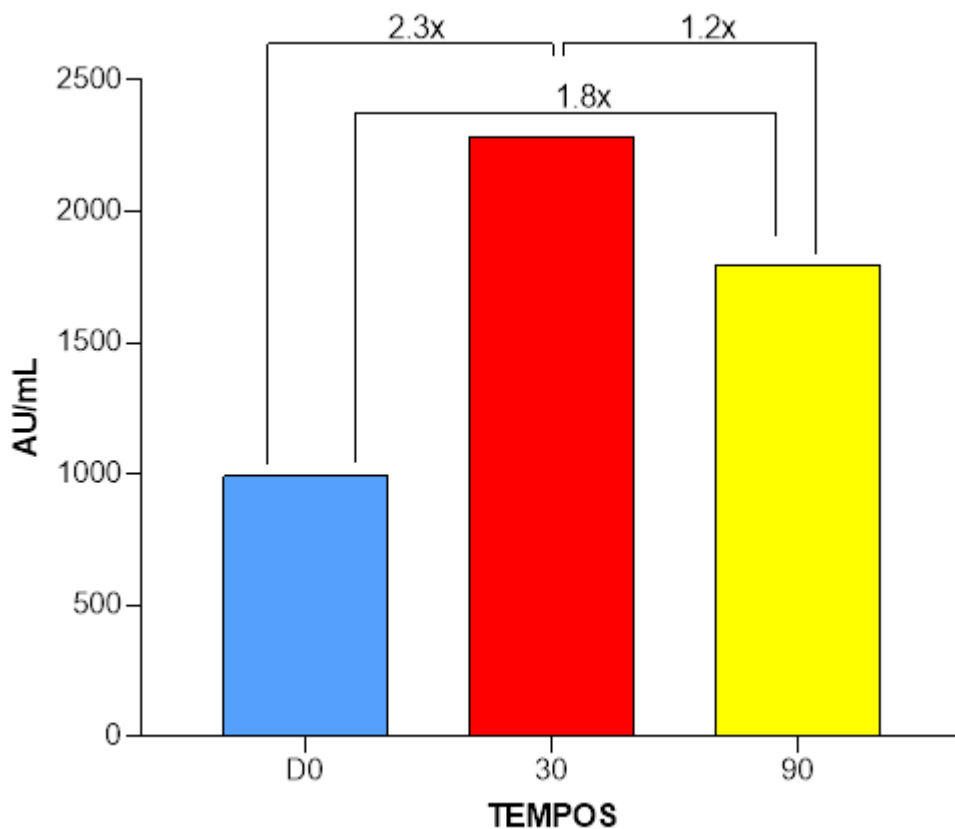


tempos.

Ao analisarmos a soronegatividade para IgG anti-SARS-CoV-2, observou-se que, após a vacina, somente uma amostra continuou abaixo do cut-off (<50 AU/mL), ou seja, não

apresentou anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 após as vacinas, conforme demonstrado na figura 12.

Na figura 13, observamos o quanto a produção de anticorpos aumentou ou diminuiu após o estímulo vacinal. Em 30 dias após a segunda dose houve um aumento de 2.3 na concentração/titulação de anticorpos IgG em comparação com tempo D0. Em 90 dias após a administração da segunda dose, observa-se uma diminuição da concentração de anticorpos neutralizantes, no entanto essa concentração é superior ao tempo pré-vacina, apresentado aumento de 1.8 em comparação com o tempo D0. Quando comparamos os tempos 30 e 90, observamos que o tempo 30 apresentava aumento de 1.2 na concentração de anticorpos em comparação com o tempo 90.



**Figura 13:** Razão das medianas de cada tempo e comparação da produção de anticorpos após a vacinação.

### 6.3 Análise da frequência alélica e genotípica dos polimorfismos estudados em indivíduos vacinados e indivíduos controles

A genotipagem para os SNVs *IL18* rs187238; *IL1B* rs16944; *NLRP1* rs12150220, rs2670660, rs35865013; *NLRP3* rs10754558, rs10805502, rs3806265 foram realizados em

amostras de 193 indivíduos vacinados e 192 controles. Na tabela 3 encontram-se as distribuições e frequências dos genótipos das variantes estudadas na população de estudo. Entre todos os SNPs estudados, *IL1B rs19644* ( $p=0,024$ ), *NLRP1 rs35865013* ( $p=0,000$ ) e *NLRP3 rs3806265* ( $p=0,000$ ), se desviaram do Equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo de indivíduos vacinados.

Nossos dados revelam que para a variante *IL1B rs16944* o genótipo C/T foi o mais frequente em ambos os grupos e houve diferença estatisticamente significativa para os modelos de herança dominante (OR: 2,19, 95% IC: 1,35-3,56; [ $p=0,001$ ]), codominante ( $p=0,005$ ), e overdominante ( $p=0,023$ ). Para a variante *IL18 rs187238* o genótipo G/C foi o mais frequente em ambos os grupos, e não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os genótipos. Para a variante *NLRP1 rs12150220* no grupo controle o genótipo mais frequente foi A/T, e no grupo de indivíduos vacinados o mais frequente foi o genótipo A/A, e não houve diferença significativa nas comparações.

Ainda, para a variante *NLRP1 rs35865013* o genótipo A/G foi o mais frequente no grupo controle, ao passo que, observamos distribuição igual entre os genótipos G/G e A/A no grupo de indivíduos vacinados, apesar de não observarmos diferenças estatisticamente significantes nas comparações.

Avaliamos também as frequências genotípicas para a variante *NLRP3 rs10754558* na população de estudo, e observamos que, o genótipo C/C foi o mais frequente em ambos os grupos, e houve diferença estatisticamente significativa para os modelos de herança codominante ( $p=0,030$ ), dominante (OR: 1,69, 95% IC: 1,12-2,55; [ $p=0,011$ ]) e overdominante ( $p=0,073$ ). Para a variante *NLRP3 rs10802502* o genótipo C/T foi o mais frequente em ambos os grupos, com diferença estatisticamente significativa para o modelo de herança recessivo ( $p=0,035$ ).

**Tabela 3:** Tabela de Frequência dos alelos e genótipos dos polimorfismos nos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *IL1 $\beta$*  e *IL18* na população de estudo, ajustado por gênero e idade.

Polimorfismo, genótipo ou alelo	Grupo controle (n=192)	Grupo de Vacinados (n=193)	OR (CI 95%)	Valor de $p$	AIC
<i>IL1B rs16944 C/T</i>					
<b>Codominante</b>					
C/C	35 (18%)	33 (17%)	2,09 (1,12-3,90)		

<b>C/T</b>	96 (50%)	118 (62%)	2,23 (1,35-3,70)	<b>0,005</b>	525,3
<b>T/T</b>	61 (31%)	33 (17%)	1,00		
<b>Dominante</b>					
<b>C/T-C/C</b>	131 (68%)	157 (82%)	2,19 (1,35-3,56)	<b>0,001</b>	523,4
<b>T/T</b>	61 (31%)	33 (17%)	1,00		
<b>Recessivo</b>					
<b>T/T-C/T</b>	157 (81%)	151 (79%)	1,00		
<b>C/C</b>	35 (18%)	39 (20%)	1,19 (0,71-1,99)	0,505	533,4
<b>Overdominante</b>					
<b>T/T-C/C</b>	96 (50%)	72 (37%)	1,00	<b>0,023</b>	528,7
<b>C/T</b>	96 (50%)	118 (62%)	1,60 (1,06-2,42)		
<b>Log- Additive</b>					
<b>0,1,2</b>	192 (50%)	190 (49%)	1,48 (1,09-2,02)	<b>0,012</b>	527,6
<b>IL18 rs187238 G/C</b>					
<b>Codominante</b>					
<b>G/G</b>	81 (42%)	69(36%)	1,00		
<b>G/C</b>	91(47%)	100 (52%)	1,28 (0,83-1,97)	0,519	534,5
<b>C/C</b>	20 (10%)	21 (11%)	1,24 (0,62-2,49)		
<b>Dominante</b>					
<b>G/G</b>	81 (42%)	69 (36%)	1,00	0,253	532,5
<b>G/C-C/C</b>	111 (57%)	121 (63%)	1,27		
<b>Recessivo</b>					
<b>G/G-G/C</b>	172 (89%)	169 (88%)	1,00		
<b>C/C</b>	20 (10%)	21 (11%)	1,08	0,818	533,8

			(0,56-2,7)		
<b>Overdominante</b>					
<b>G/G-C/C</b>	101 (52%)	90 (47%)	1,00	0,331	532,9
<b>G/C</b>	91 (47%)	100 (52%)	1,22 (0,82-1,83)		
<b>Log Additive</b>					
<b>0,1,2</b>	192 (50%)	190 (49%)	1,17 (0,85-1,60)	0,331	532,9
<b><i>NLRP1 rs12150220 A/T</i></b>					
<b>Codominante</b>					
<b>A/A</b>	80 (41%)	83 (43%)	1,00		
<b>A/T</b>	91 (47%)	81 (42%)	0,86 (0,56-1,32)	0,618	534,8
<b>T/T</b>	21 (10%)	26 (13%)	1,14 (0,59-2,20)		
<b>Dominante</b>					
<b>A/A</b>	80 (41%)	83 (43%)	1,00	0,647	533,6
<b>A/T-T/T</b>	112 (58%)	107 (56%)	0,91 (0,60-1,37)		
<b>Recessivo</b>					
<b>A/A-A/T</b>	171 (89%)	164 (86%)	1,00	0,501	533,4
<b>T/T</b>	21 (10%)	26 (13%)	1,24 (0,67-2,29)		
<b>Overdominante</b>					
<b>A/A-T/T</b>	101 (52%)	109 (57%)	1,00	0,369	533,0
<b>A/T</b>	91 (47%)	81 (42%)	0,83 (0,55-1,25)		
<b>Log Additive</b>					
<b>0,1,2</b>	192 (50%)	190 (49%)	1,00 (0,74-1,35)	0,992	533,8
<b><i>NLRP1 rs35865013 A/G</i></b>					

<b>Codominante</b>					
<b>G/G</b>	3 (1%)	84 (44%)	1,00		
<b>A/G</b>	161 (83%)	84 (44%)	0,02 (0,01-0,06)	1,895	417,3
<b>A/A</b>	28 (14%)	22 (11%)	0,03 (0,01-0,10)		
<b>Dominante</b>					
<b>G/G</b>	3 (1%)	84 (44%)	1,00	2,885	416,8
<b>A/G-A/A</b>	189 (98%)	106 (55%)	0,02 (0,01-0,06)		
<b>Recessivo</b>					
<b>G/G-A/G</b>	164 (85%)	168 (88%)	1,00	3,887	533,1
<b>A/A</b>	28 (14%)	22 (11%)	0,77 (0,42-1,40)		
<b>Overdominante</b>					
<b>G/G-A/A</b>	31 (16%)	106 (55%)	1,00	3,750	467,4
<b>A/G</b>	161 (83%)	84 (44%)	0,15 (0,10-0,25)		
<b>Log Additive</b>					
<b>0,1,2</b>	192 (50%)	190 (49%)	0,21 (0,13-0,33)	3,519	472,7
<b><i>NLRP3 rs10754558 C/G</i></b>					
<b>Codominante</b>					
<b>C/C</b>	117 (60%)	92 (48%)	1,00		
<b>C/G</b>	65 (33%)	80 (42%)	1,61 (1,05-2,47)	<b>0,030</b>	528,8
<b>G/G</b>	10 (5%)	18 (9%)	2,23 (0,98-5,09)		
<b>Dominante</b>					
<b>C/C</b>	117 (60%)	92 (48%)	1,00	<b>0,011</b>	527,4
<b>C/G-G/G</b>	75 (39%)	98 (51%)	1,69		

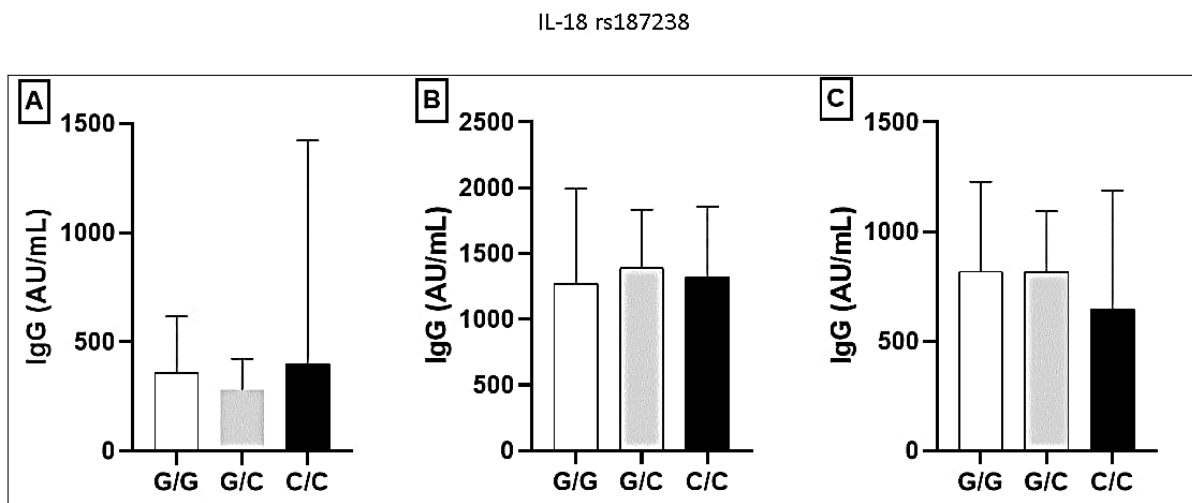


			(1,12-2,55)		
<b>Recessivo</b>					
<b>C/C-C/G</b>	182 (94%)	172 (90%)	1,00	0,130	531,5
<b>G/G</b>	10 (5%)	18 (9%)	1,84 (0,82-4,11)		
<b>Overdomiante</b>					
<b>C/C-G/G</b>	127 (66%)	110 (57%)	1,00	0,073	530,6
<b>C/G</b>	65 (33%)	80 (42%)	1,46 (0,96-2,23)		
<b>Log Additive</b>					
<b>0,1,2</b>	192 (50%)	190 (49%)	1,55 (1,11-2,15)	<b>0,008</b>	526,9
<b>NLRP3 rs10802502 C/T</b>					
<b>Codominante</b>					
<b>C/C</b>	73 (38%)	66 (34%)	1,00		
<b>C/T</b>	95 (49%)	84 (44%)	1,03 (0,65-1,61)	0,108	531,4
<b>T/T</b>	24 (12%)	40 (21%)	1,83 (0,99-3,37)		
<b>Dominante</b>					
<b>C/C</b>	73 (38%)	66 (34%)	1,00	0,407	533,1
<b>C/T-T/T</b>	119 (62%)	124 (65%)	1,19 (0,78-1,82)		
<b>Recessivo</b>					
<b>C/C-C/T</b>	168 (87%)	150 (78%)	1,00	<b>0,035</b>	529,4
<b>T/T</b>	24 (12%)	40 (21%)	1,81 (1,03-3,15)		
<b>Overdominante</b>					
<b>C/C-T/T</b>	97 (50%)	106 (55%)	1,00	0,440	533,2
<b>C/T</b>	95 (49%)	84 (44%)	0,85 (0,57-1,28)		

Log Additive					
			1,28		
<b>0,1,2</b>	192 (50%)	190 (49%)	(0,96-1,71)	<b>0,092</b>	531,0

#### 6.4 Análise de associação entre os genótipos das variantes estudadas e a produção de anticorpos neutralizantes nos tempos 0, 30 e 90 dias após a segunda dose.

A associação entre os genótipos e os níveis de produção de anticorpos neutralizantes, revela que para a variante de *IL18 rs187238*, a produção de anticorpos neutralizantes nos tempos 0, 30 e 90 dias, se manteve independente dos genótipos apresentados para esta variante, e não houve significância estatística nas comparações, conforme demonstrado no gráfico 2.



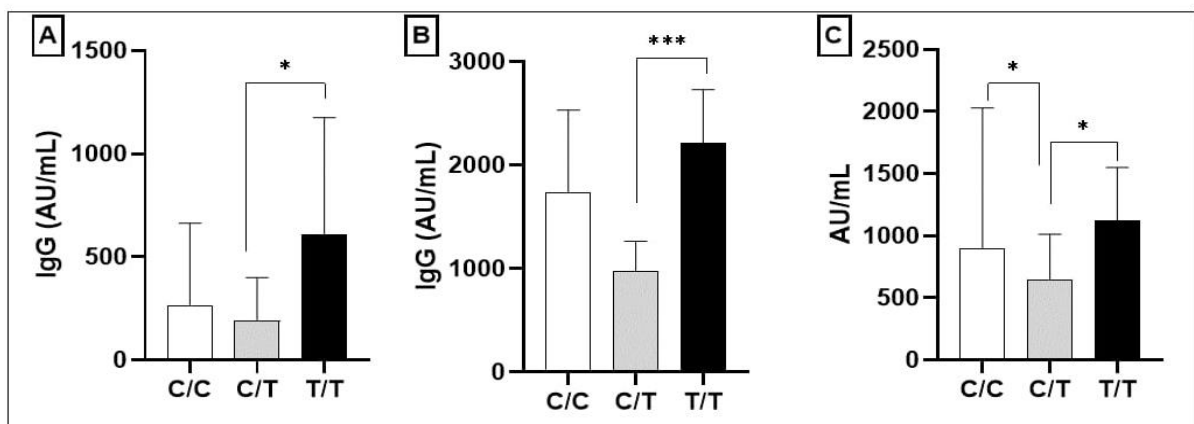
**Gráfico 2:** Razão das medianas de cada tempo A) Tempo 0, B) 30 dias, C) 90 dias e comparação da produção de anticorpos antes e após a vacinação de acordo com a distribuição genotípica do SNV para *IL18 rs187238*. teste de Mann Whitney.

Já para a variante de *IL1B rs16944* a produção de anticorpos neutralizantes nos três tempos apresentou diferenças estatísticas observáveis entre os grupos de indivíduos heterozigotos (C/T) e indivíduos homozigotos (C/C, T/T) nos tempos 0, 30 e 90 dias. No gráfico 3, observamos que no tempo 0 (gráfico A), os indivíduos que apresentaram o genótipo T/T produziram mais anticorpos neutralizantes que os indivíduos com os outros genótipos, havendo diferenças estatísticas significativas entre indivíduos homozigotos para o genótipo T/T em comparação com indivíduos heterozigotos para o genótipo CT, (T/T vs. C/T [ $p=0,039$ ]).

Em 30 dias após a segunda dose da vacina (gráfico B), manteve-se a tendência de aumento de produção de anticorpos neutralizantes para os indivíduos homozigotos, sendo que os indivíduos com homozigose para o genótipo T/T produziram mais anticorpos neutralizantes em comparação com os que apresentaram heterozigose para o genótipo C/T, havendo diferenças estatísticas significativas nas comparações, (T/T vs. C/T [ $p=0,0001$ ]).

Aos 90 dias após a administração da segunda dose (gráfico C), observa-se a diminuição dos títulos de anticorpos, no entanto, os indivíduos com homozigose para os genótipos C/C e T/T mantiveram os níveis de produção de anticorpos neutralizantes acima dos níveis apresentados pelo grupo heterozigoto C/T, havendo diferenças significativas nas comparações, (C/T vs. C/C [ $p=0,049$ ]; T/T vs. C/T [ $p=0,021$ ]). Portanto, o genótipo C/T da variante *IL1B rs19644*, aparenta favorecer uma menor produção de anticorpos neutralizantes nesses indivíduos.

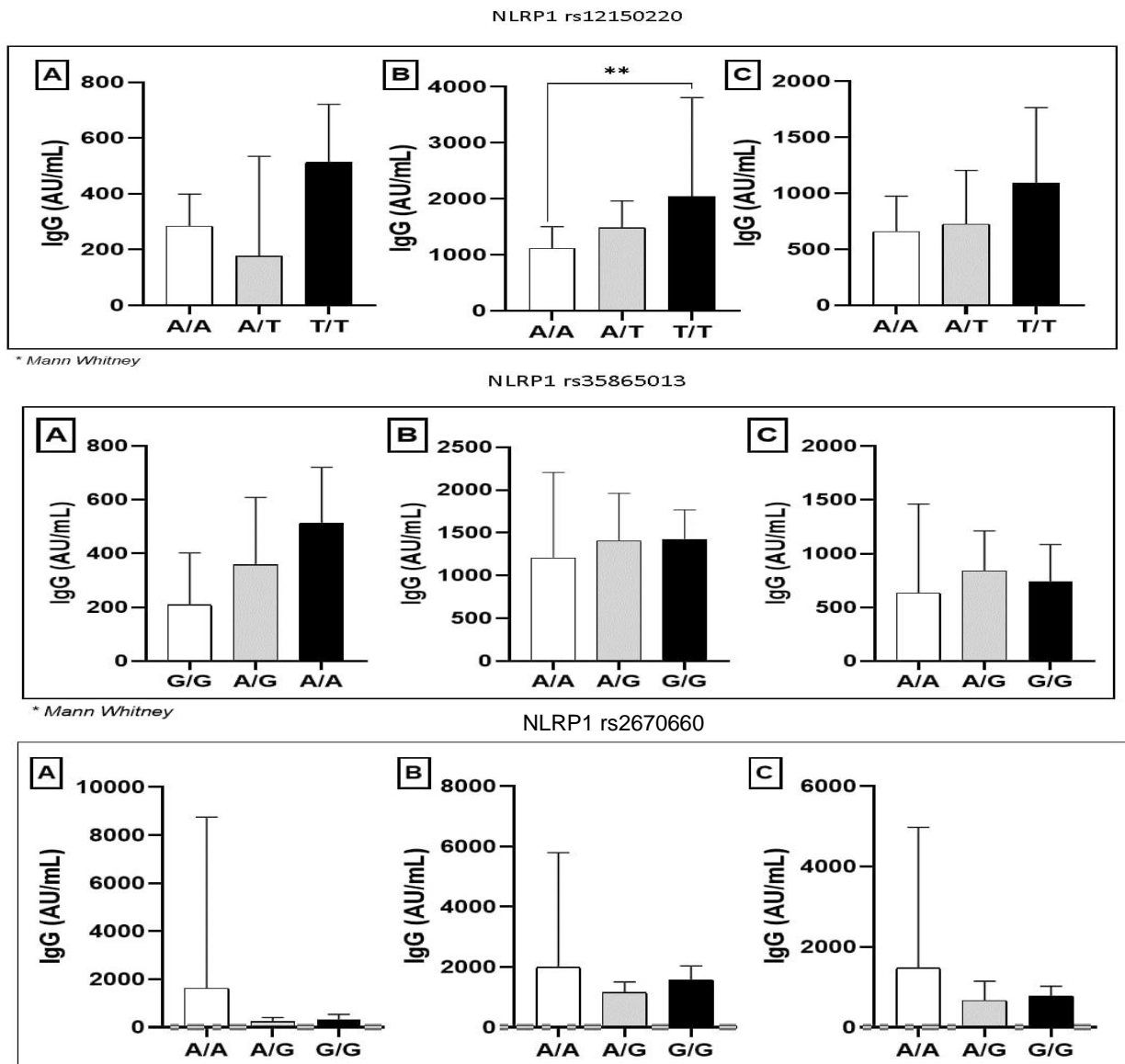
IL-1 BETA rs16944



**Gráfico 3:** Razão das medianas de cada tempo A) Tempo 0, B) 30 dias, C) 90 dias e comparação da produção de anticorpos antes e após a vacinação de acordo com a distribuição genotípica dos SNVs para *IL1B rs19644*. teste de Mann Whitney.

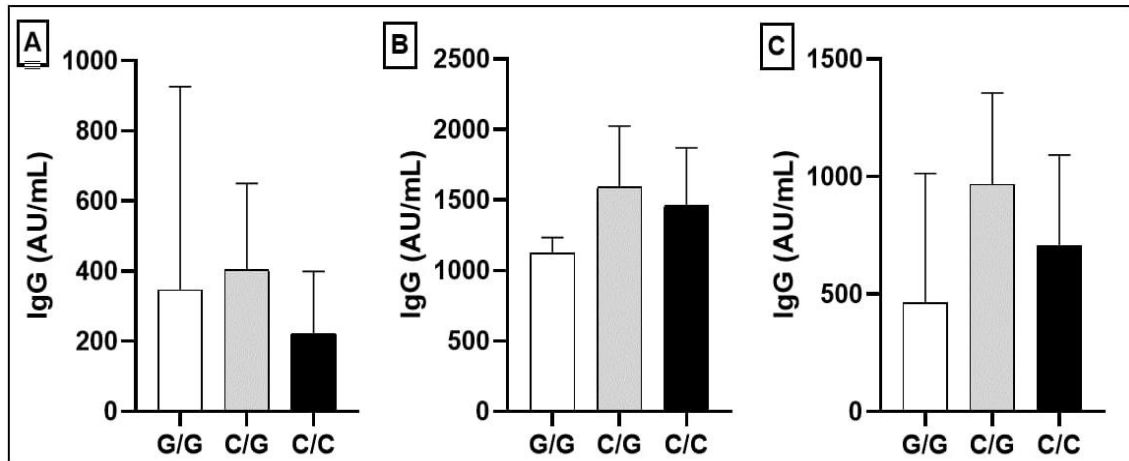
No gráfico 4, após a estratificação dos indivíduos vacinados por genótipo para as variantes de *NLRP1 rs35865013* e *rs2670660*, a produção de anticorpos nos tempos 0, 30 e 90 dias se manteve independente dos genótipos apresentados para essas variantes, não apresentando significância estatística, com exceção da variante de *NLRP1 rs12150220*, em que se observa diferenças entre os genótipos apresentados e a produção de Anticorpos neutralizantes nos tempos 0, 30 e 90 dias. Os indivíduos que apresentaram homozigose para o genótipo T/T produziram mais anticorpos neutralizantes nos três tempos em comparação com

indivíduos homocigotos para o genótipo A/A e essa comparação foi estatisticamente relevante 30 dias após a administração da segunda dose, (T/T vs. A/A [ $p=0,007$ ]). O genótipo *NLRP1* T/T *rs12150220* parece favorecer a produção de anticorpos neutralizantes nesses indivíduos.



**Gráfico 4:** Razão das medianas de cada tempo A) Tempo 0, B) 30 dias, C) 90 dias e comparação da produção de anticorpos antes e após a vacinação de acordo com a distribuição genotípica dos SNVs para *NLRP1* *rs12150220*, *rs35865013*, *rs2670660*. \*teste de Mann Whitney.

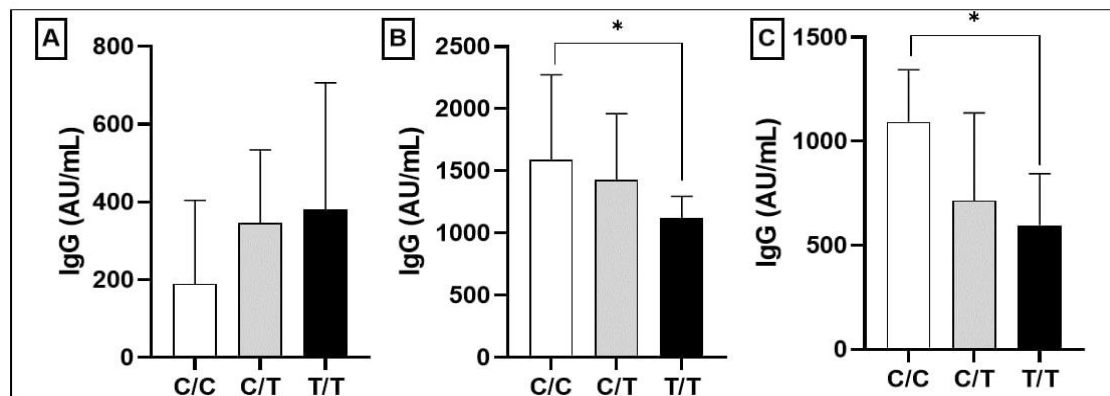
NLRP3 rs10754558



**Gráfico 5:** Razão das medianas de cada tempo A) Tempo 0, B) 30 dias, C) 90 dias e comparação da produção de anticorpos antes e após a vacinação de acordo com a distribuição genotípica dos SNVs para *NLRP3 rs10754558*.

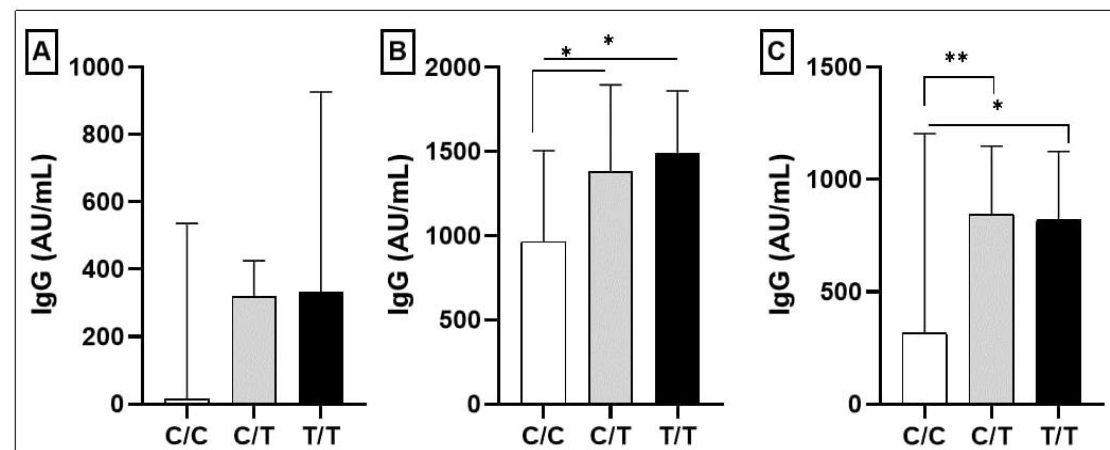
O gráfico 5 demonstra que a produção de anticorpos neutralizantes pelos indivíduos vacinados nos três tempos e estratificados por genótipo se manteve de forma independente dos genótipos apresentados para esta variante de estudo (*NLRP3 rs10754558*), não apresentando significância estatística entre a produção de anticorpo de indivíduos homocigotos ou heterocigotos, antes ou após a vacinação.

NLRP3 rs10802502



\* Mann Whitney

NLRP3 rs3806265



\* Mann Whitney

**Gráfico 6:** Razão das medias de cada tempo A) Tempo 0, B) 30 dias, C) 90 dias e comparação da produção de anticorpos antes e após a vacinação de acordo com a distribuição genotípica dos SNVs para *NLRP3 rs10802502*, *rs3806265*. teste de Mann Whitney.

No gráfico 6, a estratificação dos indivíduos vacinados por genótipo para as variantes de *NLRP3 rs10802502* e *rs3806265* apresentaram significâncias estatísticas entre a produção de anticorpos nos tempos T1(30 dias) e T2 (90 dias) após a vacinação. Sendo que para a variante de *NLRP3 rs10802502* os de indivíduos com genótipo C/C nos tempos 30 e 90 dias produziram mais anticorpos neutralizantes em comparação com os indivíduos com genótipo T/T, onde este último, parece favorecer uma menor produção de anticorpos nesses indivíduos, (T/T vs. C/C [ $p=0,016$ ]); (T/T vs. C/C [ $p=0,032$ ]).

Para a variante de *NLRP3 rs3806265* a produção de anticorpos neutralizantes nos tempos T1 (30 dias) e T2 (90 dias) apresentaram significância estatística entre os grupos de indivíduos heterozigotos (C/T) e indivíduos homozigotos (C/C, T/T) nos tempos 30 e 90 dias, onde é possível observar que no tempo 30 e 90 (gráficos B e C), o grupo de indivíduos com os genótipos C/T e T/T produziram mais anticorpos neutralizantes que os indivíduos homozigotos para o genótipo C/C, portanto, o genótipo C/C parece favorecer uma menor produção de anticorpos neutralizante nos vacinados, (C/C vs. C/T [ $p=0,031$ ]; (T/T vs. C/C [ $p=0,045$ ]); (C/C vs. C/T [ $p=0,009$ ]; (T/T vs. C/C [ $p=0,020$ ]).

## 7. DISCUSSÃO

A COVID-19 é uma doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2, emergida em dezembro de 2019 na China e que foi responsável pela última pandemia que durou mais de dois anos (SILVA et al., 2020). A diversidade de resposta imune à infecção pelo vírus SARS-CoV-2 entre os indivíduos vem sendo atribuída a alguns fatores como, gênero, idade, doenças de base e em parte aos fatores genéticos do hospedeiro (GOLDENBERG, 2020).

Estudos desenvolvidos durante e após o período pandêmico evidenciaram a contribuição desses fatores intrínsecos do indivíduo na evolução, gravidade e desfecho clínico da doença (CARRIJO-CARVALHO, 2020; CARTER-TIMOFTE et al., 2020). Alguns desses achados, apontaram para a associação de variações genéticas de nucleotídeo único em genes da resposta imunológica com a desregulação imune característica dos casos graves de COVID-19 (DUARTE et al., 2022; GIOSU et al., 2022; TIEMI et al., 2023).

No curso clínico desfavorável do processo infeccioso, a inflamação exacerbada torna-

se um dos principais desafios encontrados, pois a desregulação do processo inflamatório leva a liberação excessiva de mediadores químicos como, as citocinas e quimiocinas (MANIK; SINGH, 2022), que promovem a hiperativação e recrutamento de células do sistema imune inato, principalmente, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células NK que mantém um feedback positivo para a manutenção da inflamação, ocasionando graves danos teciduais (VAN DEN BERG; TE VELDE, 2020). Sendo assim, a resposta imune inata e o processo inflamatório exercem um papel fundamental no desenvolvimento, evolução e gravidade da COVID-19.

Dentre os mecanismos inatos que participam da resposta contra o vírus SARS-CoV-2, encontram-se a família de receptores intracelulares do tipo NOD que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que medeiam a formação do complexo inflamatório conhecido como inflamassoma. (BORDALLO et al., 2020; JUNQUEIRA et al., 2021). O complexo inflamassoma são plataformas moleculares multiproteicas que se agrupam no citoplasma da célula em resposta a estímulos exógenos e endógenos gerando a ativação de caspases inflamatórias que culminam na clivagem de pré-formas das citocinas *IL1B* e *IL18* em suas formas ativas, estas por sua vez, medeiam a resposta imune, através da ativação e regulação de mecanismos inatos e adaptativos (ALVES, 2015; KAMADA, 2013)

Os inflamassomas vem sendo amplamente descritos na literatura como associados a diversas doenças infecciosas e não infecciosas (ANDRADE, 2019; SCHRODER; TSCHOPP, 2010; SHARMA; KANNEGANTI, 2021), incluindo a COVID-19, estando bem caracterizada a sua relação com a gravidade da doença, associada à tempestade de citocinas (JUNQUEIRA et al., 2021; RODRIGUES et al., 2020; VAN DEN BERG; TE VELDE, 2020). Alguns desses estudos envolvendo variações genéticas em genes da via de ativação do complexo inflamassoma e seu papel na infecção por COVID-19, demonstraram que variantes em genes tanto das citocinas liberadas pelos inflamassomas (*IL1B* e *IL18*) quanto receptores intracelulares (*NLRP1* e *NLRP3*), exerciam uma associação positiva ou negativa no desfecho clínico da doença (DUARTE et al., 2022; GIOSU et al., 2022; TIEMI et al., 2023), no entanto, possíveis relações das variações genéticas com a resposta imune mediada pela vacina contra a COVID-19 ainda é desconhecida.

Em nossa população de estudo, analisamos 8 SNVs em componentes do complexo inflamassoma e a possível associação com a resposta imune mediada pela vacina contra a COVID-19 e observamos o aumento e manutenção da produção de anticorpos neutralizantes associado aos polimorfismo para *IL1B rs16944* genótipo T/T, *NLRP1 rs12150220* genótipo

T/T, *NLRP3 rs10802502* genótipo C/C, *rs3806265* genótipo C/T e T/T, enquanto os genótipos C/T *IL1B rs16944*, A/A *NLRP1 12150220*, T/T *NLRP3 10802502* e C/C *3806265* parecem favorecer uma menor produção de anticorpos em indivíduos imunizados com duas doses da CoronaVac, indicando possível influência de algumas dessas variações genéticas já previamente associadas a suscetibilidade ou proteção contra a COVID-19 em outros estudos, na resposta imune vacinal. (DUARTE et al., 2022; GIOSU et al., 2022; MAES et al., 2022; NEIRA-GOULART et al., 2023; TIEMI et al., 2023)

A citocina *IL1B* é um mediador pró-inflamatória que atua na resposta imunológica contra diversas patologias que variam de infecciosas a não infecciosas como, processos inflamatórios ou injúrias teciduais e infecções diversas, a citocina em sua pré forma é processada pela ativação do complexo inflamassoma através da atuação da caspase-1 (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002). A produção da citocina *IL1B* associada a variações genéticas em genes da via do inflamassoma vem sendo relacionado na literatura a suscetibilidade, desenvolvimento, gravidade ou proteção de enfermidades como o câncer, lúpus eritematoso, diabetes tipo II, artrite reumatoide, COVID-19, hepatite B entre outras (ALVES, 2015; BORDALLO et al., 2020; PONTILLO, 2014).

Estudos conduzidos tanto no Brasil, quanto em outras partes do mundo, evidenciaram que a variação genética da citocina *IL1B rs16944 (-511 T>C)* está associado ao aumento da produção dessa citocina pró-inflamatória em diferentes doenças, incluindo a COVID-19, elevando o risco de desenvolvimento e agravamento dessas enfermidades (ALVES, 2015; CAPOBIANCO et al., 2020; GIOSU et al., 2022; HIRANKARN et al., 2006; SCOLA et al., 2022).

Em um estudo de Yue Wang e colaboradores (2003), foi demonstrado que o haplótipo C/T de *IL1B rs16944 -511* estava associado a presença de carcinoma hepato celular em indivíduos portadores de HCV crônico. Já Fischer e colaboradores (2022) demonstraram que indivíduos com HBV que possuíam o genótipo C/C eram mais propensos a adquirir cirrose hepática. Da mesma forma, Balzanelli e colaboradores (2022) demonstraram que o genótipo T/T, desempenha uma ação de proteção na infecção por COVID-19, enquanto o genótipo C/T foi associado a suscetibilidade a doença. Abadi e colaboradores (2023) encontraram associação de risco para a infecção pelo vírus SARS-CoV-2 em indivíduos portadores do genótipo A/G para a variante *IL1 B rs16944 -31*, enquanto Apriningsih e colaboradores (2023) correlacionaram o genótipo G/G da variante de *IL1 B rs16944 -31* com proteção a gravidade da doença e o genótipo AG como um fator de risco para o desenvolvimento das formas graves da COVID-19.



Em um estudo de Capobianco e colaboradores (2020) observaram que indivíduos naturalmente infectados com *Plasmodium vivax* e que eram portadores do genótipo C/C da variante *IL1B rs16944 -511* apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes maiores para a proteína circunsporozoíta do *Plasmodium vivax*.

Em nossa coorte o genótipo T/T para a variante *IL1B rs16944 -511* foi associado com uma maior capacidade de produção de anticorpos neutralizantes em indivíduos imunizados com a CoronaVac, em comparação com indivíduos do genótipo C/T, podendo indicar que indivíduos que possuam essa variação genética podem responder diferentemente aos estímulos vacinais contra a COVID-19.

É no cromossomo 2q14 que se encontra o gene codificante da citocina *IL1B*, esse gene apresenta uma diversidade de variações de nucleotídeo único, dentre estas, se encontra a variante *IL1B rs16944* que está situado na região promotora podendo atuar de forma significativa na interação entre as proteínas de DNA, repercutindo na produção de *IL1B* (CAPOBIANCO et al., 2020). Essa variação vem sendo descrita na literatura como associado a suscetibilidade ou proteção em diversas doenças, principalmente devido a uma maior produção desta citocina (GIOSU et al., 2022)

Outra importante citocina também secretada pelo complexo inflamassoma é a *IL18*, cuja ação atua tanto sobre mecanismos inatos, como adaptativos. Na COVID-19, o aumento dessa citocina foi relacionado a tempestade de citocinas e mal prognóstico da doença. (TIEMI et al., 2023). Em nossa coorte, não encontramos nenhuma associação da variante de *IL18 rs187238* com a produção de anticorpos neutralizantes dos indivíduos vacinados, contudo, em um estudo realizado por Tiemi e colaboradores (2023), a variante *IL18 rs187238 -137 C>G* foi associada com a gravidade da COVID-19, onde sugerem que essa variante pode modular a produção de *IL18* e respostas imunes mediadas por células Th1, já que em outro estudo (GIEDRAITIS et al., 2001), esse polimorfismo localizado na região promotora também foi associados com uma diminuição da produção dessa citocina.

O inflamassoma *NLRP1* está presente em diversas células do sistema imune, incluindo macrófagos e monócitos, a maneira como esse complexo inflamatório é ativado pelo vírus SARS-CoV-2, não está muito bem caracterizada, no entanto, estudos apoiam que esse receptor intracelular atua como um sensor de proteases do vírus como a NSP5 resultando na sua ativação (DUARTE et al., 2022).

A variante genética de *NLRP1 rs12150220* que é uma variante missense com ganho de função, conhecida por aumentar o processamento de *IL1B* (PONTILLO, 2014), foi associada a predisposição a doenças como lúpus eritematoso, vitiligo (PONTILLO et al., 2012;

WESTHOFF et al., 2021), bem como, a gravidade da COVID-19 em um estudo de Leal e colaboradores (2022), em que o genótipo T/T era mais frequente em indivíduos com quadros graves da doença. Em nossa coorte encontramos associação entre o genótipo *NLRP1* T/T *rs12150220* com a produção de anticorpos neutralizantes em indivíduos imunizados com a CoronaVac, podendo esta variante, estar contribuindo para o aumento e manutenção da produção de anticorpos neutralizantes nesses indivíduos.

Já para as demais variações genética de *NLRP1* *rs35865013*, *rs2670660* não encontramos associação com a produção de anticorpos neutralizantes, no entanto, a variante de *NLRP1* *rs2670660* que ocorre na região promotora, foi associada em outros estudos a suscetibilidade ou risco para doenças como Vitiligo, Lupus eritematoso, Diabetes Tipo I e outras doenças autoimunes por poder induzir uma expressão modificada do receptor e consequentemente elevar a produção de *IL1B* e *IL18*. (PONTILLO et al., 2012; SUN et al., 2019; WESTHOFF et al., 2021).

Em nossa coorte as variantes de *NLRP3* *rs10802502* genótipo C/C e *rs3806265* genótipo C/T e T/T foram associados a uma maior produção de anticorpos neutralizantes nos indivíduos vacinados. Ainda não há estudos que confirmem a associação da variante *NLRP3* *rs10802502* com a doença COVID-19 ou outras doenças infecciosas e não infecciosas.

Já a variante de *NLRP3* *rs3806265* foi associada a doenças autoimunes em alguns estudos, (HANAIE et al., 2017; IMANI et al., 2018; SLEZAKOVA et al., 2018). Em um estudo de Sun e colaboradores (2022), essa variante foi associada ao título de anticorpos descarboxilase de ácido glutâmico (GADA), em que pacientes chineses com o genótipo C/C apresentaram títulos de GADA mais elevados do que pacientes com o genótipo T/T, indicando que essa variação genética pode influenciar na ativação do inflamassoma de *NLRP3* aumentando a produção das citocinas *IL1B* e *IL18*, podendo consequentemente atuar nas respostas de células T e B, (SUN et al., 2022).

Já para a variante de *NLRP3* *rs10754558* não encontramos associação estatisticamente significativa entre os genótipos e a produção de anticorpos nos indivíduos vacinados, contudo, em um estudo de Maes e colaboradores (2022), indivíduos com COVID-19 que apresentaram o genótipo G/G eram mais suscetíveis ao agravamento da doença, em relação aos indivíduos que apresentaram os demais genótipos. Igualmente em um estudo de Goulart e colaboradores (2022), indivíduos com COVID-19 portadores do genótipo G/G desta mesma variante estavam mais propensos a progressão da doença e óbito, indicando que a variante de *NLRP3* *rs10754558* estaria associada a gravidade clínica da COVID-19.

Os NLRs são essenciais na resposta hospedeiro contra processos infecciosos e estéreis,

atuando como sensores intracelulares capazes de reconhecer PAMPs e DAMPs (RODRIGUE-GERVAIS; SALEH, 2010), estando diretamente envolvidos na formação do complexo inflamassoma e conseqüentemente na ativação, regulação e modulação de respostas imunes inatas e adaptativas, através da maturação e liberação das citocinas *IL1B* e *IL18* (SATIŞ et al., 2021). As citocinas *IL1B* e *IL18* podem atuar diretamente ou indiretamente na ativação, proliferação e regulação de células T e B, ou induzindo a produção de citocinas como *TNF-alfa* e *IL2* que também atuam na diferenciação de células T helper principalmente (ZALINGER; ELLIOTT; WEISS, 2017). Estudos indicam que a citocina *IL18* desempenha um papel importante na regulação da produção de anticorpos por induzir a produção de citocinas que levam a polarização de células T auxiliar para fenótipo Th2 (RODRIGUES et al., 2020) Já a citocina *IL1B* desempenha um papel na regulação de células Th foliculares, podendo exercer influência nas respostas de células B.

A resposta imune vacinal contra a COVID-19 apresenta uma variação interindividual e não está muito bem elucidado quais fatores influenciariam nessa diferença de resposta imune apresentada pelos indivíduos imunizados (FILHO et al., 2022). No entanto é conhecido que as respostas imunes mediadas por vacinas de modo geral podem ser influenciadas por diversos fatores que abrangem desde a tecnologia utilizada pelo imunizante, á fatores ambientais e intrínsecos do hospedeiro (SANTOS FILHO; VIEIRA, 2021). Os estudos presentes na literatura sobre as variações genéticas e COVID-19, evidenciam a influência que o background genético do indivíduo pode exercer no desfecho clínico da doença através da possível modulação da resposta imune, (CARTER-TIMOFTE et al., 2020; MAES et al., 2022; NEIRA-GOULART et al., 2023; NIEMI et al., 2021), portanto, é evidente que os polimorfismos em genes do complexo inflamassoma podem influenciar na regulação da resposta imune e conseqüentemente na produção de anticorpos, podendo afetar a capacidade dos receptores de reconhecer os antígenos vacinais e induzir respostas imunes inatas adequadas ou afetar a produção das citocinas pró-inflamatórias que por consequência, repercute na resposta imune induzida pelo imunizante, sendo assim, relevante a investigação de fatores genéticos em genes da resposta imunológica que possam desempenhar um papel modulador da resposta imune humoral e celular de indivíduos vacinados podendo estar associados a eficácia da vacina.

As limitações deste estudo incluem principalmente três aspectos. Por um lado, nosso tamanho amostral não foi representativo para mensurar o envolvimento dessas variações genéticas com a eficácia da vacina. Não foi possível avaliar os níveis das citocinas *IL1B* e *IL18* nos indivíduos imunizados para apoiar a associação dos SNVs com os níveis de

anticorpos neutralizantes. Por outro lado, os parâmetros utilizados para avaliar a resposta imune adaptativa desencadeada pela vacina se limitou a avaliação da resposta humoral produzida, sendo necessário estudos que incluam esses três aspectos para uma melhor caracterização da resposta imune induzida pelo imunizante e possíveis associações das variações genéticas em genes do inflamassoma e suas influências na eficácia da vacina CoronaVac.

## CONCLUSÃO

Este estudo foi o pioneiro em descrever a frequência dos polimorfismos nos genes inflamassoma em profissionais da saúde imunizados com a CoronaVac no Amazonas e a associação desses com a resposta imune mediada pela vacina. As variantes *IL1B rs16944*, *NLRP1 rs12150220*, *NLRP3 rs10802502*, *rs3806265* foram associadas com a produção de anticorpos neutralizantes em indivíduos vacinados com a CoronaVac no Amazonas, evidenciando que essas variações genéticas podem desempenhar um papel significativo na resposta imune à vacina contra a COVID-19. Os resultados deste trabalho podem ajudar a compreender como os fatores genéticos do indivíduo podem influenciar na resposta aos imunizantes, servindo de base para a possível necessidade de elaboração de estratégias de imunização personalizadas para aprimorar a eficácia da vacina levando em conta a diversidade genética dos indivíduos.

Todavia, enfatizamos a necessidade de estudos posteriores para melhor caracterizar a resposta imune mediada pelo imunizante, bem como elucidar a influências dessas variações genéticas na eficácia da vacina contra a COVID-19.

## REFERÊNCIAS

1. ABBAS, A. K. *Imunologia Celular e Molecular*. p. 1–23, 2016.
- ALVES, F. S. Genetic polymorphisms of inflammasome genes associated with acute lymphoblastic leukemia and clinical prognosis in the Brazilian Amazon. p. 1–23, 2020.
- ALVES, H. L. Polimorfismos e expressão de genes codificantes das proteínas do inflamassoma em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. 2015.
- ANDRADE, M. B. Avaliação de polimorfismos de base única (snp) em genes do inflamassoma e componentes relacionados em pacientes com tuberculose. v. 1, n. 1, p. 41–57, 2019.
- AZEVEDO, H. revisão de literatura – covid-19 e sars-cov-2. v. 2, 2020.
- BAUERNFEIND, F. G. et al. Cutting Edge: NF- $\kappa$ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *The Journal of Immunology*, v. 183, n. 2, p. 787–791, 2009.
- BENOTMANE, I.; BRUEL, T. A fourth dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine improves serum neutralization against the delta variant in kidney transplant recipients. p. 1–12, 2021.
- BORDALLO, B. et al. Severe COVID-19: What have we learned with the immunopathogenesis? *Advances in Rheumatology*, v. 60, n. 1, 2020.
- BORGES, A. A. SARS-CoV-2: origem, estrutura, morfogênese e transmissão. *Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais*, p. 1–21, 2020.
- BOST, P. et al. Deciphering the state of immune silence in fatal COVID-19 patients. *Nature Communications*, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2021.
- BRODIN, P. Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity. *Nature Medicine*, v. 27, n. 1, p. 28–33, 2021.
- CALLAWAY, E. Could new COVID variants undermine vaccines? Labs scramble to find out. *Nature*, v. 589, n. 7841, p. 177–178, 2021a.
- CALLAWAY, E. COVID super-immunity: one of the pandemic’s great puzzles. *Nature*, v. 598, n. 7881, p. 393–394, 2021b.
- CAPOBIANCO, M. et al. Polimorfismo na IL-1 $\beta$ promotor está associado à resposta de anticorpos IgG a repetições de proteínas circunsporozoítas de *Plasmodium vivax*. p. 858–865, 2020.
- CARRIJO-CARVALHO, L. C. fatores imunológicos e genéticos na covid-19

immunological. p. 1–23, 2020.

CARTER-TIMOFTE, M. E. et al. Deciphering the Role of Host Genetics in Susceptibility to Severe COVID-19. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 1–14, 2020.

CASANOVA, JEAN-LAURENT, C. SU, H. A Global Effort to Define the Human Genetics of Protective Immunity to SARS-CoV-2 Infection. *Ann Oncol*, n. January, p. 19–21, 2020.

CLÍNICAS, S. B. DE A. A pandemia de COVID-19 e os desafios futuros. v. 53, 2021.

CONCEIÇÃO, L. E. Estudo do polimorfismo dos genes das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL1 $\beta$  dos receptores tipo Toll 2 e 4 em voluntários sadios revacinados com BCG [manuscrito]. 2013.

CORMAN, V. M. et al. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. n. January, 2018.

DA SILVA, C. C. et al. Covid-19: Aspectos da origem, fisiopatologia, imunologia e tratamento - uma revisão narrativa. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 13, n. 3, p. e6542, 2021.

DEVAUX, CHRISTIAN A, J.-M. R. ACE2 receptor polymorphism: Susceptibility to SARS-CoV-2, hypertension, multi-organ failure, and COVID-19 disease outcome. *Ann Oncol*, v. 7, n. May, p. 19–21, 2020.

DOREMALEN, VAN. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *The New England Journal of Medicine*, p. 0–3, 2020.

DUARTE, A. J. S. et al. A common variant close to the “tripwire” linker region of NLRP1 contributes to severe COVID - 19. *Inflammation Research*, n. 0123456789, 2022.

FILHO, A. DE S. V. et al. Vacinas para Covid-19: Uma revisão de literatura / Covid-19 Vaccines: A Literature Review. *Brazilian Journal of Development*, v. 8, n. 1, p. 1880–1901, 2022.

FORTHAL, D. Adaptive immune responses to SARS-CoV-2. n. January, 2021.

FRICKE-GALINDO, I.; FALFÁN-VALENCIA, R. Genetics Insight for COVID-19 Susceptibility and Severity: A Review. *Frontiers in Immunology*, v. 12, n. April, p. 1–11, 2021.

GIEDRAITIS, V. et al. Cloning and mutation analysis of the human IL18 promoter : a possible role of polymorphisms in expression regulation. v. 112, p. 146–152, 2001.

GIOSU, M. et al. Analysis of Gene Single Nucleotide Polymorphisms in COVID-19 Disease Highlighting the Susceptibility and the Severity towards the Infection. v. 2, 2022.

GÓES, L. G. B. Caracterização molecular de coronavírus humano. n. Ic, p. 2011,

2012.

GOLDENBERG, S. Aspectos genéticos da patogênese e suscetibilidade à COVID-19. p. 0–12, 2020.

GONDIM, L. N. et al. The genomic discoveries of SARS-CoV-2 and their implications for the COVID-19 pandemic. *J. Health Biol Sci*, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2020.

GRÄF, T. Diversidade dos coronavírus, origem e evolução do SARS-CoV-2. Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais, p. 0–19, 2020.

HANAEI, S. et al. Association of NLRP3 single nucleotide polymorphisms with ulcerative colitis: A case-control study. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, v. 42, n. 3, p. 269–275, 2017.

HELMY, Y. A. et al. The COVID-19 pandemic: A comprehensive review of taxonomy, genetics, epidemiology, diagnosis, treatment, and control. *Journal of Clinical Medicine*, v. 9, n. 4, 2020.

HIRANKARN, N. et al. Interleukin-1 $\beta$  gene polymorphism associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus infection. v. 12, n. 5, p. 776–779, 2006.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, v. 181, n. 2, p. 271- 280.e8, 2020.

IMANI, D. et al. Association of nod-like receptor protein-3 single nucleotide gene polymorphisms and expression with the susceptibility to relapsing–remitting multiple sclerosis. *International Journal of Immunogenetics*, v. 45, n. 6, p. 329–336, 2018.

JEEWANDARA, C. et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 Infection in the Colombo Municipality Region, Sri Lanka. *Frontiers in Public Health*, v. 9, n. November, p. 1–6, 2021.

JUNQUEIRA, C. et al. SARS-CoV-2 infects blood monocytes to activate NLRP3 and AIM2 inflammasomes, pyroptosis and cytokine release. medRxiv, p. 2021.03.06.21252796, 2021.

KAMADA, A. J. Caracterização funcional e imunogenética do inflamassoma na infecção pelo HIV-1 Caracterização funcional e imunogenética do inflamassoma na infecção pelo HIV-1. Dissertação, 2013.

KIMBALL, A. et al. Asymptomatic and Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections in Residents of a Long-Term Care Skilled Nursing Facility — King County, Washington, March 2020. *Morbidity and Mortality Weekly Report Summary*, CDC, v. 69, n. 13, p. 377–381, 2020.

KUPFERSCHMIDT, K.; WADMAN, M. Delta variant triggers new phase in the pandemic. *Science*, v. 372, n. 6549, p. 1375–1376, 2021.

LI, Q. et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *New England Journal of Medicine*, v. 382, n. 13, p. 1199–1207, 2020.

LI, W. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. v. 426, n. NOVEMBER, 2003.

LIU X, S. R. S. A. Status of Humoral and Cellular Immune Responses within 12 months Following CoronaVac Vaccination against COVID-19. v. 09, n. 5, p. 7352–7363, 2021.

LOPES CONCEIÇÃO, E. Estudo do polimorfismo dos genes das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL1 $\beta$  dos receptores tipo Toll 2 e 4 em voluntários sadios revacinados com BCG. p. 8921, 2010.

MAES, M. et al. In COVID-19, NLRP3 inflammasome genetic variants are associated with critical disease and these effects are partly mediated by the sickness symptom complex: a nomothetic network approach. *Molecular Psychiatry*, v. 27, n. 4, p. 1945–1955, 2022.

MANIK, M.; SINGH, R. K. Role of toll-like receptors in modulation of cytokine storm signaling in SARS-CoV-2-induced COVID-19. *Journal of Medical Virology*, v. 94, n. 3, p. 869–877, 2022.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . *Molecular Cell*, v. 10, n. 2, p. 417–426, 2002.

MODERBACHER, C. et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*, v. 183, n. 4, p. 996–1012.e19, 2020.

MOURA, E. C. et al. Disponibilidade de dados públicos em tempo oportuno para a gestão: análise das ondas da COVID-19. *SciELO Preprints*, 2021.

NEIRA-GOULART, M. et al. Inflammasome genes polymorphisms are associated with progression to mechanical ventilation and death in a cohort of hospitalized COVID-19 patients in a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Gene*, v. 865, n. January, 2023.

NIEMI, M. E. K. et al. Mapping the human genetic architecture of COVID-19. *Nature*, v. 600, n. 7889, p. 472–477, 2021.

OVSYANNIKOVA, I. G. Rubella vaccine-induced cellular immunity: evidence of associations with polymorphisms in the Toll-like, vitamin A and D receptors, and innate immune response genes. *Bone*, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2014.



ÖZTÜRK, R.; TAŞOVA, Y.; AYAZ, A. Covid-19: Pathogenesis, genetic polymorphism, clinical features and laboratory findings. *Turkish Journal of Medical Sciences*, v. 50, n. SI-1, p. 638–657, 2020.

PADOAN, A. et al. IgA-Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A longitudinal study. *Clinica Chimica Acta*, v. 507, n. April, p. 164–166, 2020.

PALÚ, I. D. A. A virologia do Sars-CoV-2. *Connection Line - Revista Eletrônica Do Univag*, v. 0, n. 25, 2021.

PEREIRA DA CRUZ, A.; TOMÉ, S. L. K. A. principais aspectos do novo coronavírus sars-cov-2: uma ampla revisão. *Arquivos do Mudi*, v. 25, n. 1, p. 73–90, 2021.

PIMENTEL, R. M. M. et al. A disseminação da covid-19: um papel expectante e preventivo na saúde global. *Journal of Human Growth and Development*, v. 30, n. 1, p. 135–140, 2020.

PLANAS, D. et al. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*, v. 596, n. 7871, p. 276–280, 2021.

PONTILLO, A. et al. Polimorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, v. 45, n. 4, p. 271–278, 2012.

PONTILLO, A. NLRP3 polymorphism is associated with protection against human T-lymphotropic virus 1 infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 7, p. 1–4, 2014.

R. FEHR ANTHONY, P. S. Coronavírus: uma visão geral de sua replicação e patogênese. *Coronaviruses: Methods and Protocols*, v. 1282, n. 1, p. 1–282, 2015.

RAJAMÄKI, K. et al. Extracellular acidosis is a novel danger signal alerting innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 19, p. 13410–13419, 2013.

RODRIGUE-GERVAIS, I. G.; SALEH, M. Genetics of inflammasome-associated disorders: A lesson in the guiding principals of inflammasome function. *European Journal of Immunology*, v. 40, n. 3, p. 643–648, 2010.

RODRIGUES, T. S. et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-cov-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *Journal of Experimental Medicine*, v. 218, n. 3, 2020.

ROUJIAN LU, XIANG ZHAO. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, v. 395, n. 22, p. 565–574, 2020.

SABINO, E. C. et al. Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. *The Lancet*, v. 397, n. 10273, p. 452–455, 2021.

SANTOS, A. A. R. et al. Diferentes aspectos da resposta imunológica na COVID-19. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 14, p. e423101422531, 2021.

SANTOS FILHO, A.; VIEIRA, L. Covid-19: imunidade natural e vacinal. v. 07, n. MD, p. 1–6, 2021.

SATIŞ, H. et al. Cytokine Prognostic value of interleukin-18 and its association with other inflammatory markers and disease severity in COVID-19. *Cytokine*, v. 137, n. August 2020, p. 155302, 2021.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasomes. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 821–832, 2010.

SCOLA, L. et al. IL-1 Superfamily Member ( IL-1A , IL-1B and IL18 ) Genetic Variants Influence Susceptibility and Clinical Course of Mediterranean Spotted Fever. 2022.

SEKINE, T. et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*, v. 183, n. 1, p. 158- 168.e14, 2020.

SHANG, J. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Physiology & behavior*, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2020.

SHARMA, B. R.; KANNEGANTI, T. D. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases. *Nature Immunology*, v. 22, n. 5, p. 550–559, 2021.

SHEREEN, M. A. et al. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*, v. 24, p. 91–98, 2020.

SILVA, C. A. et al. imunopatogênese no desenvolvimento da covid-19. p. 85–102, 2021.

SILVA, J. D. DA et al. Covid-19: A chave é o Sistema Imune. *Sociedade Brasileira de Imuologia*, v. 19, 2020.

SLEZAKOVA, S. et al. Association of the NOD-like receptor 3 (NLRP3) gene variability with recurrent aphthous stomatitis in the Czech population. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 47, n. 4, p. 434–439, 2018.

SOARES BRANDÃO, S. C.; GODOI, E. T. a. covid-19: imunidade, endotélio e coagulação. [s.l: s.n.].

SOUSA CARVALHO; DÂMARIS, C. Resposta imunológica contra o SRAS-CoV-2: uma revisão entre a resposta do hospedeiro e o vírus. v. 21, n. 1, p. 1–9, 2020.

SOUTH, A. M. et al. Controversies of renin–angiotensin system inhibition during the COVID-19 pandemic. *Nature Reviews Nephrology*, v. 16, n. 6, p. 305–307, 2020.

STAWISKI, E. W. et al. Human ACE2 receptor polymorphisms predict SARS-CoV-2 susceptibility. *bioRxiv*, 2020.

SUN, X. et al. Polymorphisms in NLRP1 Gene Are Associated with Type 1 Diabetes. *Journal of Diabetes Research*, v. 2019, 2019.

SUN, X. et al. rs3806265 and rs4612666 of the NLRP3 Gene Are Associated With the Titer of Glutamic Acid Decarboxylase Antibody in Type 1 Diabetes. *Frontiers in Endocrinology*, v. 13, n. April, p. 1–7, 2022.

TANRIOVER, M. D. Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial in Turkey. n. January, p. 19–21, 2021.

TIEMI, M. et al. Protective effects of IL18-105G > A and IL18-137C > G genetic variants on severity of COVID-19. p. 1–15, 2023.

TORAIH, E. A. et al. Hidden in plain sight: The effects of BCG vaccination in the COVID-19 pandemic. *Journal of Medical Virology*, v. 93, n. 4, p. 1950–1966, 2020.

TURNER, J. S. et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce persistent human germinal centre responses. v. 596, n. 7870, p. 109–113, 2021.

VABRET, N. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. n. January, p. 19–21, 2020.

VAN DEN BERG, D. F.; TE VELDE, A. A. Severe COVID-19: NLRP3 Inflammasome Dysregulated. *Frontiers in Immunology*, v. 11, n. June, p. 1–6, 2020.

VIEIRA, L. M. F.; EMERY, E.; ANDRIOLO, A. COVID-19-Diagnóstico Laboratorial para Clínicos. *Universidade Federal de São Paulo*, v. 1, n. 1, p. 1–19, 2021.

WALLS, A. C. et al. Estrutura , função e antigenicidade da glicoproteína com pico de SARS-CoV-2. 2020.

WASTOWSKI, I. J.; DONADI, E. *Imunologia Básica para o Clínico*. n. March 2009, 2014.

WEI, Y. et al. Estimation of Vaccine Effectiveness of CoronaVac and BNT162b2 Against Severe Outcomes Over Time Among Patients With SARS-CoV-2 Omicron. *JAMA Network Open*, v. 6, n. 2, p. 1–13, 2023.

WESTHOFF, L. J. et al. IL18 Overproduction Associated with NLRP1 Single Nucleotide Polymorphisms Linked to Risk for Vitiligo. *International Journal of Clinical & Experimental Dermatology*, v. 6, n. 2, 2021.

ZALINGER, Z. B.; ELLIOTT, R.; WEISS, S. R. Role of the inflammasome-related cytokines Il-1 and IL18 during infection with murine coronavirus. *Journal of NeuroVirology*,

v. 23, n. 6, p. 845–854, 2017.

ZHANG, J.; ZHAO, C.; ZHAO, W. Virus Caused Imbalance of Type I IFN Responses and Inflammation in COVID-19. *Frontiers in Immunology*, v. 12, n. April, p. 1–9, 2021.

ZHANG, R. et al. Identifying airborne transmission as the dominant route for the spread of COVID-19. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 117, n. 26, p. 14857–14863, 2020.

ZHENG, M. et al. TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nature Immunology*, v. 22, n. 7, p. 829–838, 2021.

BALZANELLI MG, Distratis P, Lazzaro R, Pham VH, Tran TC, Dipalma G, Bianco A, Serlenga EM, Aityan SK, Pierangeli V, Nguyen KCD, Inchingolo F, Tomassone D, Isacco CG. Analysis of Gene Single Nucleotide Polymorphisms in COVID-19 Disease Highlighting the Susceptibility and the Severity towards the Infection. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Nov 16;12(11):2824. doi: 10.3390/diagnostics12112824. PMID: 36428884; PMCID: PMC9689844.

ABADY, N. R.; Alkhafaji, Z. A.; Baay, A. S. Polymorphisms in the inter leukin-1 beta gene (rs16944 and rs1143627) as a risk factor for SARS-COV2 infection; 2776, 2023.

ELHABYAN A, ELYAACOUB S, Sanad E, Abukhadra A, Elhabyan A, Dinu V. The role of host genetics in susceptibility to severe viral infections in humans and insights into host genetics of severe COVID-19: A systematic review. *Virus Res*. 2020 Nov;289:198163. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198163. Epub 2020 Sep 9. PMID: 32918943; PMCID: PMC7480444.

## APÊNDICE

### Apêndice 01. Equipe do projeto

EQUIPE DE PESQUISA			
Nome	Formação Acadêmica	Instituição	Contato
Dra. Adriana Malheiro Alle Marie	PhD	UFAM	<a href="mailto:malheiroadriana@yahoo.com.br">malheiroadriana@yahoo.com.br</a>
Dr. Walter Luiz Lima Neves	Pós Doc	UFAM	<a href="mailto:neveswlln@gmail.com">neveswlln@gmail.com</a>
Juliana Miranda da Silva	Mestrado	UFAM	<a href="mailto:juliana_miranda.ds@outlook.com">juliana_miranda.ds@outlook.com</a>
Wesley Barbosa de Castro	Mestrado	UFAM	<a href="mailto:wesleybarbosah@gmail.com">wesleybarbosah@gmail.com</a>
Larissa Nunes	Mestrado	PPGH	<a href="mailto:larissa.nunez0210@gmail.com">larissa.nunez0210@gmail.com</a>
Dr. Allyson Guimarães da Costa	PhD	UFAM	<a href="mailto:allyson.gui.costa@gmail.com">allyson.gui.costa@gmail.com</a>
Andrea Monteiro TarragÔ	PhD	PPGH	<a href="mailto:andrea_s_monteiro@hotmail.com">andrea_s_monteiro@hotmail.com</a>

## Apêndice 02. Protocolos PCR-RFLP e GEL DE AGAROSE IL1Be IL18

**1. POLIMORFISMO rs16944 IL1B- Reação em Cadeia de Polimerase (PCR):**

Para a amplificação do polimorfismo *rs16944 IL1B*(-511 T>C), será utilizado a técnica de PCR-RFLP descrita por *Bhat* e colaboradores (2014).

- 1.1- Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rack específica;
- 1.2- Preparar a mix da PCR, contendo:
  - 17,4 µL de H<sub>2</sub>O (água) MiliQ;
  - 2,5 µL de tampão de reação 10x;
  - 1,0 µL de MgCl<sub>2</sub>;
  - 1,0 µL de dNTPs;
  - 0,5 µL de *primer* IL-1βF;
  - 0,5 µL de *primer* IL-1βR;
  - 0,1 µL de Taq DNA polimerase;
- 1.3- Adicionar 23µL do Mix da PCR nos tubos;
- 1.4- Adicionar 2,0µL de DNA extraído de cada amostra nos tubos previamente identificados e homogeneizar bem;
  - Lembrar de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o potencial da Taq DNA Polimerase;
- 1.5- Levantar os microtubos ao Termociclador e utilizar o programa descrito abaixo:

Temperatura	Tempo	Ciclo
95°C	4':00"	1
95°C	0:30"	35
56°C	0:30"	
72°C	0:30"	
72°C	10':00"	1
4°C	∞	1

- 1.6- Após amplificação, correr as amostras em gel de Agarose a 3%

Tabela 01: Descrição dos *primers*, temperaturas de pareamento ( $T_p$ ) utilizadas para a amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos que deverão ser obtidos após a PCR e reação de restrição (RFLP).

IL-1 $\beta$	LSR <sup>1</sup> e ER <sup>2</sup>	Primers	Sequências 5' → 3'	$T_p$ <sup>3</sup> (°C)	PCR	RFLP	Ref. <sup>4</sup>
IL-1 $\beta$	Rs16944	IL-1 $\beta$ F	TGGCATTGATCTGGTTCATC	56°C	304 pb	304 pb 190 pb 104 pb	1
	<i>Ava</i> I	IL-1 $\beta$ R	GTTTAGGAATCTTCCCCTT				

1. Localização do Sítio de Restrição; 2. Enzima de Restrição; 3. Temperatura de Pareamento; 4.

Referências: 1. Bhat e colaboradores (2014).

### **REACÃO DE RESTRIÇÃO - RFLP**

- 2.1 Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rack específica;
- 2.2 Preparar a mix da Reação de Restrição, contendo para cada reação:
  - 7,8  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O (água) MiliQ;
  - 2,0  $\mu$ L de tampão 10X Buffer 4;
  - 0,2  $\mu$ L de Enzima *Ava* I;
- 2.3 Adicionar 15,0 $\mu$ L de Produto de PCR de cada amostra nos tubos previamente identificados;
- 2.4 Adicionar 10  $\mu$ L da Mix da Reação de Restrição nos tubos e homogeneizar;
  - Lembrar de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o potencial da Enzima;
- 2.5 Levar os microtubos ao Termobloco e deixar por overnight ou 16 horas a 37°C.

### **GEL DE AGAROSE A 3%**

- 3.1 Diluir o TBE 10X em TBE 1X;
- 3.2 Com uma proveta separar 100ml de TBE 1X;
- 3.3 Pesar 3g Agarose;
- 3.4 Limpar a cuba horizontal que será utilizada e separar os pentes;
- 3.5 Dissolver a Agarose em 100ml de TBE 1X em um Elermayer de 250ml;
- 3.6 Aquecer a Solução em micro-ondas até a solubilização completa da Agarose;
- 3.7 Adicionar 2,0  $\mu$ L de Brometo a solução e homogeneizar;
- 3.8 Despejar a solução na cuba e colocar cuidadosamente os pentes;

- 3.9 Esperar solidificar;
  - Durante o processo de solidificação da agarose, preparar as amostras para aplicação no gel
- 3.10 Colocar 2,0 µL de Blue Juice em uma placa de Terasaki;
- 3.11 Após, colocar 8 µL do produto da restrição;
- 3.12 Homogeneizar e Aplicar os 10 µL do conteúdo no Gel de Agarose;
- 3.13 O Ladder de 100pb deve ser aplicado ao final, no primeiro poço, no volume de 2,5µL (quando for diluído no volume de 5/10 µL de Ladder original / BlueJuice);
- 3.14 Ajustar a fonte (Volts= 100; Amperes= 100 e Tempo= 1h) e deixar o gel em corrida por 60 minutos.

#### **POLIMORFISMO *rs187238 IL18* - Reação em Cadeia de Polimerase (PCR):**

Para a amplificação do polimorfismo *rs187238 IL18* (-137 G/C), será utilizado a técnica de PCR-RFLP descrita por Folwaczny e colaboradores (2005) modificado por Kumar e colaboradores (2014).

- 1.1- **Identificar** e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rack específica;
- 1.2- **Preparar** a mix da PCR, contendo:
  - 17,4 µL de H<sub>2</sub>O (água) MiliQ;
  - 2,5 µL de tampão de reação 10x;
  - 1,0 µL de MgCl<sub>2</sub>;
  - 1,0 µL de dNTPs;
  - 0,5 µL de *primer* IL18F;
  - 0,5 µL de *primer* IL18R;
  - 0,1 µL de Taq polimerase;
- 1.3- Adicionar 23µL do Mix de PCR nos tubos;
- 1.4- Adicionar 2,0µL de DNA extraído de cada amostra nos tubos previamente identificados e homogeneizar bem;
  - Lembrar de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o potencial da Taq DNA Polimerase;
- 1.5- Levar os microtubos ao Termociclador e utilizar o programa descrito abaixo:



Temperatura	Tempo	Ciclo
95°C	15':00''	1
94°C	0:30''	35
60°C	0:30''	
72°C	1:30''	
72°C	10':00''	1
4°C	∞	1

1.6- Após amplificação, correr as amostras em gel de Agarose a 2,5%

Tabela 01: Descrição dos *primers*, temperaturas de pareamento (Tp) utilizadas para a amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos que deverão ser obtidos após a PCR e reação de restrição (RFLP).

IL18	LSR <sup>1</sup> e ER <sup>2</sup>	Primers	Sequências 5' → 3'	Tp(°C) <sup>3</sup>	PCR	RFLP	Ref <sup>4</sup>
IL18	Rs187238	IL18F	CACAGAGCCCCAACTTTTTACGGC AGAGAA	60°C	155 pb	155 pb 116 pb	1 e 2
	<i>Mbo II</i>	IL18R	GACTGCTGTCGGCACTCCTTGG				

1. Localização do Sítio de Restrição; 2. Enzima de Restrição; 3. Temperatura de Pareamento; 4.

Referências: 1. Folwaczny e colaboradores (2005) modificado por Kumar e colaboradores (2014).

### **REACÃO DE RESTRIÇÃO - RFLP**

2.1- Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rack específica;

2.2- Preparar a mix da Reação de Restrição, contendo para cada reação:

- 7,8 µL de H<sub>2</sub>O (água) MiliQ;
- 2,0 µL de tampão 10X Buffer 4;
- 0,2 µL de Enzima *Mbo II*;

2.3-Adicionar 15µL de Produto de PCR de cada amostra nos tubos previamente identificados;

2.4-Adicionar 10  $\mu$ L da Mix da Reação de Restrição nos tubos e homogeneizar;

- Lembrar de fazer estas etapas de forma rápida para conservar o potencial da Taq;

2.5-Levar os microtubos ao Termobloco e deixar por 4 horas a 37°C.

### **GEL DE AGAROSE A 2,5%**

3.1- Diluir o TBE 10X em TBE 1X;

3.2- Com uma proveta separar 100ml de TBE 1X;

3.3- Pesar 2,5g Agarose;

3.4- Limpar a cuba horizontal que será utilizada e separar os pentes;

3.5- Dissolver a Agarose em 100 ml de TBE 1X em um Elermayer de 250 ml;

3.6- Aquecer a Solução em micro-ondas até a solubilização completa da Agarose;

3.7- Adicionar 2,0  $\mu$ L de Brometo a solução e homogeneizar;

3.8- Despejar a solução na cuba e colocar cuidadosamente os pentes;

3.9- Esperar solidificar;

- Durante o processo de solidificação da agarose, preparar as amostras para aplicação no gel.

3.10- Colocar 2,0  $\mu$ L de BlueJuice em uma placa de Terasaki;

3.11- Após, colocar 8  $\mu$ L do produto da restrição;

3.12- Homogeneizar e Aplicar os 10  $\mu$ L do conteúdo no Gel de Agarose;

3.13- O Ladder de 100pb deve ser aplicado ao final no primeiro poço, no volume de 2,5 $\mu$ L (quando for diluído no volume de 5/10  $\mu$ L de Ladder original / Blue Juice);

3.14- Ajustar a fonte (Volts= 100; Amperes= 100 e Tempo= 1h) e deixar o gel em corrida por 60 minutos.

## Apêndice 03. Protocolos qPCR: NLRP1 e NLRP3

**POP6 – PCR em Tempo Real (qPCR) para Genotipagem****1. CONSIDERAÇÕES NECESSÁRIAS PARA EXECUÇÃO DO PROCEDIMENTO:**

- 1.1. Reservar os equipamentos e materiais necessários: pipetas e ponteiros (1000 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl), descarte, placa para qPCR, suporte para placa, selos, suporte para selar a placa, caixa de isopor com gelo, pincel para tubo, microtubos de 1,5 mL e 0,6 mL, H<sub>2</sub>O MilliQ filtrada em membrana millipore e autoclavada, tampão TE (TBE) e pinça.
- 1.2. Antes de iniciar, o executor deverá estar usando os EPIs adequados para área de Pré-PCR: jaleco, máscaras, sapato fechado e luvas.

**2. DILUIÇÃO DA SONDA**

- 2.1. Realizar a diluição da sonda para concentração final 20x, conforme a fórmula abaixo:

$$C1.V1=C2.V2$$

$$40x.V1=20x.100\mu l$$

$$V1=2.000/40$$

$$V1= 50 \mu l \text{ (Solução estoque da sonda a ser retirado)}$$

- 2.2. Após, adicionar ao microtubo 50 µl de tampão TBE, obtendo assim um volume total de 100 µl de sonda diluída a ser utilizada na etapa 3.

**3. PROCEDIMENTO:**

- 3.1. Inicialmente, realizar a limpeza do fluxo laminar com álcool a 70% e colocar os materiais previamente separados, ligar a UV por 15min.
- 3.2. Identificar a placa com pincel para microtubo.
- 3.3. Preparar mix da reação contendo H<sub>2</sub>O, Master mix e sonda em um tubo eppendorf, conforme a tabela abaixo:

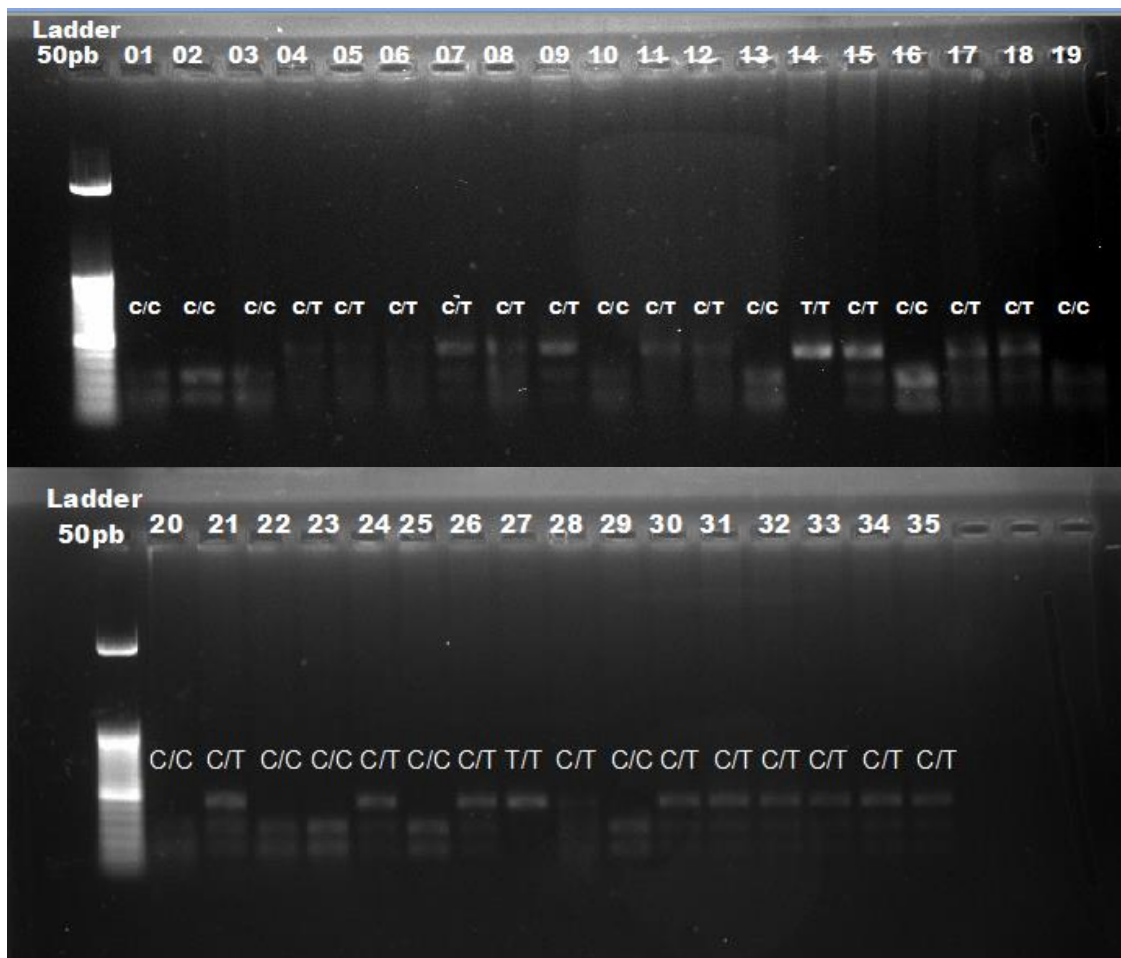
Reagentes	Concentração	1 Reação Vo 1 (µL)	Mix ____ Reações Vol (µL)
H <sub>2</sub> O	1x	2 ,25 µL	

Mast er Mix	2x	2, 5 $\mu$ L	
Sonda	20x	0 ,25 $\mu$ L	
DNA		2 $\mu$ L	
<b>Volume final</b>		7 $\mu$ L	

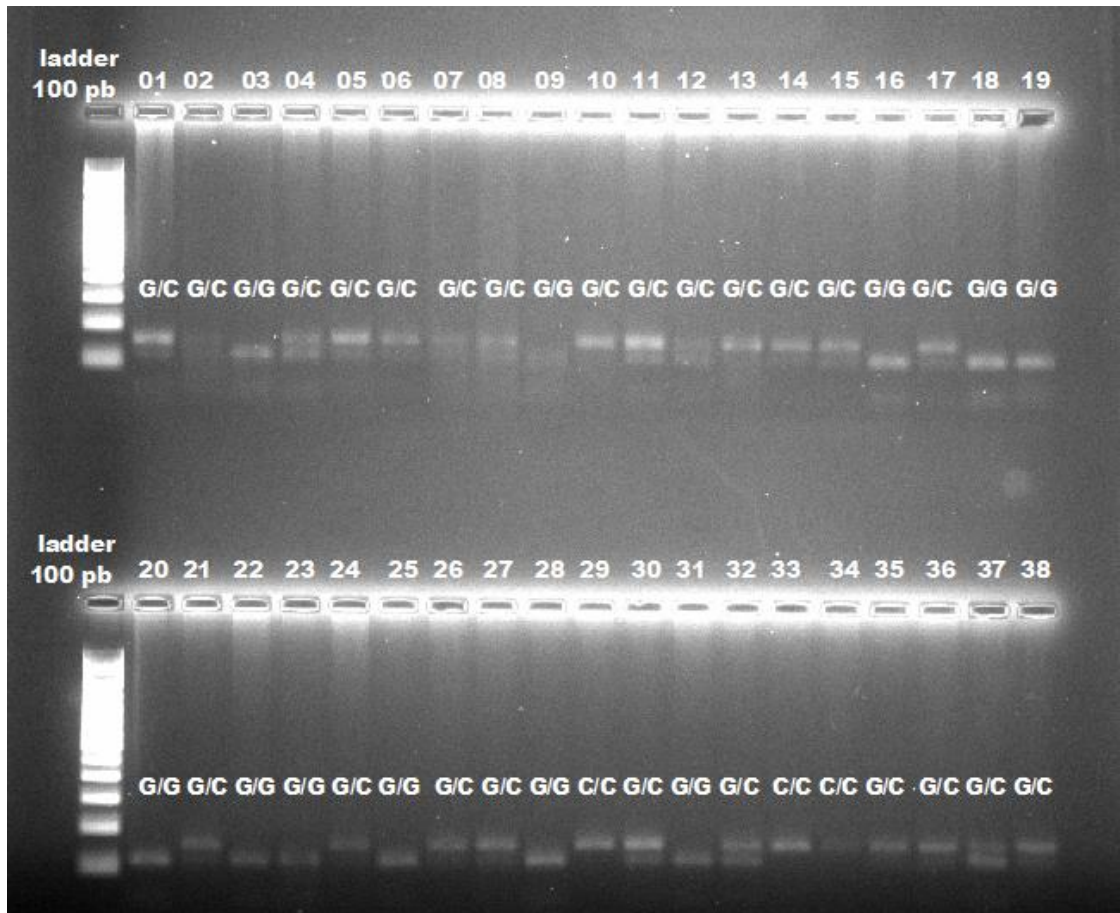
- 3.4. Aplicar 5  $\mu$ L do mix em cada poço da placa.
- 3.5. Adicionar 2  $\mu$ L de cada amostra em seu respectivo poço. Obs.: 1° poço corresponde ao Controle Negativo (7  $\mu$ L do mix).
- 3.6. Aplicar o selo na placa com atenção evitando a formação de bolhas.
- 3.7. Levar a placa à centrífuga para um spin de 10 segundos.
- 3.8. Levar a placa ao termociclador *QuantiStudio™ Design&Analysis Applied Biosystems* e configurar para o ensaio escolhido “genotipagem” e demais informações referentes ao estudo.

Apêndice 04: Géis de eletroforese para os polimorfismos envolvendo IL1Be IL18.

**Figura 13:** Eletroforese em gel de agarose para o polimorfismo no gene IL1Brs16944 (T/T-304pb), (C/C-190 pb), (C/T-304/190/114 pb).

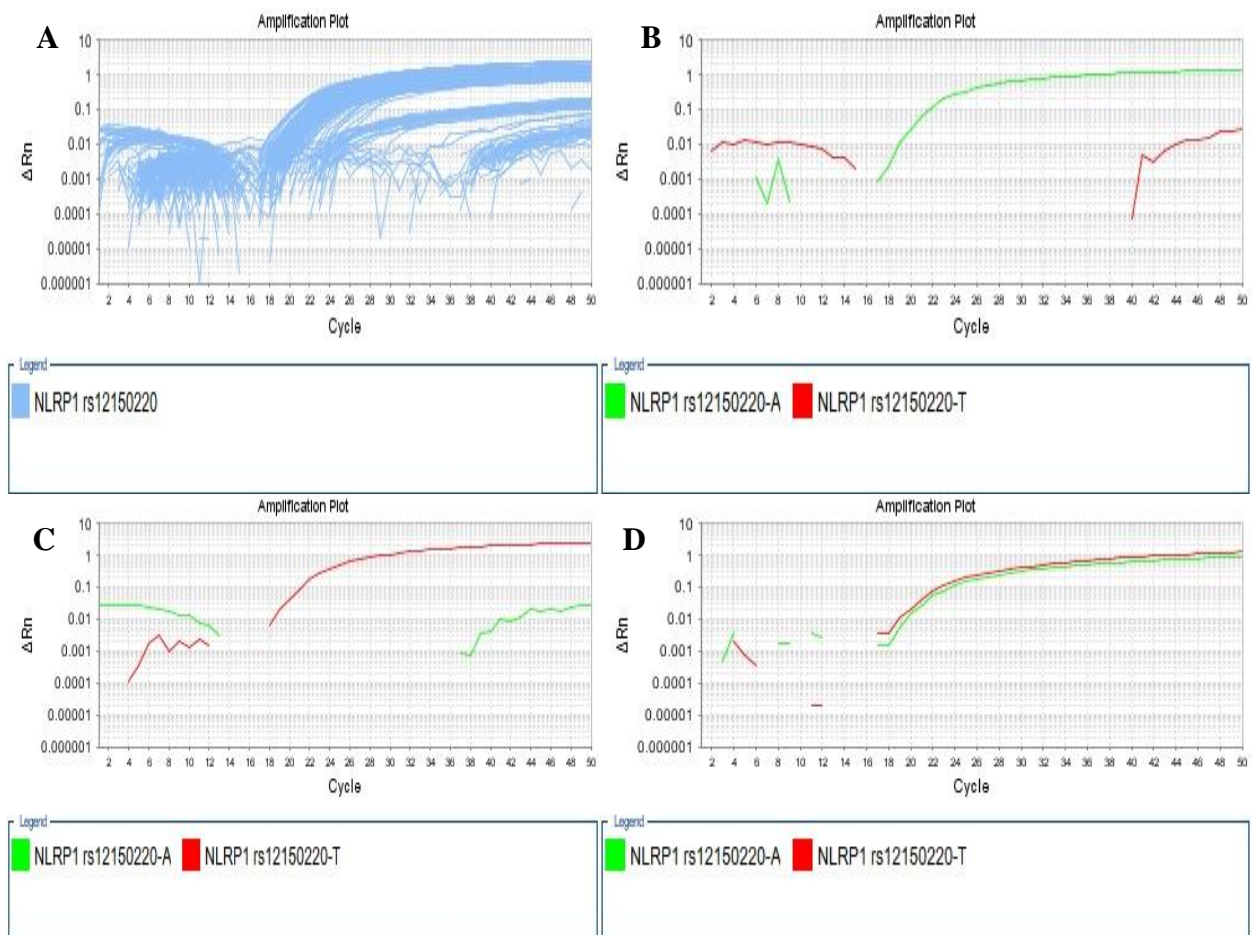


**Figura 14:** Eletroforese em gel de agarose para o polimorfismo no gene IL18 rs187238 (C/C -155 pb), (G/G -116 pb), (G/C -155, 116 e 39 pb).

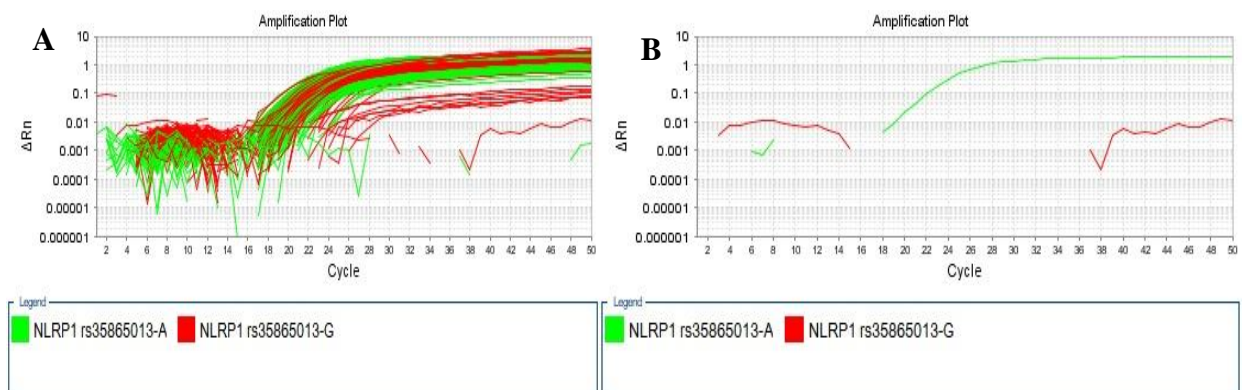


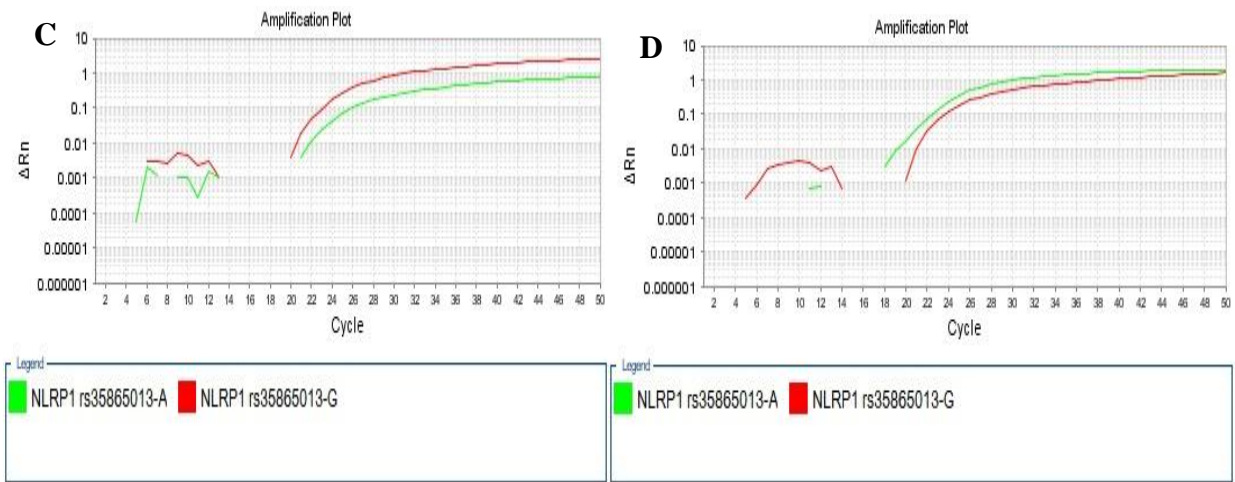
Apêndice 05: Gráficos de discriminação alélica dos polimorfismos nos genes *NLRP1* e *NLRP3*

**Figura 15.** Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene *NLRP1* rs12150220. **A** – Curvas de amplificação de 96 amostras. **B** - Homozigoto selvagem (AA). **C** – Homozigoto polimórfico (TT). **D** – Heterozigoto (AT).

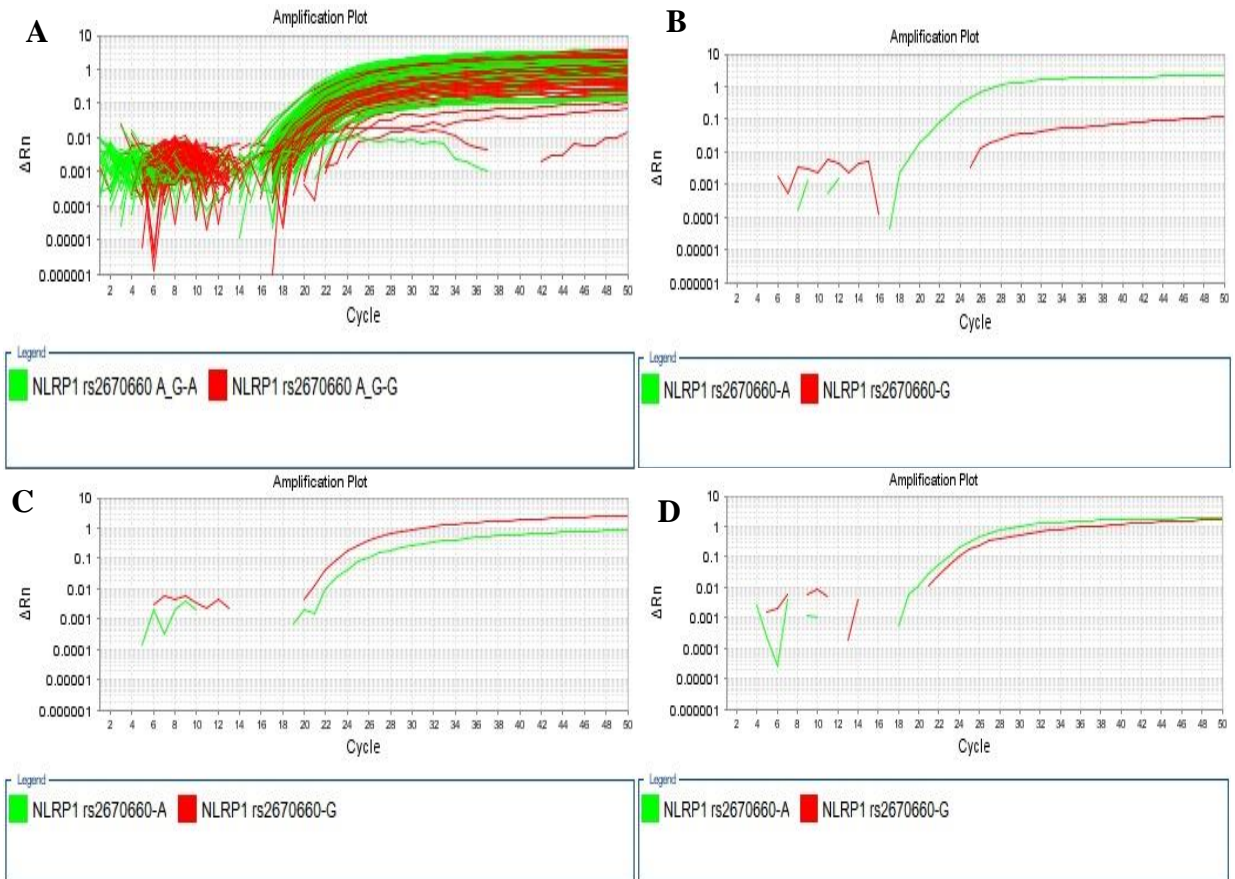


**Figura 16.** Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene *NLRP1* rs35865013. **A** – Curvas de amplificação de 96 amostras. **B** - Homozigoto selvagem (AA). **C** - Homozigoto polimórfico (GG). **D** – Heterozigoto (AG).

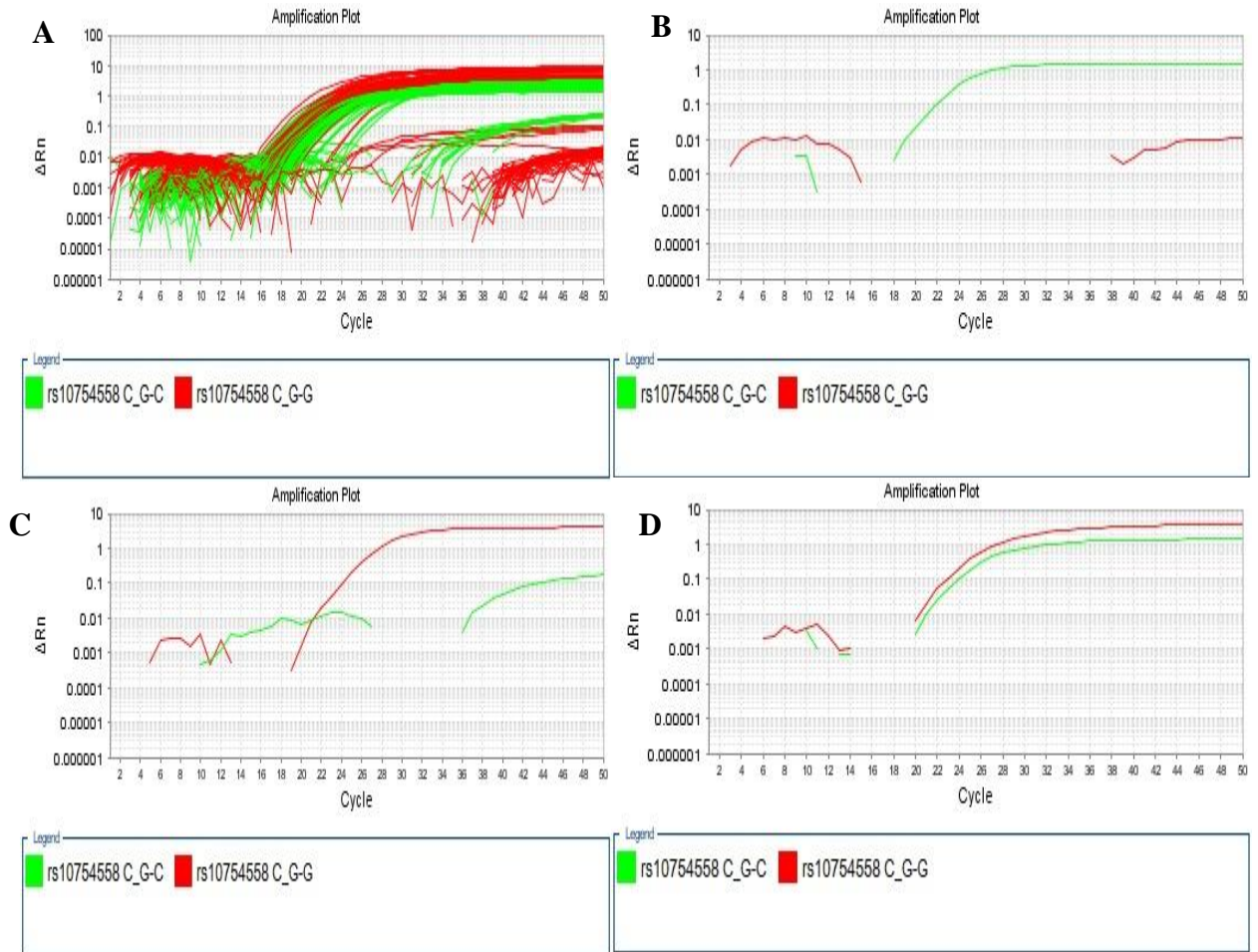




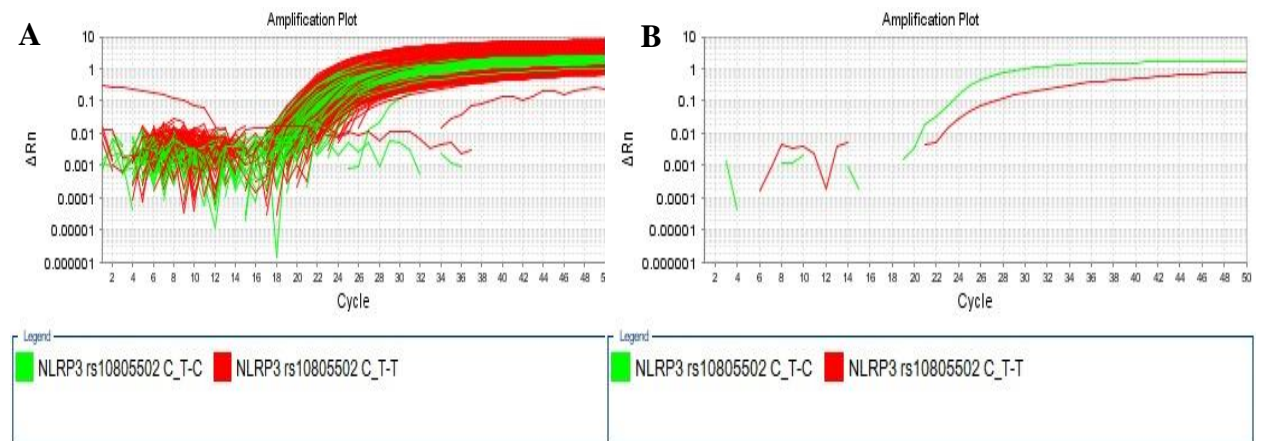
**Figura 17.** Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene *NLRP1* rs2670660. **A** – Curvas de amplificação de 96 amostras. **B** - Homozigoto selvagem (AA). **C** – Heterozigoto (AG).



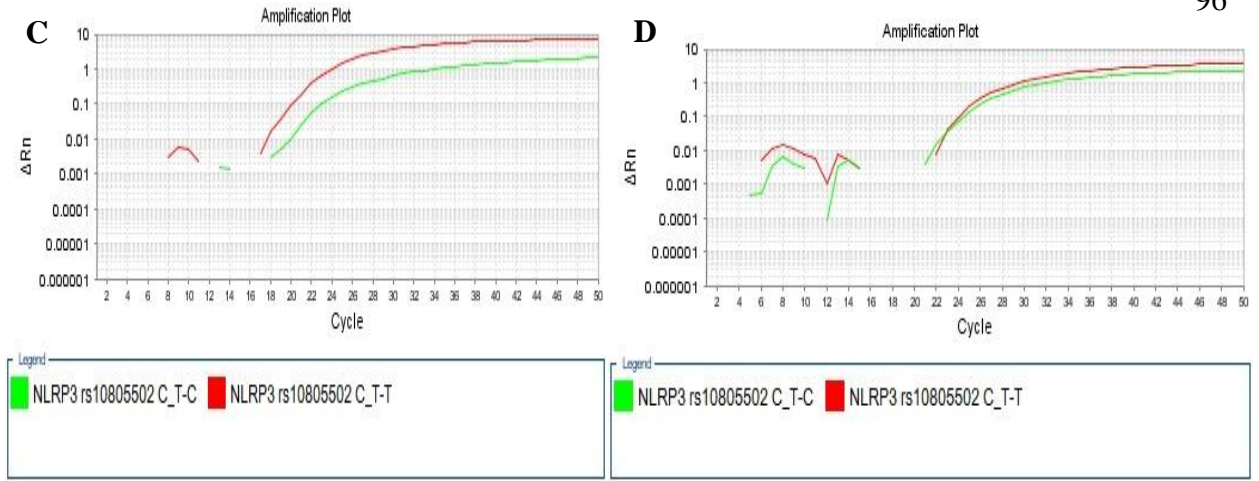
**Figura 18.** Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene *NLRP3* rs10754558. **A** – Curvas de amplificação de 96 amostras. **B** - Homozigoto selvagem (CC). **C** – Homozigoto polimórfico (GG). **D**- Heterozigoto (AG).



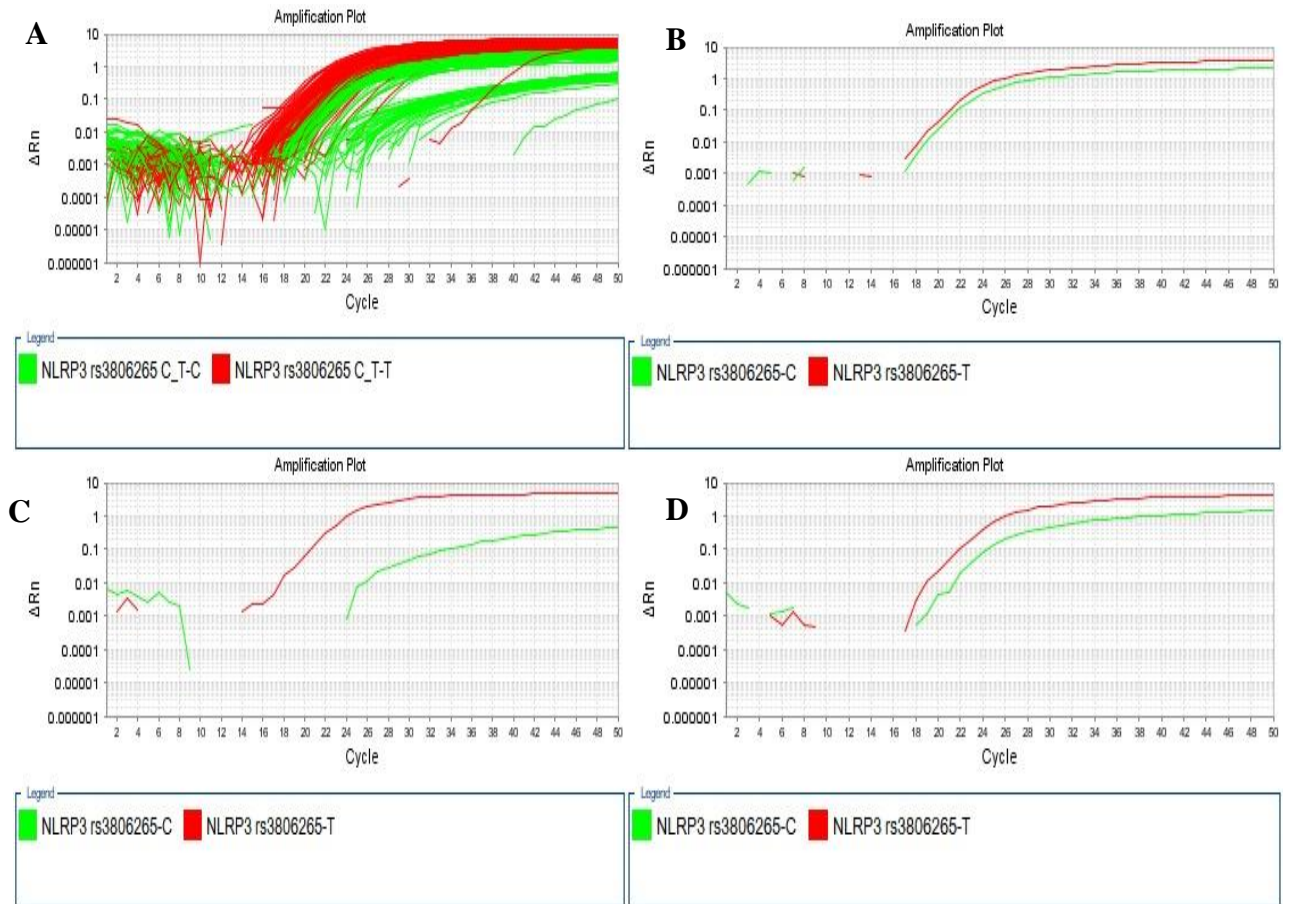
**Figura 19.** Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene *NLRP3* rs10805502. **A** – Curvas de amplificação de 96 amostras. **B** - Homozigoto selvagem (CC). **C** – Homozigoto polimórfico (TT). **D**- Heterozigoto (CT).







**Figura 20.** Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene *NLRP3* rs3806265. **A** – Curvas de amplificação de 96 amostras. **B** - Homozigoto selvagem (CC). **C** – Homozigoto polimórfico (TT). **D**- Heterozigoto (CT).



## Apêndice 06: Questionário e ficha cadastral individual

**QUESTIONÁRIO E FICHA DE CADASTRO INDIVIDUAL:**

**Projeto: “Análise da resposta imune e eficácia da vacina contra COVID-19 em profissionais da saúde da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas”**

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo: M ( ) F ( ) Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ anos

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Local de Nascimento: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Cor de Pele: Branco ( ) Pardo ( ) Negro ( ) Escolaridade: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_ Email: \_\_\_\_\_

Estado Civil: Solteiro ( ) Amigado ( ) Casado ( ) Divorciado ( ) Separado ( ) Viúvo ( ) a quanto tempo ( ) Possuem Filhos: Sim ( ) Não ( ) Quantos: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ N°: \_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_ Tipo de Moradia: \_\_\_\_\_

Quantas pessoas residem: \_\_\_\_\_ Poço: Sim ( ) Não ( ) Esgoto: (Tipo) \_\_\_\_\_

<b>Tipo Sanguíneo Grupo ABO:</b>	<b>Já teve COVID-19?</b>	<b>Teve quadro de reinfecção?</b>
O ( ) A ( ) AB ( ) B ( ) <b>Rh:</b> Positivo ( ) Negativo ( ) <b>Peso:</b> _____ kg   <b>Altura:</b> _____ cm <b>Tem alguma comorbidade?</b> Sim ( ) Não ( ) <b>Qual (is)?</b> Hipertensão arterial ( ) Diabetes Mellitus tipo II ( ) Obesidade ( ) Cardiopatia ( ) Doença renal ( ) DPOC ( ) outras doenças ( ) _____ _____ DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica; VNI: Ventilação não-invasiva <b>Qual vacina tomou?</b> ( ) CoronaVac (chinesa) ( ) AstraZeneca (Oxford + Butantan) ( ) Pfizer/BioNTech ( ) Sputnik (Vacina russa)	( ) Sim ( ) Não Início dos sintomas: ____/____/____ Final dos sintomas: ____/____/____ <b>Quais foram os sintomas?</b> Dor em orofaringe ( ) cefaleia ( ) tosse seca ( ) astenia ( ) perda do paladar ( ) perda do olfato ( ) dispneia ( ) dor abdominal ( ) diarreia ( ) vômitos ( ) Outros Sintomas: _____ _____ <b>Tomografia alterada:</b> Sim ( ) Não ( ) Não fez ( ) Internou Sim ( ) Não ( ) Recebeu oxigênio Sim ( ) Não ( ) Cateter nasal ( ) VNI ( ) Ventilação mecânica ( ) <b>Qual ferramenta de diagnóstico?</b> ( ) RT-PCR (do nariz) ( ) Teste rápido IgM/IgG ( ) Teste do antígeno <b>Faz uso regular de medicamento ?</b> Sim ( ) Não ( ) Qual (ais)?	Sim ( ) Não ( ) Se sim, quando: ____/____/____ Qual exame de diagnóstico: ( ) RT-PCR (do nariz) ____/____/____ ( ) Teste rápido IgM/IgG ____/____/____ ( ) Teste do antígeno ____/____/____ <b>Alguém da sua família foi            acometido (a) pela COVID-            19?</b> Sim ( ) Não ( ) Quantas pessoas? _____ Qual o parentesco? _____ <b>Alguém da sua família foi a            óbito por COVID-19?</b> Sim ( ) Não ( ) <b>Em uma escala de 1 a 5,            qual a gravidade da            pandemia atualmente?</b> ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( ) 4 ( ) 5

<p>Gamaleya)  <b>Já tomou outra vacina da COVID-19?</b>          Sim ( ) Não ( )          Qual? _____</p> <p>_____</p> <p><b>Data da 1º dose:</b> __ / __ / ____  <b>Data da 2º dose:</b> __ / __ / ____</p> <p><b>Apresentou reação à vacina?</b>          Sim ( ) Não ( )</p> <p><b>Qual reação?</b></p> <p>Febre ( ) Dor no local ( )          cefaleia ( ) tosse ( ) dispneia ( )          calafrios ( ) dor de garganta ( )          diarreia ( ) perda de paladar ( )          perda do cheiro ( ) vômito ( )          parada respiratória ( )          choque anafilático ( ) disfunção          renal ( ) disfunção hepática ( )          disfunção neurológica          ( ) Outros          sintomas: _____</p> <p>_____</p> <p><b>Você teve febre há menos de 7 dias?</b>          Sim ( ) Não ( )</p> <p><b>Teve alguma doença em menos de 7 dias?</b>          Sim ( ) Não ( )</p>	<p>1. _____          Dose: _____          Tempo: _____</p> <p>2. _____          Dose: _____          Tempo: _____          Outros: _____</p> <p><b>Alcoolismo</b>          Sim ( ) Não ( )</p> <p>Quantos/ Dia _____</p> <p><b>Fumante</b>          Sim ( ) Não ( )</p> <p>Quant. Tempo _____          Quant/Dia _____</p> <p><b>Faz uso de drogas ilícitas?</b>          Sim ( ) Não ( )          Tipo _____          Quant. Temp. _____</p>	<p>1 = Não grave; 5 = Muito grave</p> <p><b>Vacinação em dia?</b>          Sim ( ) Não ( ) Não sabe ( )</p> <p><b>Tomou vacina para tuberculose (BCG) nos últimos 3 anos?</b>          Sim ( ) Não ( )</p> <p><b>Tomou outra vacina recentemente (90 dias)?</b>          Sim ( ) Não ( )</p> <p><b>Tomou vacina contra influenza em 2020?</b>          Sim ( ) Não ( )</p> <p><b>Já apresentou alguma reação a qualquer tipo de vacina?</b>          Sim ( ) Não ( )</p>
--	---	--

Descreva como foi o processo da doença para você:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

O que você pensa sobre a pandemia que estamos vivendo?

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Qual setor você trabalha no HEMOAM?

\_\_\_\_\_

Você trabalha na atenção direta a pacientes ou acompanhantes? Sim ( ) Não ( )

Você trabalha na atenção direta ao doador? Sim ( ) Não ( )

Você trabalha com atendimento ao público? Sim ( ) Não ( )

Qual carga horária? \_\_\_\_\_

( ) Regime de plantão ( ) Diariamente

Trabalha em outro local/instituição hospitalar? Se sim, qual?

\_\_\_\_\_

Neste outro local, trabalha na atenção direta a pacientes com COVID-19? Sim ( ) Não ( )

Você trabalha com atendimento ao público? Sim ( ) Não ( )

Qual carga horária? ( ) Regime de plantão ( ) Diariamente

Você se vacinou por vontade própria?

Sim ( ) Não ( )

Se “não”, quais os motivos que levaram você a não querer se vacinar?

---



---

Quais medidas preventivas você acha importante permanecer após a vacinação?

( ) Outras:

Uso de máscaras ( )

Uso de álcool em gel 70 % ( )

Lavagem das mãos ( )

Não acho importante ( )

Como você tem se informado sobre a vacina?

Jornal, TV ou rádio ( )

Especialista da área ( )

Literatura (artigos e livros) ( )

Amigos/familiares ( )

Rede sociais ( )

Informes de instituições de saúde ( )

Nome do entrevistador:

---