

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENFERMAGEM

MARINA CARAVANTE DA SILVA

INVESTIGAÇÃO CITOGENÔMICA DO IMPACTO DOS POLIMORFISMOS  
DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPs) NO APARECIMENTO DE DOENÇAS  
AUTOIMUNES PÓS COVID-19

SÃO PAULO  
2022

MARINA CARAVANTE DA SILVA

INVESTIGAÇÃO CITOGENÔMICA DO IMPACTO DOS POLIMORFISMOS  
DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPs) NO APARECIMENTO DE DOENÇAS  
AUTOIMUNES PÓS COVID-19

Monografia apresentada à Escola de  
Enfermagem da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Bacharela em  
Enfermagem.

Área de concentração: Cuidado em saúde.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Leslie Domenici  
Kulikowski

Coorientador: Doutorando Gleyson Francisco da  
Silva Carvalho

São Paulo  
2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Catálogo-na-publicação (CIP)**  
**Biblioteca Wanda de Aguiar Horta**  
**Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo**

Silva, Marina Caravante da  
Investigação citogenômica do impacto dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no aparecimento de doenças autoimunes pós COVID-19 / Marina Caravante da Silva. São Paulo, 2022.  
47 p.

Trabalho de Formatura - Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

Orientador(a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leslie Domenici Kulikowski  
Área de concentração: Cuidado em Saúde.

1. Doenças autoimunes. 2. COVID-19. 3. SNP-array. I. Título

Ficha catalográfica automatizada.

Bibliotecária responsável: Fabiana Gulin Longhi (CRB-8: 7257)

Nome: Marina Caravante da Silva

Título: Investigação citogenômica do impacto de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no aparecimento de doenças autoimunes pós COVID-19.

Monografia apresentada à Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Bacharela em Enfermagem.

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### **Banca Examinadora**

Orientadora: Profª Drª \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof Dr \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof Dr \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof Dr \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Priscila e Alexander, que estiveram presentes em todos os momentos da minha vida, pelo seu apoio, incentivo, dedicação e carinho, que me deram estrutura e coragem para buscar alçar vôos cada vez mais altos, em especial nos últimos quatro anos pelo suporte para minha formação acadêmica.

À minha família, que me encoraja e incentiva meus sonhos desde muito pequena, principalmente aos meus avós, Maria Cristina e Jidevaldo, e às minhas tias, Kátia e Patrícia.

Ao meu namorado, William, pelo apoio durante os momentos mais difíceis da minha graduação e pela leitura e ajuda na elaboração de todas as versões deste trabalho, desde o projeto de pesquisa.

Às minhas amigas Ariani, Vitoria e Sheila, por estarem ao meu lado desde o primeiro dia da graduação e terem tornado os últimos anos mais leves.

Aos pacientes participantes deste projeto de pesquisa e todos aqueles que desenvolveram doenças autoimunes ou faleceram em decorrência da COVID-19, que este trabalho auxilie na compreensão destas doenças.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leslie Domenici Kulikowski, pelo apoio durante toda a elaboração desta pesquisa, além da ajuda e incentivo em cada etapa e confiança em meu trabalho.

Ao grupo de pesquisadores do Laboratório de Citogenômica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: Amom, Beatriz, Lucas, Sâmara, Vanessa, Yanca e em especial ao doutorando Gleyson, pelos ensinamentos, suporte e dedicação em todos os passos para a elaboração desta pesquisa.

Aos pacientes participantes deste projeto, que doaram amostras de seu sangue para o desenvolvimento deste trabalho e aprimoramento da pesquisa no Brasil.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC-CNPq) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.  
(Carl Jung)

Silva MCS. Investigação Citogenômica do impacto dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no aparecimento de doenças autoimunes pós COVID-19 [monografia]. São Paulo: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2022.

## RESUMO

**Introdução:** Em 2019 surgiu um novo tipo de coronavírus, responsável por causar a doença COVID-19, intitulado SARS-CoV-2. No entanto, a doença tem sido relatada também como possível desencadeadora de doenças autoimunes, que são caracterizadas por uma reação adversa do sistema imunológico às células saudáveis do próprio indivíduo. Estas doenças possuem um mecanismo complexo de ativação que inclui fatores genéticos associados à uma maior suscetibilidade de alguns indivíduos que pode estar relacionada à presença de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) específicos. Nesse estudo, avaliamos a presença de SNPs associados às doenças *artrite reumatóide, asma, diabetes mellitus tipo 1, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico e tireoidite de Hashimoto*; que representam seis das principais doenças autoimunes. **Objetivos:** Identificar os SNPs de suscetibilidade específicos associados ao aparecimento dessas doenças autoimunes no pós COVID-19. **Método:** Foram analisadas 48 amostras de DNA de pacientes previamente contaminados pelo vírus SARS-CoV-2 utilizando a técnica de SNP-array com uso do Infinium ImmunoArray-24 v2 BeadChip. A análise e interpretação dos SNPs e das regiões genômicas foi realizada utilizando o programa BlueGenome e a linguagem de programação R, as variantes foram avaliadas por meio dos seguintes bancos de dados: GWAS Catalog, dbSNP, Database of Genomic Variants (DGV) e UCSC Genome Bioinformatics. **Resultados:** Os resultados do estudo de associação nos permitiram filtrar e identificar 15 SNPs com os menores valores-P, para cada doença de interesse, na casuística selecionada, portanto, estatisticamente mais associadas com o fenótipo apresentado. Além disso, também foi possível identificar dois pacientes, que desenvolveram esclerose múltipla após a infecção pelo vírus SARS-CoV-2, que possuem compatibilidade alélica para seis SNPs previamente associadas na literatura à esclerose múltipla e um paciente, que desenvolveu asma pós COVID-19, com compatibilidade alélica para cinco SNPs associadas a doença. **Discussão:** Os resultados obtidos a partir do experimento possibilitaram a identificação de SNPs previamente associados na literatura com as doenças de asma e esclerose múltipla e confirmar, em uma casuística brasileira, essa associação. Além disso, foi possível identificar a predisposição em pacientes que, de fato, apresentaram os primeiros sintomas após a COVID-19. Assim, a investigação de SNPs específicos pode contribuir diretamente para aprimorar o entendimento de variantes genômicas consideradas como um possível gatilho para doenças autoimunes de impacto importante na população, como a esclerose múltipla, encontrada no nosso estudo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Doenças autoimunes. COVID-19. SNP-array.

Silva MCS. Cytogenomic investigation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) as a trigger of autoimmune diseases after COVID-19 [monography]. São Paulo: School of Nursing, University of São Paulo; 2022.

## ABSTRACT

**Introduction:** In 2019 transmission cases of a new type of coronavirus were reported, entitled SARS-CoV-2, responsible for causing the COVID-19 disease. However, the disease has been also reported as a trigger of autoimmune diseases, which are characterized by an abnormal reaction from the immune system against the body's healthy cells. These diseases have a complex activation mechanism including genetic factors associated with a higher susceptibility in some individuals which can be related to the presence of specific single nucleotide polymorphisms (SNPs). In this study, we evaluated the presence of SNPs associated with the diseases rheumatoid arthritis, asthma, diabetes mellitus type 1, multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus and Hashimoto's thyroiditis; which represent six of the most common autoimmune diseases. **Objectives:** Identify specific susceptibility SNPs associated with the appearance of this autoimmune diseases after COVID-19. **Methods:** Were evaluated 48 DNA samples from patients previously infected by the SARS-CoV-2 virus using the SNP-array technique with the Infinium ImmunoArray-24 v2 BeadChip. The analyses and interpretation of the SNPs and genomic regions were performed using the BlueGenome software and R programming language, while the variants were evaluated using the following databases: GWAS Catalog, dbSNP, Database of Genomic Variants (DGV) e UCSC Genome Bioinformatics. **Results:** The results of the genome association study allowed us to filter and identify 15 SNPs, for each disease of interest, with the lowest P-values in the selected samples, and therefore, statistically more related to the presented phenotype. Besides that, we also identified two patients, who developed multiple sclerosis after the infection by the SARS-CoV-2 virus, with allelic compatibility for six SNPs previously reported in literature as associated with the disease, and a patient, who developed asthma after COVID-19, with allelic compatibility for five SNPs associated with the disease. **Discussion:** The results obtained from the experiment allowed us to identify SNPs previously reported in literature as associated with asthma and multiple sclerosis diseases and confirm, in a brazilian population, this association. Additionally, it was possible to identify this predisposition in patients who, in fact, showed the firsts autoimmune symptoms after COVID-19. Thus, the investigation of specific SNPs can directly contribute to improve the understanding of genomic variants considered as a possible trigger for autoimmune diseases with an important impact on the population, such as multiple sclerosis and asthma, found in our study.

**KEY-WORDS:** Autoimmune diseases. COVID-19. SNP-array.

## **LISTA DE GRÁFICOS**

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gráfico 01 - Fenótipo apresentado pelos participantes do estudo.                                            | 25 |
| Gráfico 02 - Manhattan dos SNPs para artrite reumatóide.                                                    | 28 |
| Gráfico 03 - Manhattan dos SNPs para asma.                                                                  | 28 |
| Gráfico 04 - Manhattan dos SNPs para diabetes mellitus tipo 1.                                              | 28 |
| Gráfico 05 - Manhattan dos SNPs para esclerose múltipla.                                                    | 29 |
| Gráfico 06 - Manhattan dos SNPs para lúpus eritematoso sistêmico.                                           | 29 |
| Gráfico 07 - Manhattan dos SNPs para tireoidite de Hashimoto.                                               | 29 |
| Gráfico 08 - Análise de coordenadas principais (PCoA) considerando a distribuição dos SNPs pelos fenótipos. | 30 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 01 - Bancos de dados e referências online usados no direcionamento e busca de artigos científicos e informações. | 23 |
| Tabela 02 - Quantificação das amostras em ng/ $\mu$ l.                                                                  | 26 |
| Tabela 03 - SNPs selecionadas para as doenças de interesse.                                                             | 27 |
| Tabela 04 - Resultados alélicos obtidos para as variantes relacionadas a artrite reumatóide.                            | 31 |
| Tabela 05 - Resultados alélicos obtidos para as variantes relacionadas a asma.                                          | 31 |
| Tabela 06 - Resultados alélicos obtidos para as variantes relacionadas a diabetes mellitus tipo 1.                      | 32 |
| Tabela 07 - Resultados alélicos obtidos para as variantes relacionadas a esclerose múltipla.                            | 32 |
| Tabela 08 - Resultados alélicos obtidos para as variantes relacionadas a lúpus.                                         | 33 |
| Tabela 09 - Resultados alélicos obtidos para as variantes relacionadas a tireoidite de Hashimoto.                       | 33 |
| Tabela 10 - SNPs com menor valor-P identificados para as doenças de interesse.                                          | 35 |
| Tabela 11 - Resultados encontrados para os pacientes CV215, G3493 e G3494.                                              | 36 |

## SUMÁRIO

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                             | <b>13</b> |
| 1.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A COVID-19                              | 14        |
| 1.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS DOENÇAS AUTOIMUNES                   | 14        |
| 1.3. INFECÇÕES VIRAIS E DESENCADEAMENTO DE DOENÇAS<br>AUTOIMUNES | 15        |
| 1.4. OS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO - SNPS                | 16        |
| 1.5. INVESTIGAÇÃO DE SNPS PELA CITOGENÔMICA                      | 16        |
| 1.6. JUSTIFICATIVA                                               | 17        |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                              | <b>18</b> |
| 2.1. OBJETIVO GERAL                                              | 19        |
| 2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO                                         | 19        |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                    | <b>20</b> |
| 3.1. CASUÍSTICA                                                  | 21        |
| 3.2. ESTUDO CITOGENÔMICO                                         | 21        |
| 3.3. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE SANGUE PERIFÉRICO               | 21        |
| 3.4. TRIAGEM GENÔMICA POR <i>ARRAY</i>                           | 22        |
| 3.5. ANÁLISE DOS RESULTADOS                                      | 22        |
| <b>4. RESULTADOS</b>                                             | <b>24</b> |
| 4.1. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO E QUANTIFICAÇÃO DO<br>MATERIAL     | 25        |
| 4.2. TRIAGEM GENÔMICA POR MÉTODO DE <i>ARRAY</i>                 | 26        |
| 4.3. ANÁLISE DOS DADOS                                           | 26        |
| 4.3.1. Seleção de SNPs para as doenças de interesse              | 26        |
| 4.3.2. Resultados obtidos                                        | 27        |
| 4.3.3. Interpretação dos resultados obtidos                      | 34        |
| <b>5. DISCUSSÃO</b>                                              | <b>38</b> |
| <b>6. CONCLUSÃO</b>                                              | <b>42</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS</b>                                            | <b>44</b> |

# 1. INTRODUÇÃO

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A COVID-19**

Em dezembro de 2019, foram registrados casos de transmissão de um novo vírus intitulado SARS-CoV-2, causador da COVID-19<sup>1</sup>. A família dos coronavírus já era conhecida por causar infecções como a MERS-CoV e a SARS-CoV responsáveis, respectivamente, pela Síndrome Respiratória do Oriente Médio e Síndrome Respiratória Aguda Grave de Coronavírus<sup>2</sup>. Por sua vez, o SARS-CoV-2 destaca-se por sua vasta capacidade de contaminação, transmissão e amplo espectro clínico. Devido a sua simples forma de transmissão, o vírus foi capaz de percorrer o mundo, tornando-se uma pandemia. Além disso, os indivíduos infectados possuem manifestações clínicas que variam de uma infecção assintomática a quadros graves<sup>3</sup>.

Frente a isso, observou-se que o fenótipo clínico da maioria dos indivíduos são sintomas leves e inespecíficos como tosse seca, febre baixa ou dores no corpo, o que dificulta o diagnóstico clínico da doença, sendo necessária a realização de testes diagnósticos como o teste RT-qPCR<sup>2</sup>. Entretanto, além dos sintomas e complicações no trato respiratório, a doença tem sido relatada também como possível desencadeadora de doenças autoimunes, dentre elas: lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Guillain-Barré e esclerose múltipla<sup>4</sup>. Acredita-se ainda que mais doenças autoimunes desencadeadas pela COVID-19 venham a ser relatadas no futuro<sup>5</sup>.

Assim, o aparecimento de doenças autoimunes encontrada em alguns indivíduos após a infecção por COVID-19 representa um desafio para a compreensão dos mecanismos que a desencadeiam, exigindo que novas metodologias de pesquisa, como por exemplo, o estudo do impacto dos polimorfismos de nucleotídeos únicos neste processo, proposto nesse projeto, ajudem a estabelecer novas formas de compreender este desencadeamento.

### **1.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS DOENÇAS AUTOIMUNES**

As doenças autoimunes caracterizam-se por uma falha que provoca uma reação das células imunes, devido à perda da tolerância imunológica, aos antígenos de células saudáveis do indivíduo<sup>6</sup>. Em consequência, há a produção de autoanticorpos que promovem a manutenção de reações inflamatórias e progressivo dano tecidual, o que pode evoluir para uma destruição completa do tecido afetado<sup>7</sup>. A incidência e prevalência destas doenças não são concretamente estabelecidas, no entanto, estima-se que cerca de 8-10% da população ocidental possui doenças autoimunes<sup>8</sup>. No Brasil, são poucos os dados epidemiológicos

oficiais relativos às doenças autoimunes, apesar disso, hipotetiza-se que esteja ocorrendo um aumento significativo da prevalência destas doenças no país<sup>9</sup>.

Assim, um estudo realizado com usuários do Sistema Único de Saúde da microrregião de Águas Formosas, em Minas Gerais, identificou dentre as 15 com maior prevalência as doenças: tireoidite de Hashimoto, artrite reumatóide, diabetes mellitus tipo 1, lúpus eritematoso sistêmico e esclerose múltipla<sup>9</sup>. Desta maneira, foram selecionadas as doenças citadas anteriormente em conjunto com a asma para a realização da presente pesquisa devido à sua relevância clínica e prevalência.

Estas doenças possuem um mecanismo complexo de ativação, ainda não completamente compreendido, que envolve a relação entre fatores reguladores de vias moleculares e celulares. Quando estas vias são comprometidas, há uma falha do organismo em manter a tolerância aos componentes próprios, o que pode acontecer por fatores que incluem a genética e fatores ambientais como a exposição a patógenos<sup>6</sup>.

Os fatores genéticos estão especialmente relacionados à uma maior suscetibilidade de alguns indivíduos a desenvolver uma doença autoimune<sup>10</sup>, o que pode estar relacionado à presença de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em alguns genes destes indivíduos que os tornem mais suscetíveis, em conjunto, a exposição a patógenos, como o vírus SARS-CoV-2, pode contribuir para o início da autoimunidade em indivíduos geneticamente predispostos<sup>11</sup>.

### **1.3. INFECÇÕES VIRAIS E DESENCADEAMENTO DE DOENÇAS AUTOIMUNES**

As doenças autoimunes podem ser desencadeadas, em indivíduos suscetíveis, em resposta a infecções virais. No caso do SARS-CoV-2, acredita-se que isso ocorra por meio do processo de mimetismo molecular<sup>5</sup>, o que promove a perturbação da tolerância imunológica por exposição a determinantes antigênicos virais, que induzem anticorpos de reação cruzada contra antígenos próprios e a manutenção da resposta imune<sup>12</sup>.

Na infecção pelo SARS-CoV-2 ocorre uma reação imunológica similar a das doenças autoimunes, os danos teciduais são causados por uma resposta imune descontrolada, caracterizada pela produção excessiva de citocinas e super ativação do sistema imune. Com a quebra da tolerância imunológica ocorre a produção de autoanticorpos, assim, a COVID-19 pode desencadear uma reação cruzada provocando fenômenos autoimunes<sup>5</sup>.

Em pacientes com COVID-19, a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas pode causar dano severo aos tecidos em casos críticos, o que também ocorre nas

doenças autoimunes, assim, de maneira semelhante a estas doenças, os padrões moleculares associados ao dano também participam da patogênese da COVID-19 e estão relacionados ao desfecho da doença<sup>5</sup>.

#### **1.4. OS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO - SNPS**

Os SNPs são variações do DNA em que a base nucleotídica varia na população, de maneira que são as formas mais frequentes de variação encontradas no genoma humano e também a forma mais simples de mutação em uma base única<sup>13</sup>. Acredita-se que estas variações ocorram aproximadamente uma vez a cada 1.000 nucleotídeos, podendo ser variações únicas ou ocorrer em certos grupos populacionais.

Os SNPs podem ser encontrados em regiões intergênicas e assim atuar como marcadores biológicos auxiliando a localizar genes associados a doenças, ou ainda, ocorrer no meio dos genes ou em regiões regulatórias próximas, neste caso podem desempenhar papel mais direto na doença ao afetar a função gênica, e assim, impactar na resposta individual a doenças, infecções etc<sup>14</sup>. Desta maneira, consideramos que a investigação do impacto dos SNPs no desencadeamento de doenças autoimunes fornece uma abordagem promissora na compreensão do desenvolvimento destas doenças pós COVID-19.

#### **1.5. INVESTIGAÇÃO DE SNPS PELA CITOGENÔMICA**

Os SNPs, por serem variações muito pequenas no genoma, não são possíveis de serem identificados por meio de técnicas citogenômicas clássicas<sup>15</sup>, assim, devem ser utilizadas técnicas como hibridização de sondas em arranjos (SNP *array*), ligação de oligonucleotídeo baseado em PCR e por sequenciamento<sup>16</sup>. Os ensaios realizados utilizando técnicas de sequenciamento, apesar de possibilitarem uma análise muito mais detalhada do genoma ao determinar a sequência completa das bases nucleotídicas de um indivíduo, possuem limitações como o elevado custo do equipamento e de kits de reações, além da complexidade para análise dos resultados<sup>15</sup>.

Assim, a técnica utilizada foi o SNP *array*, que permite investigar alterações cromossômicas de perda e ganho de material genético submicroscópicas, incluindo microdeleções e microduplicações e também dissomias uniparentais, o que permite a realização de uma análise mais completa<sup>15</sup>. Nesta tecnologia são utilizados BeadChips, nos quais milhares a milhões de genótipos podem ser analisados de uma vez por meio de micro grânulos de sílica alojados em micropoços gravados e revestidos com várias cópias de uma sonda de oligonucleotídeos visando um *locus* específico no genoma<sup>17</sup>. Para este estudo utilizamos a plataforma Infinium ImmunoArray-24 v2 BeadChip Kit projetado para realizar

um mapeamento preciso de *locus* de suscetibilidade nos principais distúrbios mediados pelo sistema imunológico.

## **1.6. JUSTIFICATIVA**

Por ser um vírus de surgimento recente, ainda não foram amplamente analisados os impactos da infecção pelo SARS-CoV-2, de maneira que ainda não existem muitos estudos que o relacionem com o possível aparecimento de outras condições que afetam o organismo humano após a contaminação.

Deve-se considerar ainda a relação entre infecções virais e o desencadeamento de doenças autoimunes em indivíduos suscetíveis e a presença de relatos que evidenciam este desencadeamento após a COVID-19. Além disso, as doenças autoimunes são consideráveis causas de morbidade e mortalidade e possuem grande relevância sócio-econômica e de saúde pública devido aos indivíduos afetados serem, frequentemente, adultos jovens, o que se agrava ao considerar que existem dados insuficientes da prevalência dessas doenças no Brasil<sup>9</sup>.

Portanto, torna-se relevante a busca por variantes genéticas que evidenciem esta maior suscetibilidade, o que pode ser realizado por meio da busca e análise de SNPs em genes associados ao desenvolvimento destas doenças, o que permite ainda posterior aconselhamento dos indivíduos identificados como suscetíveis

## **2. OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral desta pesquisa é, a partir de uma análise citogenômica, investigar o impacto de SNPs em genes que aumentem a suscetibilidade para o desenvolvimento de doenças autoimunes em indivíduos após infecção pela COVID-19.

### **2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO**

Identificar os SNPs de suscetibilidade associados a seis doenças autoimunes em indivíduos previamente infectados pelo vírus SARS-CoV-2, sendo estas doenças: artrite reumatóide, asma, diabetes mellitus tipo 1, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico e tireoidite de Hashimoto.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. CASUÍSTICA**

Neste projeto foram estudados 48 pacientes previamente infectados pelo vírus SARS-CoV-2, sendo 28 pacientes que relataram o aparecimento de ao menos uma das doenças autoimunes selecionadas para este estudo após a infecção pelo SARS-CoV-2 e 20 amostras controle. Todos os pacientes possuíam idade igual ou superior a 18 anos e tiveram resultado “detectado” em teste RT-qPCR para COVID-19, considerado o método padrão-ouro de diagnóstico da doença.

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética sob CAAE nº 57722722.7.0000.0068 sendo emitido parecer nº 5.392.133.

#### **3.2. ESTUDO CITOGENÔMICO**

Todos os experimentos descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Citogenômica do LIM 03, associado ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e localizado no Bloco 12 do 2º andar do prédio dos ambulatórios do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

#### **3.3. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE SANGUE PERIFÉRICO**

Após coleta das amostras de sangue, isolamos o DNA dos pacientes utilizando o QIAamp DNA *Blood Mini Kit* (250) (Qiagen, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. Assim, para que houvesse a ruptura da membrana plasmática das células contidas nas amostras, foi adicionado 180 µl de Buffer ATL e realizada incubação por dez minutos a 85°C, em seguida foi adicionado 20 µl de Proteinase K e incubado a 56°C por uma hora. Após este período, para garantir a completa lise celular, foi adicionado 200 µl de Buffer AL e realizada incubação à 70°C por dez minutos. Posteriormente, foi adicionado 200 µl de etanol 96-100%, realizada homogeneização e transferência do material para uma coluna de purificação, que foi centrifugado por um minuto a 8.000 rpm, após centrifugação a coluna de purificação foi transferida para um novo tubo e o filtrado foi descartado, a partir deste momento, a cada lavagem este processo de troca do tubo foi realizada novamente.

Em seguida, iniciamos a primeira lavagem ao adicionar 500 µl de Buffer AW1 e centrifugamos por um minuto a 8.000 rpm, para a segunda lavagem foi adicionado 500 µl de Buffer AW2 e centrifugado por três minutos a 14.000 rpm. Após realização das lavagens, a coluna de purificação foi transferida para um tubo de 1,5 ml e realizada eluição com 150 µl de

Buffer AE e incubado por um minuto em temperatura ambiente e então centrifugado por um minuto a 8.000 rpm. Após extraído, o DNA obtido das amostras de sangue foi quantificado em ng/ $\mu$ L pelo fluorômetro Qubit e diluído, quando necessário, para obter a concentração mínima de 50 ng/ $\mu$ L, exigida para realização do experimento.

### 3.4. TRIAGEM GENÔMICA POR *ARRAY*

A investigação genômica foi realizada conforme protocolo para o Infinium ImmunoArray-24 v2 BeadChip, que consiste em inicial amplificação do DNA extraído a partir da desnaturação e neutralização das amostras, ao adicionar 20  $\mu$ L do reagente MA1 à placa, na qual foram colocados 4  $\mu$ L de DNA e 4  $\mu$ L do reagente 0.1N NaOH, em seguida foi incubado e adicionado 34  $\mu$ L do reagente MA2 e 38  $\mu$ L do reagente MSM por poço. Neste momento a placa foi incubada entre 20 e 24 horas, o que promove uma amplificação uniforme do genoma e gera quantidade suficiente de DNA para ser utilizado. Em seguida realizamos a fragmentação enzimática, que garante que as amostras tenham sido fragmentadas nos pontos de quebra, prevenindo a excessiva fragmentação, nesta etapa foi adicionado 25  $\mu$ L do reagente FMS e realizada incubação em banho-seco por uma hora.

A partir da fragmentação foi realizada a precipitação ao adicionar 50  $\mu$ L do reagente PM1 e 155  $\mu$ L do reagente 2-propanol 100% após incubação, homogeneizada e incubada novamente, centrifugada, removido o excesso de líquido e aguardo da secagem completa. Para a ressuspensão do DNA precipitado foi adicionado 23  $\mu$ L do reagente RA1 e incubado. Após este procedimento foi realizada a hibridização do DNA ao Infinium ImmunoArray-24 v2 BeadChip, que consistiu na desnaturação do DNA em banho-seco, montagem das câmaras de hibridização, dispensação de 14  $\mu$ L de cada amostra no BeadChip e nova incubação. Por fim, foram realizadas as lavagens do BeadChip com reagente PB1, extensão de única base e coloração das bases para leitura do chip no *array* scanner iScan®.

### 3.5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Após a obtenção dos dados genômicos brutos por meio da leitura do Infinium ImmunoArray-24 v2 BeadChip pelo equipamento iScan®, os resultados obtidos foram compilados, sendo organizados e subsequentemente submetidos à análise e interpretação. Os SNPs associados às doenças de interesse foram filtrados, utilizando o programa GenomeStudio e por linguagem de programação R, além disso, as variantes foram avaliadas por meio de informações obtidas no banco de dados GWAS Catalog, que proporciona a investigação do impacto de variantes comuns em doenças de origem complexa.

Por meio do GWAS *Catalog* foram selecionadas de cinco a dez SNPs, para cada uma das doenças autoimunes escolhidas, que possuíam simultaneamente os menores valores-P e estudos significativos e, portanto, sendo as variantes com maior potencial de relação com o fenótipo estudado. Em conjunto, utilizamos também informações dos bancos de dados: *Database of Genomic Variants* (DGV), *UCSC Genome Bioinformatics* e dbSNP, para obtenção de informações adicionais, tais como incidência populacional das variantes e demais relatos clínicos em bancos de dados como o ClinVar, conforme tabela a seguir.

**Tabela 1** - Bancos de dados e referências online usados no direcionamento e busca de artigos científicos e informações.

| Banco de dados e referências                      | Descrição                                                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GWAS <i>Catalog</i>                               | Catálogo público que compila dados de estudos de associação em todo o genoma disponível em: < <a href="https://www.ebi.ac.uk/gwas/">https://www.ebi.ac.uk/gwas/</a> >.                            |
| <i>Database of Genomic Variants</i> (DGV)         | Catálogo público de alterações genômicas estruturais disponível em: < <a href="http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home">http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home</a> >.                                            |
| UCSC <i>Genome Bioinformatics</i>                 | <i>Software</i> que permite a visualização de porções específicas do genoma disponível em: < <a href="https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway">https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway</a> >. |
| dbSNP                                             | Catálogo público de SNPs disponível em: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/</a> >.                                                                    |
| ClinVar                                           | Banco de dados público que relaciona variantes genéticas a fenótipos humanos disponível em: < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/</a> >.        |
| <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> (OMIM) | Catálogo online de genes humanos e doenças genéticas disponível em: < <a href="https://www.omim.org">https://www.omim.org</a> >.                                                                  |
| PubMed                                            | Site para busca de referências bibliográficas mundiais em saúde disponível em: < <a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov</a> >.                                 |

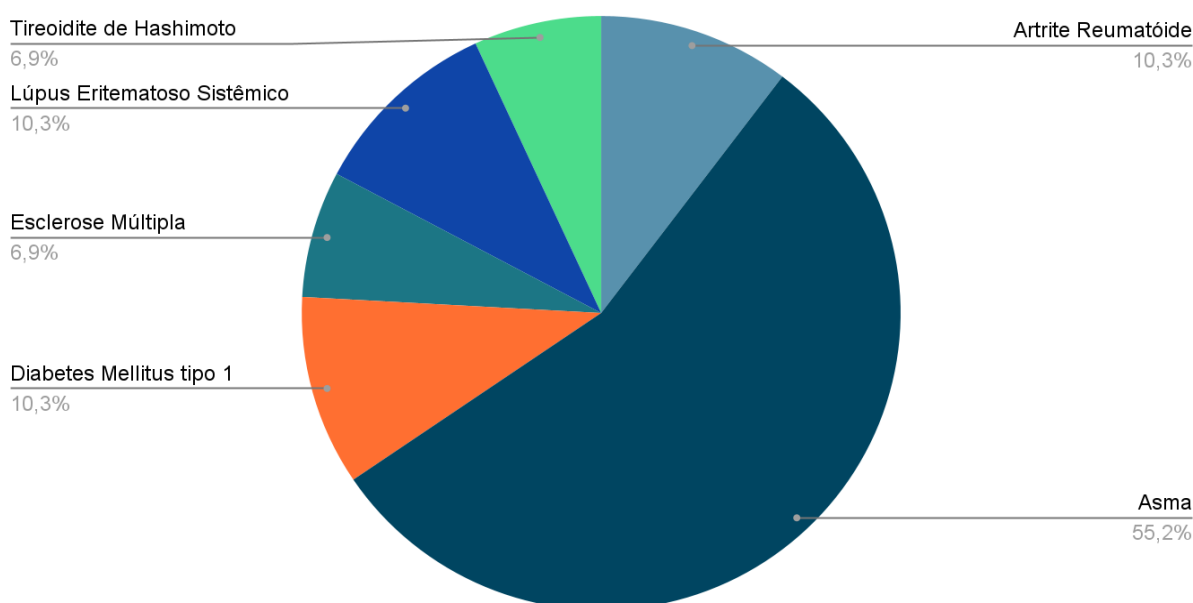
## **4. RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

Realizamos a seleção de 48 pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com idade igual ou superior a 18 anos, previamente contaminados pelo vírus SARS-CoV-2 que tiveram resultado “detectado” em teste RT-qPCR.

Dos quais, 28 pacientes relataram apresentar ao menos uma das doenças autoimunes selecionadas para este estudo após terem sido diagnosticados com COVID-19, de acordo com o gráfico a seguir.

**Gráfico 1** - Fenótipo apresentado pelos participantes do estudo.



Após seleção dos pacientes, foi realizada a coleta de cerca de 4 ml de sangue periférico e extraído o DNA das amostras para realização da triagem genômica por método de *array* com uso do Infinium ImmunoArray-24 v2 BeadChip. A triagem por método de *array* foi dividida em dois experimentos com 24 amostras em cada. A avaliação e interpretação dos dados brutos foi completada e detalhada no item 4.3.

### 4.1. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO E QUANTIFICAÇÃO DO MATERIAL

Após seleção das amostras, foi realizada extração de DNA genômico e quantificação do material para realização do experimento, com uso do QIAamp DNA *Blood Mini Kit* (250), seguindo o protocolo do fabricante.

Após extraído, o DNA genômico obtido das amostras de sangue foi quantificado em ng/μL com uso do fluorômetro Qubit, conforme demonstrado na tabela a seguir. Todas as

amostras apresentaram níveis adequados ou aceitáveis em seus parâmetros de qualidade para utilização na técnica de *array*.

**Tabela 2** - Quantificação das amostras em ng/μL.

| Amostra | Quantificação | Amostra | Quantificação | Amostra | Quantificação |
|---------|---------------|---------|---------------|---------|---------------|
| C-6     | 57.2 ng/μL    | C-120   | 166 ng/μL     | C-229   | 55.9 ng/μL    |
| C-7     | 59.2 ng/μL    | C-129   | 56.6 ng/μL    | C-230   | 139 ng/μL     |
| C-8     | 72.6 ng/μL    | C-133   | 52 ng/μL      | C-232   | 56.4 ng/μL    |
| C-14    | 187 ng/μL     | C-135   | 57.3 ng/μL    | C-236   | 114 ng/μL     |
| C-27    | 70.2 ng/μL    | C-149   | 54.6 ng/μL    | C-237   | 55.8 ng/μL    |
| C-29    | 79.6 ng/μL    | C-150   | 116 ng/μL     | C-241   | 51.4 ng/μL    |
| C-45    | 52.3 ng/μL    | C-162   | 56.1 ng/μL    | C-243   | 56.3 ng/μL    |
| C-47    | 57.2 ng/μL    | C-163   | 70.6 ng/μL    | C-244   | 55.3 ng/μL    |
| C-49    | 52.2 ng/μL    | C-167   | 52.6 ng/μL    | C-247   | 65.4 ng/μL    |
| C-63    | 241 ng/μL     | C-184   | 104 ng/μL     | C-259   | 55.7 ng/μL    |
| C-70    | 251 ng/μL     | C-189   | 68 ng/μL      | C-261   | 50.6 ng/μL    |
| C-71    | 98.3 ng/μL    | C-198   | 59.2 ng/μL    | C-287   | 56.4 ng/μL    |
| C-72    | 135 ng/μL     | C-206   | 55.6 ng/μL    | C-291   | 65.1 ng/μL    |
| C-75    | 201 ng/μL     | C-212   | 191 ng/μL     | C-321   | 130 ng/μL     |
| C-81    | 54 ng/μL      | C-215   | 120 ng/μL     | C-323   | 51.4 ng/μL    |
| C-86    | 114 ng/μL     | C-219   | 50.5 ng/μL    | C-370   | 57 ng/μL      |
| C-90    | 76.7 ng/μL    | C-220   | 70 ng/μL      | C-375   | 105 ng/μL     |
| C-94    | 107 ng/μL     | C-221   | 58.7 ng/μL    | C-378   | 210 ng/μL     |
| C-95    | 53.6 ng/μL    | C-222   | 60.1 ng/μL    | C-384   | 56.3 ng/μL    |
| C-102   | 54.2 ng/μL    | C-223   | 52.2 ng/μL    | G-3493  | 117 ng/μL     |
| C-105   | 151 ng/μL     | C-225   | 53.2 ng/μL    | G-3494  | 67.8 ng/μL    |
| C-107   | 51.4 ng/μL    | C-226   | 56.9 ng/μL    | G-3510  | 53.5 ng/μL    |
| C-110   | 135 ng/μL     | C-227   | 54.2 ng/μL    | G-3511  | 57 ng/μL      |
| C-119   | 190 ng/μL     | C-228   | 50.4 ng/μL    | P-798   | 54.4 ng/μL    |

## 4.2. TRIAGEM GENÔMICA POR MÉTODO DE *ARRAY*

Depois da extração e quantificação das amostras selecionadas, foi realizada a triagem genômica utilizando o método de *array* com uso do chip Infinium ImmunoArray-24 v2 BeadChip, em três dias de experimento. A partir da leitura dos chips, foi possível identificar as variantes presentes nas amostras selecionadas, apresentadas no item 4.3.3.

## 4.3. ANÁLISE DOS DADOS

### 4.3.1. Seleção de SNPs para as doenças de interesse

Por meio do banco de dados GWAS *Catalog*, foram selecionadas dez SNPs para as seguintes doenças: asma, esclerose múltipla e lúpus eritematoso sistêmico, nove SNPs para as doenças artrite reumatóide e diabetes mellitus tipo 1, e cinco SNPs para a doença tireoidite de Hashimoto, que possuíam simultaneamente os menores valores-P e estudos significativos, a fim de compará-los com os resultados obtidos após a triagem genômica das amostras selecionadas neste projeto. Assim, foram selecionados os SNPs expostos na tabela a seguir.

**Tabela 3** - SNPs selecionadas para as doenças de interesse.

|                                                          |             |                 |                        |                     |                          |                 |                |                 |                 |                 |                 |
|----------------------------------------------------------|-------------|-----------------|------------------------|---------------------|--------------------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| SNPs selecionados para a doença artrite reumatóide       | ID Variante | rs11889341      | rs11933540             | rs3087243           | rs3093024                | rs71508903      | rs7731626      | rs8026898       | rs8032939       | rs9268839       | -               |
|                                                          | Gene        | <i>STAT4</i>    | <i>RBPJ/AC097714.1</i> | <i>ICOSCTLA4</i>    | <i>CCR6/LOC105378122</i> | <i>ARID5B</i>   | <i>ANKRD55</i> | <i>DRAIC</i>    | <i>RASGRP1</i>  | <i>HLA-DRB9</i> | -               |
| SNPs selecionados para a doença asma                     | ID Variante | rs10197862      | rs11078927             | rs1342326           | rs17293632               | rs1837253       | rs3771166      | rs3771180       | rs744910        | rs7848215       | rs9273349       |
|                                                          | Gene        | <i>IL1RL1</i>   | <i>GSDMB</i>           | <i>IL33</i>         | <i>SMAD3</i>             | Intergênica     | <i>IL18R1</i>  | <i>IL1RL1</i>   | <i>SMAD3</i>    | <i>IL33</i>     | <i>HLA-DQB1</i> |
| SNPs selecionados para a doença diabetes mellitus tipo 1 | ID Variante | rs1004446       | rs11171739             | rs12708716          | rs12927355               | rs2104286       | rs2476601      | rs6679677       | rs689           | rs9273363       | -               |
|                                                          | Gene        | <i>IGF2/INS</i> | Intergênica            | <i>CLEC16</i>       | <i>CLEC16A</i>           | <i>IL2RA</i>    | <i>PTPN22</i>  | <i>PHTF1</i>    | <i>IGF2/INS</i> | <i>HLA-DQB1</i> | -               |
| SNPs selecionados para a doença esclerose múltipla       | ID Variante | rs1077667       | rs12927355             | rs1323292           | rs1738074                | rs1800693       | rs2104286      | rs3104373       | rs3129889       | rs3135388       | rs9271366       |
|                                                          | Gene        | <i>TNFSF14</i>  | <i>CLEC16A</i>         | <i>LOC105371664</i> | <i>TAGAP</i>             | <i>TNFRSF1A</i> | <i>IL2RA</i>   | <i>HLA-DQA1</i> | Intergênica     | <i>HLA-DRA</i>  | Intergênica     |
| SNPs selecionados para a doença lúpus                    | ID Variante | rs10036748      | rs1049564              | rs11574637          | rs13277113               | rs1801274       | rs2304256      | rs6914831       | rs729302        | rs7574865       | rs7726414       |
|                                                          | Gene        | <i>TNIP1</i>    | <i>PNP</i>             | <i>ITGAX</i>        | <i>BLK</i>               | <i>FCGR2A</i>   | <i>TYK2</i>    | <i>AH11</i>     | <i>IRF5</i>     | <i>STAT4</i>    | <i>TCF7</i>     |
| SNPs selecionados para a doença tireoidite de Hashimoto  | ID Variante | rs11247367      | rs170884               | rs231775            | rs2476601                | rs9277555       | -              | -               | -               | -               | -               |
|                                                          | Gene        | <i>IGF1R</i>    | <i>NIBAN1</i>          | <i>CTLA4</i>        | <i>PTPN22</i>            | <i>HLA-DPB1</i> | -              | -               | -               | -               | -               |

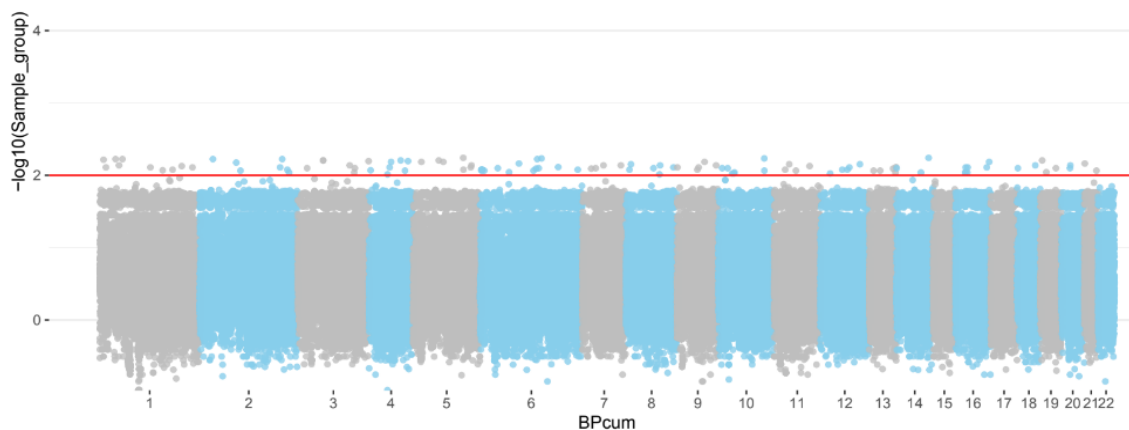
#### 4.3.2. Resultados obtidos

Posteriormente à seleção dos SNPs específicos para as doenças estudadas neste projeto, apresentados na tabela 3, e obtenção dos dados genômicos brutos por meio da realização da triagem genômica por método de *array*, os resultados obtidos foram compilados, sendo organizados e subsequentemente submetidos à análise e interpretação. Os SNPs associados às doenças de interesse, encontrados no genoma dos pacientes estudados, foram filtrados utilizando o programa Bluefuse e pela linguagem de programação R, assim, foi possível realizar um estudo de associação genômica na casuística selecionada.

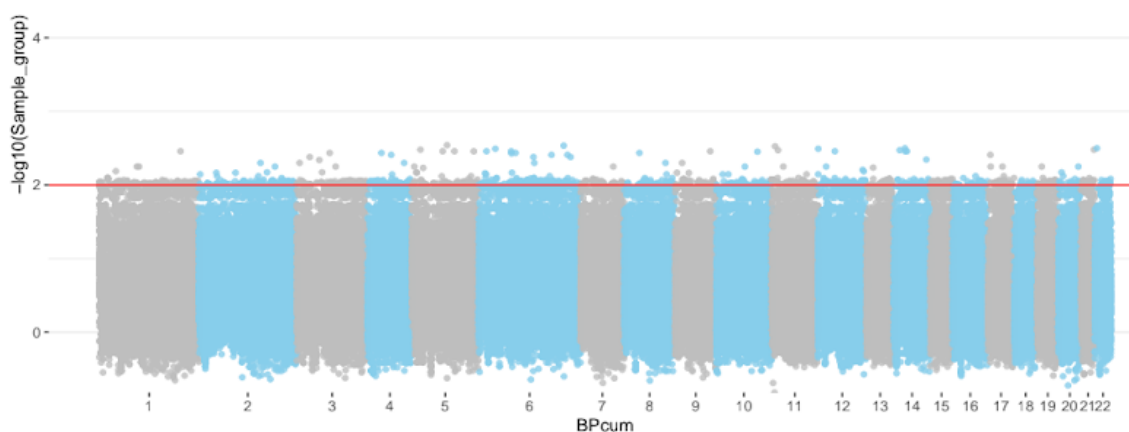
Para interpretação dos SNPs encontrados neste estudo, elaboramos os seguintes gráficos de Manhattan, que nos permitem comparar os SNPs encontrados em todo o genoma da população estudada a partir dos valores-P a que cada SNP está associado, nestes gráficos é apresentado, no eixo vertical, o  $-\log_{10}$  do valor-P encontrado e, no eixo horizontal, os cromossomos nos quais cada SNPs está localizado, de forma que cada ponto representa uma variante analisada. A linha vermelha nos gráficos representa o *threshold*, ou seja, o limiar de

significância estatística apropriada que nos permite diferenciar os SNPs verdadeiramente representativos, assim, os pontos mais altos acima deste limiar representam os SNPs significativamente associados ao fenótipo analisado e, portanto, com menor valor- $P^{18}$ .

**Gráfico 2 - Manhattan dos SNPs para artrite reumatóide**



**Gráfico 3 - Manhattan dos SNPs para asma**



**Gráfico 4 - Manhattan dos SNPs para diabetes mellitus tipo 1**

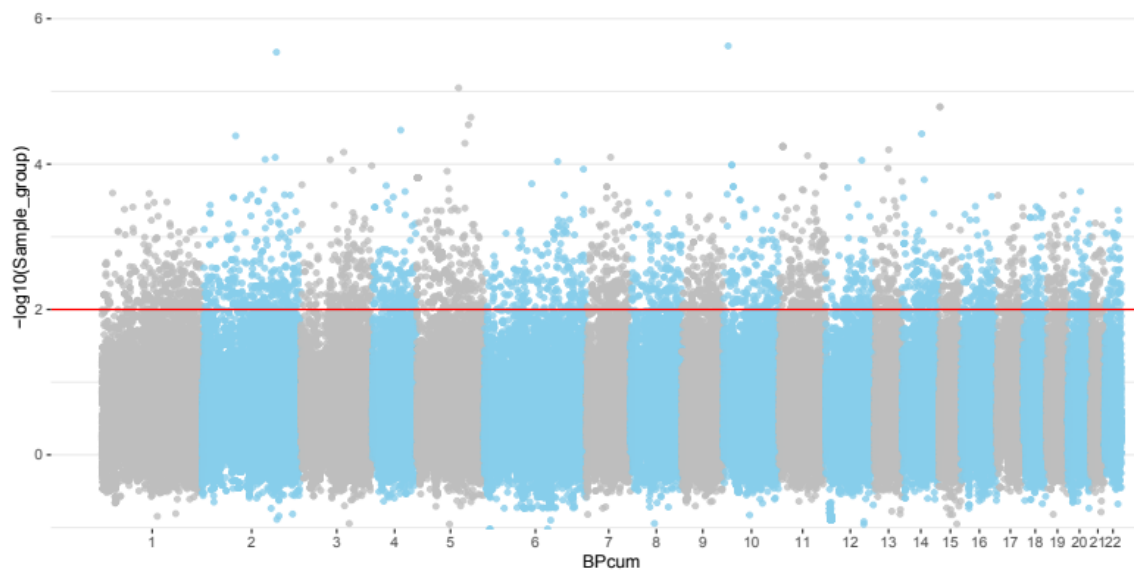


Gráfico 5 - Manhattan dos SNPs para esclerose múltipla

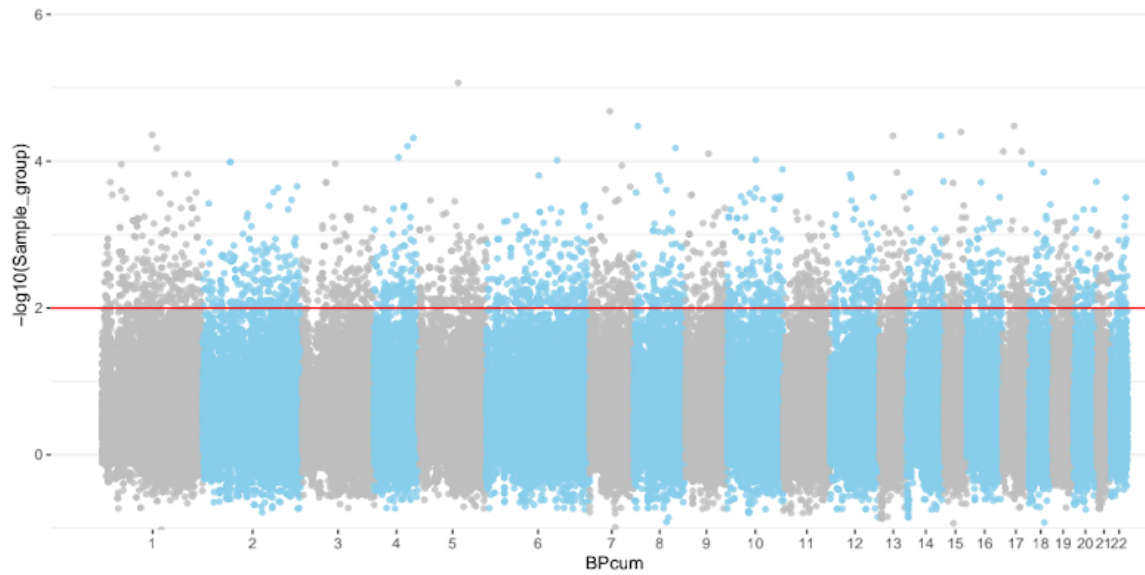


Gráfico 6 - Manhattan dos SNPs para lúpus eritematoso sistêmico

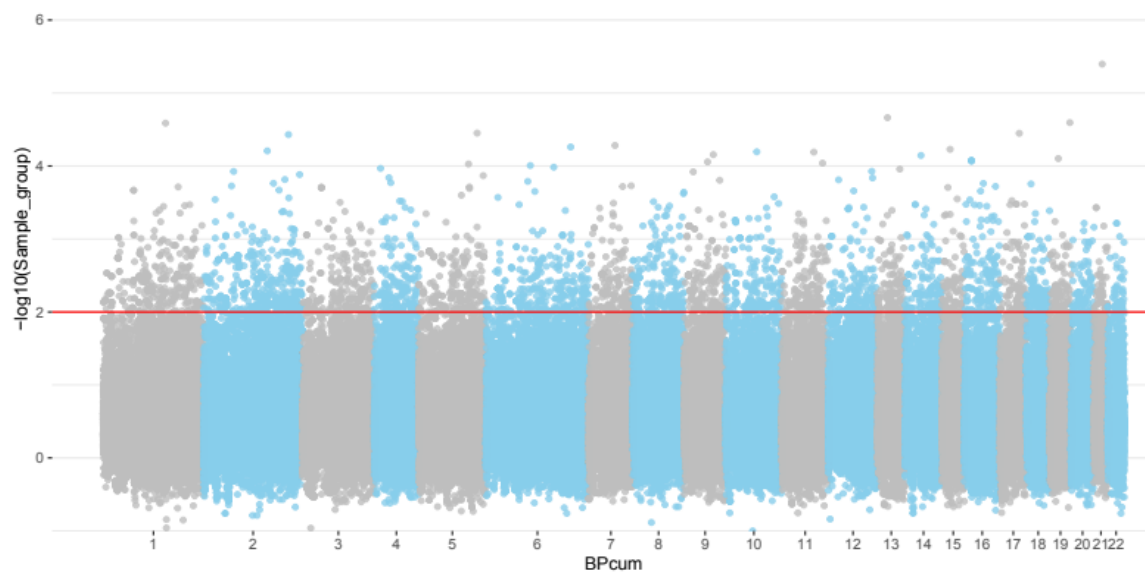
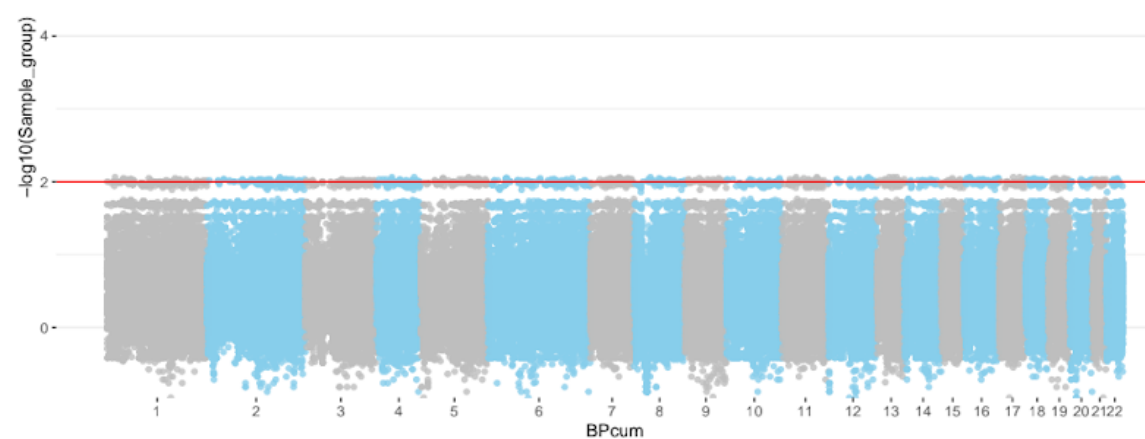
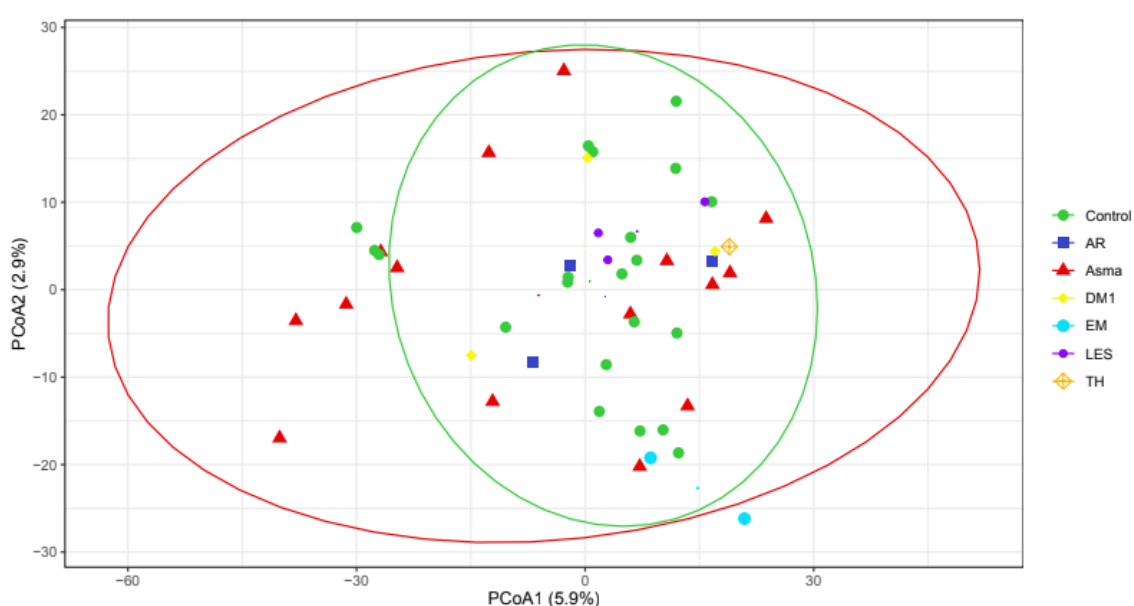


Gráfico 7 - Manhattan dos SNPs para tireoidite de Hashimoto



Assim, a partir dos resultados anteriormente apresentados, realizamos uma análise das coordenadas principais (PCoA), apresentada a seguir, que considera a distribuição dos SNPs encontrados pelos fenótipos de interesse, a partir do qual é possível comparar graficamente os resultados encontrados nos fenótipos e nos controles e entender se há uma dissimilaridade entre eles. Na figura observamos pouca segregação entre os resultados encontrados para cada fenótipo entre si e também em comparação aos controles, o que demonstra uma homogeneização dos resultados encontrados, que pode ocorrer em estudos de associação genômica principalmente devido à baixa casuística.

**Gráfico 8** - Análise de coordenadas principais (PCoA) considerando a distribuição dos SNPs pelos fenótipos



Ademais, a partir dos dados obtidos também foi possível identificar os alelos presentes no genoma dos pacientes e relacioná-los com os alelos de impacto descritos na literatura para os fenótipos estudados associados a cada SNP previamente selecionado e apresentado no item 4.3.1, de maneira que a presença deste alelo de impacto no genoma do paciente representa a relação de suscetibilidade para o fenótipo associado a cada SNP.

Com isso, para as SNPs previamente relatadas na literatura, investigamos o perfil alélico em relação aos alelos de impacto mencionados, como é exemplificado nas tabelas 4 a 9, em que, destacadas em verde, estão os marcadores em homozigose e, em amarelo, os marcadores em heterozigose.

Tabela 4 - Resultados alélicos obtidos para as variantes relacionadas a artrite reumatóide.

| ID variante      | rs11889341 | rs11933540 | rs3087243 | rs3093024 | rs71508903 | rs7731626 | rs8026898 | rs8032939 | rs9268839 |
|------------------|------------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| dbSNP            | C>T        | T>C        | G>A       | A>G/T     | C>T        | G>A/C     | G>A       | T>C       | A>C/G     |
| Alelo de impacto | T          | C          | G         | T         | T          | G         | A         | T         | G         |
| CV47             | CC         | TT         | GG        | TT        | CC         | GG        | GG        | TC        | AG        |
| CV49             | TC         | CC         | GG        | GG        | CC         | GG        | GG        | CC        | AA        |
| CV105            | CC         | TC         | GG        | GG        | TC         | GG        | AG        | TC        | AG        |
| CV189            | CC         | CC         | GG        | TG        | CC         | AG        | GG        | TT        | AA        |
| CV206            | CC         | TT         | AA        | GG        | CC         | GG        | GG        | TC        | AG        |
| CV212            | TC         | TC         | GG        | GG        | CC         | GG        | GG        | CC        | AA        |
| CV215            | CC         | TT         | AG        | TG        | TC         | AA        | AA        | CC        | AG        |
| CV219            | CC         | TT         | AG        | TG        | CC         | GG        | GG        | CC        | AA        |
| CV220            | TC         | CC         | AA        | TT        | TC         | AG        | GG        | TC        | AG        |
| CV222            | CC         | TC         | AG        | GG        | CC         | GG        | AA        | CC        | AA        |
| CV223            | CC         | TC         | AG        | GG        | CC         | GG        | AG        | CC        | AA        |
| CV225            | CC         | TC         | GG        | TG        | CC         | AG        | GG        | TC        | GG        |
| CV226            | TC         | TT         | GG        | TG        | TC         | GG        | AA        | TC        | AG        |
| CV227            | CC         | CC         | AG        | TG        | CC         | AG        | GG        | TT        | AA        |
| CV228            | TC         | TT         | AG        | TT        | CC         | GG        | GG        | CC        | AA        |
| CV229            | CC         | TT         | AA        | TT        | TC         | AG        | GG        | TC        | AA        |
| CV230            | CC         | TT         | AG        | GG        | CC         | GG        | AG        | TT        | AG        |
| CV232            | TC         | TC         | AA        | TG        | TC         | AG        | AA        | TC        | AG        |
| CV236            | TC         | TT         | AG        | TT        | TC         | GG        | AG        | TT        | AG        |
| CV241            | TC         | TC         | GG        | GG        | CC         | AG        | AG        | TC        | AG        |
| CV243            | CC         | CC         | GG        | TG        | CC         | GG        | GG        | TC        | GG        |
| CV247            | CC         | TC         | GG        | GG        | CC         | GG        | GG        | TC        | AG        |
| G3493            | TC         | TC         | AG        | GG        | TC         | AG        | GG        | TC        | AG        |
| G3494            | CC         | TC         | GG        | TT        | CC         | AG        | GG        | TC        | AA        |

Tabela 5 - Resultados alélicos obtidos para as variantes relacionadas a asma.

| ID variante      | rs10197862 | rs11078927 | rs1342326 | rs17293632 | rs1837253 | rs3771166 | rs3771180 | rs744910 | rs7848215 | rs9273349 |
|------------------|------------|------------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|
| dbSNP            | A>G        | C>T        | A>C       | C>T        | T>C       | G>A/T     | G>A/T     | G>A/T    | C>T       | T>C/G     |
| Alelo de impacto | A          | C          | C         | T          | C         | G         | T         | G        | T         | C         |
| CV47             | AG         | CC         | TT        | CC         | CC        | TG        | TC        | AA       | TT        | TC        |
| CV49             | GG         | TC         | TC        | CC         | CC        | TT        | TT        | GG       | TC        | TT        |
| CV105            | GG         | CC         | TC        | CC         | CC        | TT        | TT        | AG       | TC        | CC        |
| CV189            | AA         | CC         | TC        | CC         | TC        | TG        | CC        | AG       | TC        | TC        |
| CV206            | AA         | CC         | TC        | TC         | CC        | TT        | CC        | AG       | TC        | CC        |
| CV212            | AA         | CC         | TT        | CC         | CC        | GG        | CC        | AG       | TC        | TC        |
| CV215            | AA         | TT         | TT        | CC         | TC        | TG        | CC        | AG       | CC        | CC        |
| CV219            | AA         | TC         | TT        | CC         | CC        | GG        | CC        | AG       | CC        | TC        |
| CV220            | AA         | CC         | TT        | TC         | TC        | GG        | CC        | GG       | CC        | CC        |
| CV222            | AA         | TC         | TC        | CC         | CC        | TG        | CC        | AG       | TC        | CC        |
| CV223            | AA         | CC         | TT        | CC         | TC        | TG        | CC        | AA       | CC        | TT        |
| CV225            | AG         | CC         | TT        | CC         | TC        | TG        | TC        | AG       | CC        | TC        |
| CV226            | AA         | CC         | TT        | CC         | TC        | TT        | CC        | GG       | CC        | TC        |
| CV227            | GG         | TC         | CC        | TT         | CC        | TT        | TT        | GG       | TT        | TC        |
| CV228            | AA         | TC         | TT        | CC         | TC        | GG        | CC        | AG       | CC        | TC        |
| CV229            | AA         | TC         | TT        | TC         | CC        | TG        | CC        | GG       | TC        | TT        |
| CV230            | AA         | CC         | TT        | CC         | CC        | TG        | CC        | GG       | TC        | TT        |
| CV232            | AG         | CC         | TT        | CC         | CC        | TG        | TC        | GG       | TT        | TC        |
| CV236            | AG         | TC         | TT        | CC         | TC        | TG        | TC        | AA       | CC        | TC        |
| CV241            | AG         | CC         | TC        | CC         | TC        | TG        | TC        | AA       | TC        | CC        |
| CV243            | AA         | CC         | TT        | TC         | TC        | GG        | CC        | AG       | TC        | CC        |
| CV247            | AA         | TC         | CC        | CC         | CC        | TG        | CC        | GG       | TT        | TC        |
| G3493            | AA         | CC         | TT        | CC         | CC        | TG        | CC        | AA       | TC        | TC        |
| G3494            | AA         | TC         | TT        | CC         | TC        | TG        | CC        | AA       | CC        | TT        |

Tabela 6 - Resultados alélicos obtidos para as variantes relacionadas a diabetes mellitus tipo 1.

| ID variante      | rs1004446 | rs11171739 | rs12708716 | rs12927355 | rs2104286 | rs2476601 | rs6679677 | rs689 | rs9273363 |
|------------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-------|-----------|
| dbSNP            | G>A       | C>G/T      | A>G        | C>A/T      | T>C       | A>G/T     | C>A       | A>G/T | C>A       |
| Alelo de impacto | T         | C          | A          | C          | T         | A         | A         | A/T   | A         |
| CV47             | TT        | CC         | GG         | TT         | TT        | GG        | CC        | TT    | CC        |
| CV49             | CC        | CC         | AG         | CC         | TT        | GG        | CC        | AT    | CC        |
| CV105            | TC        | TC         | AA         | CC         | TT        | GG        | CC        | AT    | CC        |
| CV189            | TC        | TC         | GG         | TC         | TT        | GG        | CC        | AT    | AC        |
| CV206            | CC        | TT         | AA         | CC         | TT        | AG        | AC        | AA    | AC        |
| CV212            | CC        | TC         | GG         | TC         | TT        | GG        | CC        | AT    | AC        |
| CV215            | CC        | TT         | AG         | TC         | TT        | GG        | CC        | AA    | CC        |
| CV219            | CC        | TC         | AG         | TC         | TT        | GG        | CC        | AA    | AC        |
| CV220            | CC        | TC         | AG         | TC         | TT        | GG        | CC        | AA    | AC        |
| CV222            | TC        | TC         | GG         | TT         | TT        | GG        | CC        | TT    | AC        |
| CV223            | CC        | TC         | AG         | CC         | TT        | GG        | CC        | AT    | CC        |
| CV225            | TC        | TT         | AG         | TC         | TG        | GG        | CC        | TT    | CC        |
| CV226            | TT        | TC         | AA         | CC         | TG        | GG        | CC        | AT    | AC        |
| CV227            | TC        | TT         | AA         | TC         | TT        | GG        | CC        | AA    | CC        |
| CV228            | CC        | TC         | GG         | TT         | TT        | GG        | CC        | AT    | AC        |
| CV229            | TT        | TT         | AG         | CC         | TT        | GG        | CC        | AA    | CC        |
| CV230            | TC        | CC         | AG         | TC         | TT        | GG        | CC        | AT    | CC        |
| CV232            | CC        | CC         | AG         | TC         | TT        | GG        | CC        | AT    | AC        |
| CV236            | TC        | TC         | AG         | TC         | TT        | GG        | CC        | AT    | CC        |
| CV241            | CC        | TT         | AA         | CC         | TT        | GG        | CC        | AA    | CC        |
| CV243            | CC        | TC         | AG         | CC         | TT        | GG        | CC        | AT    | AC        |
| CV247            | TC        | TC         | AG         | TC         | TG        | AG        | AC        | AT    | AC        |
| G3493            | TC        | TT         | AG         | TC         | TT        | GG        | CC        | AA    | AC        |
| G3494            | TC        | TC         | AG         | TC         | TT        | GG        | CC        | AA    | CC        |

Tabela 7 - Resultados alélicos obtidos para as variantes relacionadas a esclerose múltipla.

| ID variante      | rs1077667 | rs12927355 | rs1323292 | rs1738074 | rs1800693 | rs2104286 | rs3104373 | rs3129889 | rs3135388 | rs9271366 |
|------------------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| dbSNP            | C>G/T     | C>A/T      | G>A/C     | T>C       | T>C       | T>C       | T>A/C/G   | G>A/C/T   | A>C/G/T   | G>A/C/T   |
| Alelo de impacto | G         | C          | A         | C         | C         | T         | T         | G         | A         | G         |
| CV47             | GG        | TT         | AA        | AC        | AC        | TT        | GG        | AA        | CC        | AA        |
| CV49             | GG        | CC         | AA        | AA        | AC        | TT        | TG        | AA        | CC        | AG        |
| CV105            | AG        | CC         | AA        | AC        | CC        | TT        | GG        | AA        | CC        | AA        |
| CV189            | AG        | TC         | AA        | AA        | CC        | TT        | GG        | AA        | CC        | AA        |
| CV206            | GG        | CC         | AA        | CC        | AA        | TT        | GG        | AA        | CC        | AA        |
| CV212            | AG        | TC         | AA        | AA        | AA        | TT        | GG        | AA        | CC        | AA        |
| CV215            | GG        | TC         | AA        | AA        | CC        | TT        | GG        | AA        | CC        | AA        |
| CV219            | GG        | TC         | AA        | AC        | AC        | TT        | TG        | AA        | CC        | AA        |
| CV220            | GG        | TC         | AA        | AC        | AC        | TT        | GG        | AA        | CC        | AA        |
| CV222            | GG        | TT         | AA        | AA        | AA        | TT        | GG        | AA        | CC        | AA        |
| CV223            | GG        | CC         | AA        | AA        | AA        | TT        | TG        | AA        | CC        | AG        |
| CV225            | AA        | TC         | AA        | AC        | AC        | TG        | GG        | AA        | CC        | AA        |
| CV226            | GG        | CC         | AA        | CC        | AA        | TG        | GG        | AA        | CC        | AA        |
| CV227            | GG        | TC         | CC        | CC        | CC        | TT        | TG        | AG        | AC        | AG        |
| CV228            | GG        | TT         | AA        | AA        | AA        | TT        | GG        | AA        | CC        | AA        |
| CV229            | GG        | CC         | AC        | CC        | AC        | TT        | TG        | AG        | AC        | AG        |
| CV230            | GG        | TC         | AA        | AA        | AA        | TT        | GG        | AA        | CC        | AA        |
| CV232            | GG        | TC         | AA        | AC        | AC        | TT        | GG        | AA        | CC        | AA        |
| CV236            | AG        | TC         | AA        | AA        | CC        | TT        | GG        | AA        | CC        | AA        |
| CV241            | AG        | CC         | AA        | AA        | AC        | TT        | GG        | AA        | CC        | AA        |
| CV243            | AG        | CC         | AA        | AC        | AA        | TT        | GG        | AA        | CC        | AA        |
| CV247            | GG        | TC         | AA        | CC        | AC        | TG        | GG        | AG        | AC        | AA        |
| G3493            | AG        | TC         | AC        | AC        | CC        | TT        | GG        | AA        | CC        | AA        |
| G3494            | GG        | TC         | AA        | CC        | AC        | TT        | GG        | AA        | CC        | AA        |

Tabela 8 - Resultados alélicos obtidos para as variantes relacionadas a lúpus.

| ID variante      | rs10036748 | rs1049564 | rs11574637 | rs13277113 | rs1801274 | rs2304256 | rs6914831 | rs729302 | rs7574865 | rs7726414 |
|------------------|------------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|
| dbSNP            | C>A/T      | G>A       | T>C        | G>A/T      | A>C/G     | C>A       | C>G/T     | A>C      | T>A/G     | C>T       |
| Alelo de impacto | T          | T         | C          | A          | C         | C         | C         | A        | T         | T         |
| CV47             | CC         | CC        | TT         | AA         | CC        | AA        | CC        | AA       | GG        | TC        |
| CV49             | TT         | CC        | TT         | GG         | TT        | CC        | TT        | AC       | TG        | CC        |
| CV105            | TC         | TC        | TT         | GG         | CC        | CC        | TC        | AC       | GG        | TC        |
| CV189            | TC         | TC        | TT         | GG         | CC        | CC        | CC        | AA       | GG        | TC        |
| CV206            | CC         | CC        | TT         | AG         | CC        | AA        | TC        | CC       | GG        | TC        |
| CV212            | TC         | CC        | TT         | AG         | CC        | CC        | CC        | AA       | TG        | TC        |
| CV215            | TT         | TC        | CC         | GG         | TC        | AC        | TT        | AA       | GG        | CC        |
| CV219            | TT         | TC        | TC         | AG         | CC        | CC        | TC        | AA       | GG        | TC        |
| CV220            | TC         | CC        | TC         | AG         | CC        | CC        | TT        | AA       | TG        | CC        |
| CV222            | TC         | CC        | TT         | GG         | CC        | CC        | CC        | AC       | GG        | CC        |
| CV223            | TT         | CC        | TT         | GG         | TT        | CC        | TT        | AA       | GG        | CC        |
| CV225            | TC         | CC        | TC         | GG         | CC        | AC        | TT        | AC       | GG        | CC        |
| CV226            | CC         | TC        | TC         | GG         | CC        | CC        | TC        | AC       | TG        | TC        |
| CV227            | TC         | TC        | TT         | AG         | CC        | AC        | TC        | AA       | GG        | TT        |
| CV228            | TC         | CC        | TC         | AG         | CC        | CC        | TT        | AA       | TG        | CC        |
| CV229            | CC         | CC        | TC         | GG         | TT        | AC        | CC        | AA       | GG        | TC        |
| CV230            | TT         | TC        | TT         | AG         | CC        | CC        | TC        | AA       | GG        | TC        |
| CV232            | TC         | CC        | TT         | GG         | TC        | AC        | TC        | CC       | TG        | CC        |
| CV236            | CC         | CC        | TT         | GG         | TC        | CC        | TC        | AC       | TG        | CC        |
| CV241            | TC         | CC        | TC         | GG         | TC        | AC        | TC        | AA       | TG        | TC        |
| CV243            | CC         | TT        | TC         | AG         | TC        | CC        | TC        | AA       | GG        | TC        |
| CV247            | CC         | CC        | TT         | GG         | CC        | CC        | CC        | AA       | GG        | TC        |
| G3493            | TC         | CC        | TT         | GG         | TT        | CC        | TT        | AC       | TG        | CC        |
| G3494            | CC         | TC        | TT         | AG         | CC        | CC        | TC        | AC       | GG        | CC        |

Tabela 9 - Resultados alélicos obtidos para as variantes relacionadas a tireoidite de Hashimoto.

| ID variante      | rs11247367 | rs170884 | rs231775 | rs2476601 | rs9277555 |
|------------------|------------|----------|----------|-----------|-----------|
| dbSNP            | G>A        | C>A      | A>G/T    | A>G/T     | G>A       |
| Alelo de impacto | G          | A        | G        | A         | G         |
| CV47             | GG         | AA       | GG       | GG        | AA        |
| CV49             | AG         | AA       | AG       | GG        | AG        |
| CV105            | GG         | AA       | AA       | GG        | AG        |
| CV189            | GG         | AA       | GG       | GG        | AG        |
| CV206            | GG         | AA       | AA       | AG        | GG        |
| CV212            | GG         | AA       | GG       | GG        | GG        |
| CV215            | AA         | AA       | AG       | GG        | AG        |
| CV219            | GG         | AA       | AA       | GG        | GG        |
| CV220            | GG         | AA       | AA       | GG        | GG        |
| CV222            | GG         | AA       | AA       | GG        | AG        |
| CV223            | GG         | AA       | AG       | GG        | AA        |
| CV225            | GG         | AA       | GG       | GG        | GG        |
| CV226            | GG         | AA       | AG       | GG        | GG        |
| CV227            | GG         | AA       | AG       | GG        | GG        |
| CV228            | AG         | AA       | AG       | GG        | AG        |
| CV229            | GG         | AA       | AA       | GG        | GG        |
| CV230            | GG         | AA       | AG       | GG        | AG        |
| CV232            | GG         | AA       | AA       | GG        | AA        |
| CV236            | GG         | AA       | AA       | GG        | AG        |
| CV241            | GG         | AA       | AG       | GG        | AA        |
| CV243            | GG         | AA       | AG       | GG        | GG        |
| CV247            | GG         | AA       | AG       | AG        | AA        |
| G3493            | GG         | AA       | AA       | GG        | GG        |
| G3494            | GG         | AA       | GG       | GG        | AG        |

#### **4.3.3. Interpretação dos resultados obtidos**

Desta forma, por meio da análise dos dados apresentados nos gráficos da Manhattan, foi possível filtrar e identificar 15 SNPs, para cada uma das doenças autoimunes selecionadas para este projeto, em que encontramos o menor valor-P apresentado na casuística selecionada. O valor-P nos permite investigar de maneira estatística a associação das variantes na população de casos e de controles, de forma que quanto menor seu valor, estatisticamente mais relacionado ao fenótipo apresentado é a variante. Assim, os SNPs identificados foram compilados e apresentados na tabela 10.

Tabela 10 - SNPs com menor valor-P identificados para as doenças de interesse.

|                                                                             |                              |                 |                     |                     |                                     |                  |                 |                     |                     |                 |                                  |                     |                 |                 |                     |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|-------------------------------------|------------------|-----------------|---------------------|---------------------|-----------------|----------------------------------|---------------------|-----------------|-----------------|---------------------|------------------|
| SNPs com menor valor-P identificados para a doença artrite reumatóide       | ID Variante                  | rs2721775       | rs7147286           | rs2857143           | rs4922518                           | rs2517582        | rs4954240       | rs4692607           | rs9883587           | rs7667496       | rs17866161                       | rs2250057           | rs9888739       | rs1233591       | rs10836156          | rs4759490        |
|                                                                             | Gene                         | Intergênica     | <i>GCH1</i>         | Intergênica         | <i>ZNF488</i>                       | <i>LINC02570</i> | <i>ZRANB3</i>   | Intergênica         | Intergênica         | <i>NFKB1</i>    | Intergênica                      | <i>TSC1</i>         | <i>ITGAM</i>    | Intergênica     | <i>NAT10</i>        | <i>RIMBP2</i>    |
|                                                                             | Coordenada genômica (GRCh38) | Chr5: 71836524  | Chr14: 54891947     | Chr6: 32804859      | Chr10: 47371089                     | Chr6: 30840985   | Chr2: 135335299 | Chr4: 168078804     | Chr3: 72334344      | Chr4: 102588298 | Chr4: 117733544                  | Chr9: 132899816     | Chr16: 31301932 | Chr6: 28753205  | Chr11: 34113379     | Chr12: 130533446 |
| SNPs com menor valor-P identificados para a doença asma                     | ID Variante                  | rs11745587      | rs7754730           | rs8132309           | rs16903255                          | rs10043792       | rs6429080       | rs7022025           | rs10456391          | rs7379261       | rs2676192                        | rs12192713          | rs12649067      | rs12634229      | rs10484750          | rs9260734        |
|                                                                             | Gene                         | <i>IRF1-AS1</i> | Intergênica         | Intergênica         | <i>LINC00461</i>                    | <i>HCN1</i>      | Intergênica     | Intergênica         | <i>PSORS1C1</i>     | <i>SV2C</i>     | <i>ADARB2</i>                    | Intergênica         | <i>TEC</i>      | Intergênica     | Intergênica         | Intergênica      |
|                                                                             | Coordenada genômica (GRCh38) | Chr5: 132461230 | Chr6: 121674743     | Chr21: 29473553     | Chr5: 88575760                      | Chr5: 45537518   | Chr1: 238513154 | Chr9: 122349674     | Chr6: 31134600      | Chr5: 75989184  | Chr10: 1463279                   | Chr6: 33001079      | Chr4: 48164196  | Chr3: 112657461 | Chr6: 8378376       | Chr6: 29964889   |
| SNPs com menor valor-P identificados para a doença diabetes mellitus tipo 1 | ID Variante                  | rs9878930       | rs2224724           | rs9455754           | rs4680514                           | rs12895434       | rs9602702       | rs17636328          | rs12648320          | rs12532855      | rs12532870                       | rs10777722          | rs10072615      | rs12803088      | rs13396159          | rs1498553        |
|                                                                             | Gene                         | Intergênica     | <i>FGF14</i>        | <i>LOC10798655</i>  | <i>SCHIP1</i><br><i>IQCJ-SCHIP1</i> | Intergênica      | Intergênica     | <i>LINC02520</i>    | <i>CCSER1</i>       | <i>HECW1</i>    | <i>HECW1</i>                     | <i>NTN4</i>         | <i>IL17B</i>    | <i>TENM4</i>    | <i>LRRTM4</i>       | <i>TRIM22</i>    |
|                                                                             | Coordenada genômica (GRCh38) | Chr3: 147558974 | Chr13: 101963585    | Chr6: 168876951     | Chr3: 159743667                     | Chr14: 27232581  | Chr13: 85237241 | Chr6: 37522755      | Chr4: 91401182      | Chr7: 43306972  | Chr7: 43307079                   | Chr12: 95729192     | Chr5: 149396166 | Chr11: 79315329 | Chr2: 76749451      | Chr11: 5687798   |
| SNPs com menor valor-P identificados para a doença esclerose múltipla       | ID Variante                  | rs1256208       | rs3810874           | rs9419569           | rs3809983                           | rs561937         | rs3118988       | rs6693979           | rs12675797          | rs2171210       | rs10505870                       | rs13274079          | rs910786        | rs890610        | rs1521849           | rs7596785        |
|                                                                             | Gene                         | Intergênica     | <i>CLDN12</i>       | Intergênica         | <i>ALPK2</i>                        | <i>FRY</i>       | <i>RABGAP1L</i> | <i>RABGAP1L</i>     | Intergênica         | <i>SYTL3</i>    | <i>SLCO1B3</i><br><i>SLCO1B7</i> | <i>C8orf37-AS1</i>  | <i>SYNE3</i>    | <i>PCSK2</i>    | <i>LOC101928174</i> | <i>MROH2A</i>    |
|                                                                             | Coordenada genômica (GRCh38) | Chr3: 12265882  | Chr7: 90413543      | Chr10: 131709545    | Chr18: 58535536                     | Chr13: 32148665  | Chr1: 174819245 | Chr1: 174882798     | Chr8: 86848950      | Chr6: 158740396 | Chr12: 21018962                  | Chr8: 95438621      | Chr14: 95427943 | Chr20: 17396860 | Chr15: 34769576     | Chr2: 233785531  |
| SNPs com menor valor-P identificados para a doença lúpus                    | ID Variante                  | rs332496        | rs10002393          | rs9509128           | rs7299271                           | rs897200         | rs7727791       | rs13120366          | rs7310889           | rs4670007       | rs7021973                        | rs13213319          | rs1391397       | rs1838793       | rs1364295           | rs10502318       |
|                                                                             | Gene                         | Intergênica     | Intergênica         | Intergênica         | <i>COL2A1/SENPI</i>                 | <i>STAT4</i>     | Intergênica     | Intergênica         | <i>LINC02424</i>    | Intergênica     | <i>KDM4C</i>                     | <i>LOC105377848</i> | Intergênica     | Intergênica     | <i>WWOX</i>         | <i>DLGAP1</i>    |
|                                                                             | Coordenada genômica (GRCh38) | Chr6: 92746157  | Chr4: 81865758      | Chr13: 20284636     | Chr12: 48020275                     | Chr2: 191153045  | Chr5: 57542093  | Chr4: 112472929     | Chr12: 78437830     | Chr2: 14553556  | Chr9: 7085619                    | Chr6: 70371673      | Chr4: 125052410 | Chr2: 46219611  | Chr16: 78667092     | Chr18: 4019327   |
| SNPs com menor valor-P identificados para a doença tireoidite de Hashimoto  | ID Variante                  | rs2529051       | rs1854936           | rs4427687           | rs7333728                           | rs10766122       | rs2400891       | rs4986073           | rs16970582          | rs13137167      | rs4762758                        | rs4944000           | rs723794        | rs2251692       | rs1812395           | rs7915167        |
|                                                                             | Gene                         | Intergênica     | <i>LOC105370259</i> | <i>LOC105370259</i> | <i>LOC105370259</i>                 | Intergênica      | <i>ARHGEF37</i> | <i>LOC105371908</i> | <i>LOC105371908</i> | Intergênica     | <i>PDE3A</i>                     | <i>LOC107984361</i> | Intergênica     | Intergênica     | Intergênica         | <i>NMT2</i>      |
|                                                                             | Coordenada genômica (GRCh38) | Chr7: 24554687  | Chr13: 74307349     | Chr13: 74309197     | Chr13: 74307161                     | Chr11: 13932022  | Chr5: 149609559 | Chr17: 77836696     | Chr17: 77836329     | Chr4: 135811650 | Chr12: 20461725                  | Chr11: 87748987     | Chr4: 145954399 | Chr2: 226725064 | Chr15: 56773966     | Chr10: 15163721  |

Além disso, por meio da análise dos dados alélicos demonstrados nas tabelas 5 e 7, foi possível identificar também, um paciente, cuja amostra foi identificada por CV215, que desenvolveu asma após a infecção pelo vírus SARS-CoV-2, em que observamos, após interpretação dos dados genômicos, compatibilidade alélica para cinco das dez variantes genômicas previamente selecionadas associadas a doença desenvolvida (rs10197862, rs1837253, rs3771166, rs744910 e rs9273349). Sendo que, dois destes SNPs apresentaram-se em homozigose para o alelo de impacto (rs10197862 e rs9273349), conforme apresentado na tabela 11.

Além deste, identificamos também outros dois pacientes, cujas amostras foram identificadas por G3493 e G3494, que desenvolveram esclerose múltipla pós COVID-19 e, após interpretação dos dados genômicos, apresentaram compatibilidade alélica para seis das dez variantes genômicas previamente selecionadas associadas à esta doença (rs1077667, rs12927355, rs1323292, rs1738074, rs1800693 e rs2104286). Assim, o paciente G3493 possui dois destes SNPs em homozigose para o alelo de impacto (rs1800693 e rs2104286), enquanto o paciente G3494, possui quatro destes SNPs em homozigose para o alelo de impacto (rs1077667, rs1323292, rs178074 e rs2104286), conforme apresentado na tabela a seguir.

**Tabela 11** - Resultados encontrados para os pacientes CV215, G3493 e G3494.

(continua)

| Paciente | SNP        | Gene                | Alelo de Impacto | Zigossidade  | Coordenada Genômica (GRCh38) |
|----------|------------|---------------------|------------------|--------------|------------------------------|
| CV215    | rs10197862 | <i>IL1RL1</i>       | A                | Homozigose   | Chr2: 102350089              |
|          | rs1837253  | Intergênica         | C                | Heterozigose | Chr5: 111066174              |
|          | rs3771166  | <i>IL18R1</i>       | G                | Heterozigose | Chr2: 102369762              |
|          | rs744910   | <i>SMAD3</i>        | G                | Heterozigose | Chr15: 67154447              |
|          | rs9273349  | <i>HLA-DQB1-AS1</i> | C                | Homozigose   | Chr6: 32658092               |
| G3493    | rs1077667  | <i>TNFSF14</i>      | G                | Heterozigose | Chr19: 6668961               |
|          | rs12927355 | <i>CLEC16A</i>      | C                | Heterozigose | Chr16: 11100914              |
|          | rs1323292  | <i>LOC105371664</i> | A                | Heterozigose | Chr1: 192571891              |
|          | rs1738074  | <i>TAGAP</i>        | C                | Heterozigose | Chr6: 159044945              |
|          | rs1800693  | <i>TNFRSF1A</i>     | C                | Homozigose   | Chr12: 6330843               |
|          | rs2104286  | <i>IL2RA</i>        | T                | Homozigose   | Chr10: 6057082               |
| G3494    | rs1077667  | <i>TNFSF14</i>      | G                | Homozigose   | Chr19: 6668961               |
|          | rs12927355 | <i>CLEC16A</i>      | C                | Heterozigose | Chr16: 11100914              |
|          | rs1323292  | <i>LOC105371664</i> | A                | Homozigose   | Chr1: 192571891              |

**Tabela 11** - Resultados encontrados para os pacientes CV215, G3493 e G3494.

(continuação)

| Paciente | SNP       | Gene            | Alelo de Impacto | Zigosidade   | Coordenada Genômica (GRCh38) |
|----------|-----------|-----------------|------------------|--------------|------------------------------|
| G3494    | rs1738074 | <i>TAGAP</i>    | C                | Homozigose   | Chr6: 159044945              |
|          | rs1800693 | <i>TNFRSF1A</i> | C                | Heterozigose | Chr12: 6330843               |
|          | rs2104286 | <i>IL2RA</i>    | T                | Homozigose   | Chr10: 6057082               |

(conclusão)

Assim, identificamos que o paciente CV215 apresenta homozigose alélica para as variantes rs10197862 no gene *IL1RL1* e rs9273349 no gene *HLA-DQB1-AS1*, enquanto ambos pacientes G3493 e G3494 possuem homozigose alélica para a mesma variante rs2104286 no gene *IL2RA*, o que pode demonstrar uma associação genótipo-fenótipo mais forte para esta variante, tendo em vista o valor-P associado,  $p=2,16 \times 10^{-7}$ , que a define como estatisticamente significativa ao fenótipo encontrado e estudos anteriores que demonstram sua relação com a doença de esclerose múltipla<sup>19</sup>.

Os resultados obtidos a partir do experimento possibilitaram identificar SNPs de suscetibilidade estatisticamente relacionados aos fenótipos estudados e também uma descoberta a respeito da relação genótipo-fenótipo ao considerar as relações de homozigose e heterozigose para o alelo de impacto associado a cada SNP, pois estas relações de zigosidade podem afetar ainda as relações de suscetibilidade de forma ainda desconhecida.

## **5. DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, realizamos uma triagem genômica a fim de identificar a presença de variantes genômicas conhecidas como polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em indivíduos que desenvolveram determinadas doenças autoimunes, sendo estas: artrite reumatóide, asma, diabetes mellitus tipo 1, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico e tireoidite de Hashimoto, após a infecção pelo vírus SARS-CoV-2. Para isso, filtramos e identificamos quinze SNPs, que apresentaram os menores valores-P na casuística selecionada e, portanto, que podem estar associadas a uma suscetibilidade genética para o desenvolvimento destas doenças.

A partir dos dados obtidos por meio da triagem genômica, identificamos os valores-P associados a cada variante e geramos gráficos que nos permitiram analisar a significância dos SNPs encontrados com base em seus valores-P e também correlacionar os resultados apresentados pelos casos e pelos controles. Os resultados apresentados nos gráficos de Manhattan nos permitiram observar, mesmo com a limitação de uma casuística relativamente pequena, a existência de marcadores significativamente associados aos fenótipos estudados.

Além disso, identificamos de forma relevante na casuística estudada duas variantes, em especial, relacionadas a fenótipos de interesse para o estudo, previamente relatadas na literatura, sendo: rs11745587, no gene *IRF1-AS1*, relacionada à asma severa, e a variante rs988739, no gene *ITGAM*, relacionada ao lúpus eritematoso sistêmico. O SNP rs11745587 apesar de se encontrar dentro de uma região não traduzida, conhecida por 3'UTR de C5orf56, está próximo dos genes da citocina T<sub>H</sub>2 *IL4* e *IL13*, e *RAD50*, região previamente relatada para associação sugestiva com asma grave, o que pode indicar uma relação com o fenótipo<sup>20</sup>.

Já o gene *ITGAM*, em que se localiza a variante rs988739, codifica a cadeia de integrina alfa M, que são proteínas integrais de membrana, o domínio contendo a integrina alfa combina com a cadeia beta 2 para formar uma integrina específica de leucócitos referida como receptor 1 de macrófagos. A integrina alfa M beta 2 é importante na adesão de neutrófilos e monócitos ao endotélio estimulado, e também na fagocitose de partículas revestidas de complemento<sup>21,22</sup>. Ademais, vários estudos demonstraram variações no gene *ITGAM* como um fator de risco relacionado à suscetibilidade à doença e provavelmente a manifestações graves de lúpus eritematoso sistêmico, assim, uma variante como a rs988739 pode alterar a função deste gene, possivelmente desencadeando doenças como o lúpus<sup>23</sup>.

Também selecionamos cinco a dez SNPs, com os menores valores-P, previamente associadas a estudos que evidenciam uma maior relação de suscetibilidade entre estas

variantes e as doenças autoimunes de interesse para este projeto. A partir desta seleção, realizamos uma triagem genômica a fim de identificar a presença destes SNPs de suscetibilidade em indivíduos que desenvolveram estas doenças após a infecção pelo vírus SARS-CoV-2.

Nossa análise permitiu identificar relações de homozigose para as variantes rs10197862 no gene *IL1RL1* e rs9273349 no gene *HLA-DQB1* em um paciente (CV215) que relatou o aparecimento e diagnóstico de asma após infecção pelo vírus SARS-CoV-2. O gene *IL1RL1* codifica uma proteína membro da família de receptores de interleucina 1, que faz parte de um agrupamento de genes de receptores de citocinas, alguns estudos sugerem ainda que este gene esteja relacionado com estímulos pró-inflamatórios, e pode estar envolvido na função de células T auxiliares, assim, uma variante neste gene pode alterar seu funcionamento gerando doenças, tal como a asma<sup>24</sup>.

Já o gene *HLA-DQB1*, faz parte de uma família de genes chamada complexo de antígeno leucocitário humano (HLA), que ajuda o sistema imunológico a distinguir as proteínas do próprio corpo das proteínas produzidas por organismos invasores como vírus e bactérias. O gene *HLA-DQB1* pertence a um grupo de genes que codificam proteínas presentes na superfície de certas células do sistema imunológico, essas proteínas se ligam a fragmentos de proteínas (peptídeos) fora da célula e exibem esses peptídeos ao sistema imunológico, desencadeando uma resposta do sistema imune para o combate de organismos invasores, no entanto, uma variante como a rs9273349, pode alterar a função deste gene de maneira a confundir os peptídeos apresentados, gerando reações de autoimunidade<sup>25</sup>.

Além deste, identificamos também relações de homozigose para a variante rs2104286, no gene *IL2RA*, em dois pacientes estudados (G3493 e G3494) que relataram o desenvolvimento e diagnóstico da doença esclerose múltipla após contrair COVID-19 em entrevista realizada após coleta das amostras e triagem genômica.

O gene *IL2RA*, em que se localiza a variante rs2104286, codifica a subunidade alfa do receptor de superfície celular para o fator de crescimento de células T interleucina-2, que desempenha um papel vital na manutenção do sistema imunológico, ao ser expresso em células T reguladoras que estão envolvidas tanto na regulação da tolerância quanto na expansão das células T<sup>26</sup>, com isso, esta variante pode alterar a função do gene, o que pode gerar uma doença autoimune ao modificar a função de tolerância das células T reguladoras.

Além disso, um estudo de associação genômica realizado no Reino Unido e nos Estados Unidos identificou dois SNPs, rs12722489 e rs2104286, no íntron 1 do gene *IL2RA*, que foram fortemente associados à esclerose múltipla e possuíam, respectivamente, os

seguintes valores-P:  $p=2,96 \times 10^{-8}$  e  $p=2,16 \times 10^{-7}$ , sendo o segundo um dos SNPs de interesse deste projeto, a evidência encontrada neste estudo de que certos alelos codificando o gene *IL2RA*, dentre eles os relacionados ao SNP rs2104286, estão associados com a doença esclerose múltipla apoia a ideia de que polimorfismos em genes relacionados à regulação da resposta imune são fatores importantes na esclerose múltipla<sup>19</sup>.

Ademais, na literatura também foram encontradas associações entre a doença esclerose múltipla e a variante genômica rs2104286 em 211 pacientes e 521 parentes não afetados de 43 famílias, ou seja, famílias que apresentam mais de um indivíduo afetado, para a doença de esclerose múltipla<sup>27</sup>.

No cenário atual, a doença COVID-19 representa um desafio global para as políticas de saúde, incluindo as diversas doenças relatadas após a doença. Além disso, a investigação de SNPs específicos pode contribuir diretamente para aprimorar o entendimento de variantes genômicas consideradas como um possível gatilho para importantes doenças autoimunes.

## **6. CONCLUSÃO**

## 6. CONCLUSÃO

Foi possível identificar SNPs em genes que aumentam a suscetibilidade para o desenvolvimento de doenças autoimunes em indivíduos após infecção por COVID-19 por meio da técnica de SNP-*array* com uso do Infinium ImmunoArray-24 v2 BeadChip. Além disso, também foi possível identificar os SNPs de suscetibilidade associados às seis doenças autoimunes, selecionadas para este projeto, sendo estas doenças: artrite reumatóide, asma, diabetes mellitus tipo 1, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico e tireoidite de Hashimoto, em indivíduos infectados pelo vírus SARS-CoV-2.

Ademais, identificamos esta predisposição em pacientes que, de fato, apresentaram os primeiros sintomas após a COVID-19. Assim, a investigação de SNPs específicos pode contribuir diretamente para aprimorar o entendimento de variantes genômicas consideradas como um possível gatilho para doenças autoimunes de impacto importante na população, como a esclerose múltipla, encontrada no nosso estudo.

## **7. REFERÊNCIAS**

## 7. REFERÊNCIAS

1. Lotfi M, Hamblin MR, Rezaei N. COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities. *Clin Chim Acta*. 2020 Sep;508:254-266. doi: 10.1016/j.cca.2020.05.044. Epub 2020 May 29. PMID: 32474009; PMCID: PMC7256510.
2. Umakanthan S, Sahu P, Ranade AV, Bukelo MM, Rao JS, Abrahao-Machado LF, Dahal S, Kumar H, Kv D. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgrad Med J*. 2020 Dec;96(1142):753-758. doi: 10.1136/postgradmedj-2020-138234. Epub 2020 Jun 20. PMID: 32563999.
3. Jiang F, Deng L, Zhang L, Cai Y, Cheung CW, Xia Z. Review of the Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *J Gen Intern Med*. 2020 May;35(5):1545-1549. doi: 10.1007/s11606-020-05762-w. Epub 2020 Mar 4. PMID: 32133578; PMCID: PMC7088708.
4. Cañas CA. The triggering of post-COVID-19 autoimmunity phenomena could be associated with both transient immunosuppression and an inappropriate form of immune reconstitution in susceptible individuals. *Med Hypotheses*. 2020 Dec;145:110345. doi: 10.1016/j.mehy.2020.110345. Epub 2020 Oct 14. PMID: 33080459; PMCID: PMC7556280.
5. Liu Y, Sawalha AH, Lu Q. COVID-19 and autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol*. 2021 Mar 1;33(2):155-162. doi: 10.1097/BOR.0000000000000776. PMID: 33332890; PMCID: PMC7880581.
6. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med*. 2015 Oct;278(4):369-95. doi: 10.1111/joim.12395. Epub 2015 Jul 25. PMID: 26212387.
7. Alzabin S, Venables PJ. Etiology of autoimmune disease: past, present and future. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012 Feb;8(2):111-3. doi: 10.1586/eci.11.88. PMID: 22288447.
8. Alexander T, Sharrack B, Rovira M, Farge D, Snowden JA. Autoimmune Disease. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 7th ed. Cham (CH): Springer; 2019. Chapter 91. PMID: 32091795.
9. Tolentino Júnior DS. Estudo da prevalência de doenças autoimunes na microrregião de saúde de Águas Formosas - Minas Gerais - Brasil. Teófilo Otoni: 2017. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade. Disponível em: <[http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/bitstream/1/1636/1/dilceu\\_silveira\\_tolentino\\_junior.pdf](http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/bitstream/1/1636/1/dilceu_silveira_tolentino_junior.pdf)>
10. Niewold TB, Goulielmos GN, Tikly M, Assassi S. Autoimmune disease genetics. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:262858. doi: 10.1155/2012/262858. Epub 2012 Dec 24. PMID: 23320016; PMCID: PMC3540923.
11. Christen U. Pathogen infection and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*. 2019 Jan;195(1):10-14. doi: 10.1111/cei.13239. PMID: 30569518; PMCID: PMC6300646.

12. Wastowski IJ, Carvalho IF de, Donadi EA. Patogenia das doenças auto-imunes. In: *Imunologia Clínica na Prática Médica*. São Paulo: Atheneu; 2009. ISBN: 9788573799200.
13. Soremekun OS, Soliman MES. From genomic variation to protein aberration: Mutational analysis of single nucleotide polymorphism present in ULBP6 gene and implication in immune response. *Comput Biol Med*. 2019 Aug;111:103354. doi: 10.1016/j.combiomed.2019.103354. Epub 2019 Jul 10. PMID: 31302457.
14. Wakui M. [Analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs)]. *Rinsho Byori*. 2013 Nov;61(11):1008-17. Japanese. PMID: 24450106.
15. Silva M, de Leeuw N, Mann K, Schuring-Blom H, Morgan S, Giardino D, Rack K, Hastings R. European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. *Eur J Hum Genet*. 2019 Jan;27(1):1-16. doi: 10.1038/s41431-018-0244-x. Epub 2018 Oct 1. PMID: 30275486; PMCID: PMC6303289.
16. Turchetto-Zolet AC, Turchetto C, Zanella CM, Passaia G. *Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181 p. ISBN 978-85-89265-26-3
17. Lifton RP, Boyden LM. Genetic Approaches to Human Disease. In: *Genetic Diseases of the Kidney*. San Diego: Academic Press; 2009. doi: 10.1016/B978-0-12-449851-8.00001-2 ISBN: 9780124498518
18. Cook DE, Ryckman KR, Murray JC. Generating Manhattan Plots in Stata. *The Stata Journal*. 2013;13(2):323-328. doi:10.1177/1536867X1301300206
19. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivins AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR, Hauser SL. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med*. 2007 Aug 30;357(9):851-62. doi: 10.1056/NEJMoa073493. Epub 2007 Jul 29. PMID: 17660530.
20. Wan YI, Shrine NR, Soler Artigas M, Wain LV, Blakey JD, Moffatt MF, Bush A, Chung KF, Cookson WO, Strachan DP, Heaney L, Al-Momani BA, Mansur AH, Manney S, Thomson NC, Chaudhuri R, Brightling CE, Bafadhel M, Singapuri A, Niven R, Simpson A, Holloway JW, Howarth PH, Hui J, Musk AW, James AL; Australian Asthma Genetics Consortium, Brown MA, Baltic S, Ferreira MA, Thompson PJ, Tobin MD, Sayers I, Hall IP. Genome-wide association study to identify genetic determinants of severe asthma. *Thorax*. 2012 Sep;67(9):762-8. doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-201262. Epub 2012 May 5. PMID: 22561531.
21. Sobieszek G, Mlak R, Powrózek T, Mazurek M, Skwarek-Dziekanowska A, Terlecki P, Małecka-Massalska T. Polymorphism of the ITGAM gene (rs7193943) and bioelectric impedance analysis as potential predictors of cachexia in chronic heart failure. *Sci Rep*. 2021 Oct 11;11(1):20145. doi: 10.1038/s41598-021-99719-6. PMID: 34635743; PMCID: PMC8505625.
22. Ramírez-Bello J, Sun C, Valencia-Pacheco G, Singh B, Barbosa-Cobos RE, Saavedra MA, López-Villanueva RF, Nath SK. ITGAM is a risk factor to systemic lupus erythematosus and possibly a protection factor to rheumatoid arthritis in patients from

- Mexico. PLoS One. 2019 Nov 27;14(11):e0224543. doi: 10.1371/journal.pone.0224543. PMID: 31774828; PMCID: PMC6881022.
23. Yang W, Zhao M, Hirankarn N, Lau CS, Mok CC, Chan TM, Wong RW, Lee KW, Mok MY, Wong SN, Avihingsanon Y, Lin IO, Lee TL, Ho MH, Lee PP, Wong WH, Sham PC, Lau YL. ITGAM is associated with disease susceptibility and renal nephritis of systemic lupus erythematosus in Hong Kong Chinese and Thai. *Hum Mol Genet.* 2009 Jun 1;18(11):2063-70. doi: 10.1093/hmg/ddp118. Epub 2009 Mar 13. PMID: 19286673; PMCID: PMC2678927.
  24. Xu C, Du L, Chen F, Tang K, Tang L, Shi J, Xiao L, Zeng Z, Liang Y, Guo Y. Increased expression of IL1-RL1 is associated with type 2 and type 1 immune pathways in asthma. *BMC Immunol.* 2022 May 16;23(1):23. doi: 10.1186/s12865-022-00499-z. PMID: 35578178; PMCID: PMC9112580.
  25. Noble JA, Valdes AM. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2011 Dec;11(6):533-42. doi: 10.1007/s11892-011-0223-x. PMID: 21912932; PMCID: PMC3233362.
  26. Goudy K, Aydin D, Barzaghi F, Gambineri E, Vignoli M, Ciullini Mannurita S, Doglioni C, Ponzoni M, Cicalese MP, Assanelli A, Tommasini A, Brigida I, Dellepiane RM, Martino S, Olek S, Aiuti A, Ciceri F, Roncarolo MG, Bacchetta R. Human IL2RA null mutation mediates immunodeficiency with lymphoproliferation and autoimmunity. *Clin. Immun.* 146: 248-261, 2013.
  27. D'Netto MJ, Ward H, Morrison KM, Ramagopalan SV, Dymant DA, DeLuca GC, Handunnetthi L, Sadovnick AD, Ebers GC. Risk alleles for multiple sclerosis in multiplex families. *Neurology*, 72(23), 1984–1988. 2009. doi:10.1212/wnl.0b013e3181a92c25