

**Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**CHRISTIANE RUFFATO CARMINATI**

**RELAÇÃO DO GENE *TGF-β1* COM O PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM  
COVID-19**

**Uberaba – MG**

**2022**

**CHRISTIANE RUFFATO CARMINATI**

**RELAÇÃO DO GENE *TGF-β1* COM O PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM  
COVID-19**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Medicina Translacional” da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Helio Moraes de Souza

Coorientadoras: Prof. Ms. Roseane Lopes da Silva Grecco e Dra. Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka

**Uberaba – MG**

**2022**

**Catálogo na fonte:****Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

C284r Carminati, Christiane Ruffato  
Relação do gene *TGF- $\beta$ 1* com o prognóstico de pacientes com Covid-19 / Christiane Ruffato Carminati. – 2022.  
56 f.: il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2022

Orientador: Prof. Dr. Helio Moraes de Souza

Coorientadoras: Profa. Me. Roseane Lopes da Silva Grecco

Profa. Dra. Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka

1. Citocinas. 2. COVID-19. 3. Fator de crescimento transformador beta. 4. Polimorfismo genético. I. Souza, Helio Moraes de. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 547.96

**CHRISTIANE RUFFATO CARMINATI**

**RELAÇÃO DO GENE *TGF-β1* COM O PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM  
COVID-19**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Medicina Translacional” da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Helio Moraes de Souza

Coorientadoras: Prof. Ms. Roseane Lopes da Silva Grecco e Dra. Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka

Banca examinadora:

---

Dra. Cristina Wide Pissetti

---

Dra. Fernanda Bernadelli de Vito

---

Dra. Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka

Dedico esse trabalho às duas  
pessoas mais importantes da minha  
vida: Ana Clara e Rafaela. Amo  
você incondicionalmente

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter sido abençoada com a vida e pela oportunidade de estar sempre aprendendo e me fortalecendo.

Agradeço aos meus pais, Roberto e Lúcia, por serem meu porto seguro e nunca terem medido esforços para me auxiliar em todos os aspectos da minha vida. Vocês são minha maior inspiração.

Agradeço ao meu marido, Juninho e às nossas filhas, Ana Clara, Rafaela e Nicole. Vocês são a razão de cada passo que eu dou. Obrigada por compreenderem essa fase difícil, por estarem sempre ao meu lado e me fazerem sorrir. Amo vocês.

Agradeço à minha irmã Cláudia e à minha cunhada, Jéssica pela torcida de sempre e por me apoiarem com as meninas. Agradeço também às minhas avós, meus sogros, cunhados, sobrinhos e todos familiares e amigos por todas as orações, apoio e acolhimento.

Às amigas do campus I: Hilara, Ligia e Livia. Vocês foram fundamentais nos meus momentos de desespero. Obrigada pelos conselhos, pelas risadas e pelo carinho. Às amigas do laboratório de Hematologia: Andrezza, Anna, Fernanda e Bruna, obrigada por cada colaboração nesse trabalho, pelos litros de café e paciência com minhas crises de ansiedade.

Não há palavras suficientes para agradecer à Dra. Sarah Tanaka, amiga de longa data e colaboradora desse projeto. Obrigada por todo ensinamento, pela ajuda, conselhos, puxões de orelha e por não ter me deixado desistir.

Agradeço imensamente à professora Dra. Marly, minha primeira orientadora. Obrigada por tudo que me ensinou na Genética e por ter me dado a oportunidade de estar aqui hoje.

Agradeço à minha co-orientadora professora Roseane Grecco por todos os ensinamentos e pela presteza em me ajudar evoluir nessa carreira acadêmica.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Helio de Moraes. Obrigada por ter aceitado me orientar.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro pela oportunidade.

## RESUMO

A Covid-19 é uma doença que ocorre em escala global e a investigação de genes que exercem influência em inúmeros processos inflamatórios, fisiológicos e participam da supressão do sistema imune são estratégias úteis que podem auxiliar na compreensão dos mecanismos imunológicos e moleculares envolvidos. Como uma citocina multifuncional complexa, o fator de crescimento transformador  $\beta 1$  (*TGF- $\beta 1$* ) atua nos processos de migração, proliferação, diferenciação e progressão do ciclo celular, regula a resposta imune e mantém o equilíbrio mineral. Estudos demonstram que a alteração da concentração de TGF- $\beta$  no organismo pode direta ou indiretamente regular a cascata inflamatória e induzir a liberação de fatores pró-inflamatórios. Além disso, o gene *TGF- $\beta 1$*  apresenta vários polimorfismos que já foram associados ao risco de desenvolvimento de doenças. Portanto, a investigação de genes que influenciam na regulação do sistema imune são estratégias que podem auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da Covid-19. Assim, esse trabalho tem como objetivo avaliar o papel do gene *TGF- $\beta 1$*  no prognóstico dos pacientes infectados por SARS-CoV-2. Participaram desse estudo 178 indivíduos diagnosticados com Covid-19, divididos em dois grupos em relação ao desfecho (alta ou óbito). A genotipagem dos polimorfismos rs1800468 e rs1800469 do gene *TGF- $\beta 1$*  foi realizada em 178 amostras, através da técnica de discriminação alélica e a análise de expressão gênica foi realizada em 93 destas amostras. Não houve associação entre as frequências genotípicas dos polimorfismos rs1800468 e rs1800469 do gene *TGF- $\beta 1$*  com o desfecho de pacientes com Covid-19. Não houve diferença significativa entre a expressão do gene *TGF- $\beta 1$*  e os dados clínicos avaliados (gravidade dos casos, presença ou ausência de comorbidades e desfecho). Foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão do gene *TGF- $\beta 1$*  entre os genótipos CT e TT do polimorfismo rs1800469, havendo menor expressão do gene na presença do genótipo TT. Assim, o presente estudo conclui que os polimorfismos rs1800468 e rs1800469 do gene *TGF- $\beta 1$*  não estão associados com o prognóstico dos pacientes com Covid-19 e que o genótipo TT do polimorfismo rs1800469 reduz a expressão de *TGF- $\beta 1$* .

Palavras – chave: Citocinas; Covid-19; Fator de Crescimento Transformador beta; Polimorfismo genético; Vírus da SARS.

## ABSTRACT

Covid-19 is a disease that occurs on a global scale and the investigation of genes that influence numerous inflammatory and physiological processes and participate in the suppression of the immune system are useful strategies that can help to understand the immunological and molecular mechanisms involved. As a complex multifunctional cytokine, transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) acts in the processes of migration, proliferation, differentiation and cell cycle progression, regulates the immune response and maintains mineral balance. Studies show that changing the concentration of TGF- $\beta$  in the body can directly or indirectly regulate the inflammatory cascade and induce the release of pro-inflammatory factors. In addition, the TGF- $\beta$ 1 gene has several polymorphisms that have been associated with the risk of developing diseases. Therefore, the investigation of genes that influence the regulation of the immune system are strategies that can help to understand the mechanisms involved in the pathophysiology of Covid-19. Thus, this work aims to evaluate the role of the TGF- $\beta$ 1 gene in the prognosis of patients infected with SARS-CoV-2. A total of 178 individuals diagnosed with Covid-19 participated in this study, divided into two groups in relation to the outcome (discharge or death). Genotyping of rs1800468 and rs1800469 TGF- $\beta$ 1 gene polymorphisms was performed in 178 samples, using the allelic discrimination technique and gene expression analysis was performed in 93 samples. There was no association between the genotypic frequencies of the rs1800468 and rs1800469 polymorphisms of the TGF- $\beta$ 1 gene with the outcome of patients with Covid-19. There was no significant difference between the expression of the TGF- $\beta$ 1 gene and the clinical data evaluated (case severity, presence or absence of comorbidities and outcome). A statistically significant difference was observed in the expression of the TGF- $\beta$ 1 gene between the CT and TT genotypes of the rs1800469 polymorphism, with lower gene expression in the presence of the TT genotype. Thus, the present study concludes that the rs1800468 and rs1800469 polymorphisms of the TGF- $\beta$ 1 gene are not associated with the prognosis of patients with Covid-19 and that the TT genotype of the rs1800469 polymorphism reduces the expression of TGF- $\beta$ 1.

Keywords: Covid-19, Cytokines; Polymorphism, genetic; SARS virus; Transforming Growth Factor beta.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1	Estrutura do vírus SARS-CoV-2 e da proteína <i>spike</i>	15
Figura 2	Sintomas na Covid-19 e progressão da doença	16
Figura 3	Tempestade de citocinas na infecção por SARS-COV 2	17
Figura 4	Mecanismo patogênico das manifestações da Covid-19	19
Figura 5	Localização cromossômica do gene <i>TGF-β1</i>	20
Figura 6	Comparação entre a expressão do gene <i>TGF-β1</i> e o desfecho dos pacientes, presença ou ausência de comorbidades e gravidade dos casos.	28
Figura 7	Comparação entre a expressão do gene <i>TGF-β1</i> e os genótipos dos polimorfismos rs1800469 C>T e rs1800468 G>A.	29

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Caracterização da amostra	26
Tabela 2	Distribuição das frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos rs1800468 G>A e rs1800469 C>T no gene <i>TGF-β1</i>	27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	Beta – actina (do inglês <i>Actin-Beta</i> )
ACE2	Enzima conversora da angiotensina 2 (do inglês <i>Angiotensin Converting Enzyme – 2</i> )
Ct	Ciclo limiar (do inglês <i>Threshold Cycle</i> )
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
Covid-19	Coronavírus – 19 (do inglês <i>Corona Virus Disease-19</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>DeoxyriboNucleic Acid</i> )
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético (do inglês <i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i> )
GWAS	Estudo de associação genômica (do inglês <i>Genome Wide Association Study</i> )
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HLA	Antígeno leucocitário humano (do inglês <i>Human Leucocyte Antigen</i> )
M	Molar
MERS	Síndrome Respiratória do Oriente Médio (do inglês <i>Middle East Respiratory Syndrome</i> )
mL	Mililitro
mM	Milimolar
µL	Microlitro
mRNA	RNA mensageiro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia de polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
RBD	Domínio de ligação do receptor (do inglês <i>Receptor Binding Domain</i> )
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês <i>RiboNucleic Acid</i> )
rpm	Rotações por minuto
RQ	Quantificação Relativa
SARS	Síndrome respiratória severa aguda (do inglês <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i> )
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF-β	Fator do crescimento transformador beta (do inglês <i>Transforming Growth Factor Beta</i> )
TMPRSS2	Serina Protease Transmembranar 2 (do inglês <i>Transmembrane Serine ProteSse 2</i> )
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
$\chi^2$	Qui-quadrado

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2</b>	<b>DESENVOLVIMENTO</b>	14
2.1	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1.1	<b>Covid-19: aspectos gerais</b>	14
2.1.2	<b>Sintomas e aspectos imunológicos</b>	15
2.1.3	<b>Genética da Covid-19</b>	17
2.1.4	<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	18
2.2	JUSTIFICATIVA	22
2.3	OBJETIVOS	22
2.3.1	<b>Objetivos gerais</b>	22
2.3.2	<b>Objetivos Específicos</b>	22
2.4	METODOLOGIA	23
2.4.1	<b>Considerações éticas</b>	23
2.4.2	<b>Caracterização da amostra</b>	23
2.4.3	<b>Coleta de sangue periférico</b>	23
2.4.4	<b>Extração de DNA e genotipagem</b>	23
2.4.5	<b>Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)</b>	24
2.4.6	<b>Expressão gênica</b>	24
2.4.7	<b>Análise Estatística</b>	25
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>26</b>
3.1	CASUÍSTICA	26
3.2	ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>TGF-<math>\beta</math>1</i> (rs1800468 e rs1800469)	26
3.3	EXPRESSÃO DO GENE <i>TGF-<math>\beta</math>1</i>	27
3.3.1	<b>Comparação entre expressão gênica <i>TGF-<math>\beta</math>1</i> e dados clínicos</b>	27
3.3.2	<b>Comparação entre a expressão do gene <i>TGF-<math>\beta</math>1</i> e os genótipos dos polimorfismos rs 1800468 e rs1800469</b>	28
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>34</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>35</b>
	<b>APÊNDICE - Termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE</b>	<b>41</b>
	<b>ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP</b>	<b>44</b>
	<b>ANEXO B – Comprovante de Submissão do artigo científico</b>	<b>45</b>
	<b>ANEXO C - Artigo Científico</b>	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Covid-19 (Corona Vírus Disease -19) foi relatada inicialmente em Wuhan, China, no final de dezembro de 2019, como pneumonia de causa desconhecida. O agente causador foi rapidamente identificado como membro do  $\beta$ -coronavírus, sendo denominado de SARS-CoV-2, por estar intimamente relacionado à síndrome respiratória aguda grave (SARS) (RAI *et al.*, 2021).

A rápida disseminação da doença pelo mundo fez com que no início de 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarasse oficialmente a Covid-19 como uma emergência de saúde pública de interesse internacional (KARUNASAGAR, 2020). De acordo com a OMS, até o final de fevereiro de 2022 houve mais de 437 milhões de casos confirmados da doença pelo mundo, incluindo quase 6 milhões de mortes. No Brasil, de 3 de janeiro de 2020 a 28 de fevereiro de 2022 houve mais de 28 milhões de casos confirmados e 649 mil óbitos (OMS, 2022).

A doença é transmitida por gotículas respiratórias ou contato e o período de incubação do vírus é normalmente de um a 14 dias (GUAN *et al.*, 2020). Os principais sintomas observados são: febre, tosse, dor de cabeça intensa, mialgia e fadiga (SINGHAL, 2020). Na maior parte dos casos, as manifestações clínicas são brandas, mas uma parcela dos infectados podem desenvolver doença grave, especialmente em idosos ou pessoas com doenças subjacentes, como doenças pulmonares crônicas ou cardiovasculares, podendo evoluir para a síndrome de insuficiência respiratória aguda grave (SRAG), falência de múltiplos órgãos e óbito (ALSHARIF, 2021). Contudo, enquanto alguns idosos, mesmo com processo inflamatório importante reagem bem à infecção, tem sido observado que indivíduos jovens, sem comorbidades, podem apresentar a forma grave da doença e mesmo evoluir para óbito, sugerindo a participação de fatores genéticos na evolução e desfecho da Covid-19.

Evidências sugerem que a fisiopatologia da Covid-19 está ligada à resposta hiperinflamatória, caracterizada principalmente pela produção exacerbada de citocinas (DI MARIA *et al.*, 2020).

Como uma citocina multifuncional complexa, o fator de crescimento transformador  $\beta 1$  (*TGF- $\beta 1$* ) atua nos processos de migração, proliferação, diferenciação e progressão do ciclo celular, regula a resposta imune e mantém o equilíbrio mineral (ZHANG *et al.*, 2004). Estudos demonstram que a alteração da concentração de  $TGF-\beta$  no organismo pode direta ou indiretamente regular a cascata inflamatória e induzir a liberação de fatores pró-inflamatórios. Além disso, o gene *TGF- $\beta 1$*  apresenta vários polimorfismos que já foram associados ao risco

de desenvolvimento de doença como câncer de mama (DUNNING *et al.*, 2003) e doença arterial coronária (XU *et al.*, 2014).

Portanto, a investigação de genes que influenciam na regulação do sistema imune são estratégias que podem auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da Covid-19. Assim, esse trabalho tem como objetivo avaliar o papel do gene *TGF- $\beta$ 1* no prognóstico dos pacientes infectados por SARS-CoV-2.

## 2 DESENVOLVIMENTO

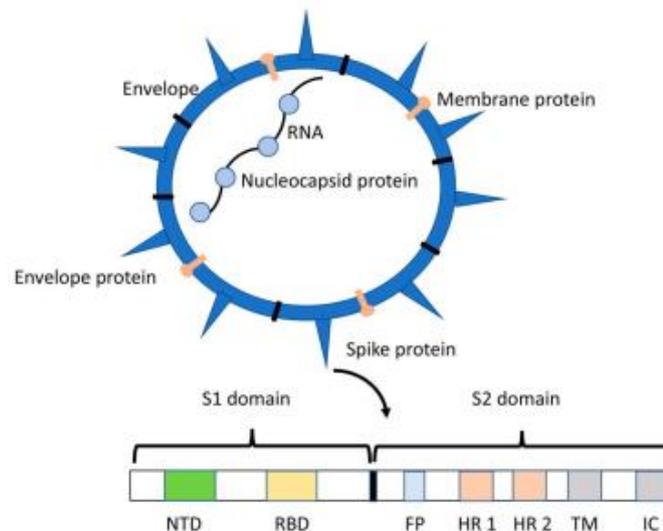
### 2.1 REVISÃO DA LITERATURA

#### 2.1.1 Covid-19: aspectos gerais

Os coronavírus (CoV) constituem uma família de RNAs virais, divididos em quatro gêneros ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -CoV), dos quais os dois primeiros são capazes de causar infecções em humanos. Desses, os  $\beta$ -CoV MERS-CoV e SARS-CoV são altamente patogênicos, cujo surtos ocorridos em 2002 e 2012, respectivamente, causaram doenças respiratórias fatais (CUI *et al.*, 2019; SANTACROCE *et al.*, 2021).

No final de 2019, uma nova cepa beta de coronavírus, com 96,2% de similaridade ao genoma do CoV RaTG13 encontrado em morcegos e com 79,5% de identidade para SARS-CoV foi identificada como causadora da doença Covid-19, sendo então denominada SARS-CoV-2, (ZHOU *et al.*, 2020; SANTACROCE *et al.*, 2021).

O genoma viral do SARS-CoV-2 codifica quatro proteínas estruturais essenciais, incluindo a proteína Spike (S), proteína de envelope (E), proteína de matriz (M) e proteína do nucleocapsídeo (N), além de várias proteínas acessórias que interferem na resposta imune inata dos hospedeiros (CUI *et al.*, 2019). A proteína S é uma glicoproteína trimérica que contém duas subunidades: S1 e S2. A subunidade S1 hospeda o domínio de ligação ao receptor (RBD – receptor binding domain), o qual é utilizado pelo vírus para entrar nas células hospedeiras (**Figura 1**). Após clivagem endossômica da subunidade S1 pela serina protease 2 transmembrana celular (*TMPRSS2*) ou furina no sítio S1/S2, é liberado um peptídeo de fusão da subunidade S2 que induz a fusão do envelope viral com a membrana endossomal e subsequente liberação de RNA viral na célula (WIELAND, 2022).



**Figura 1-** Estrutura do vírus SARS-CoV-2 e da proteína spike.  
Fonte: WIELAND,2022.

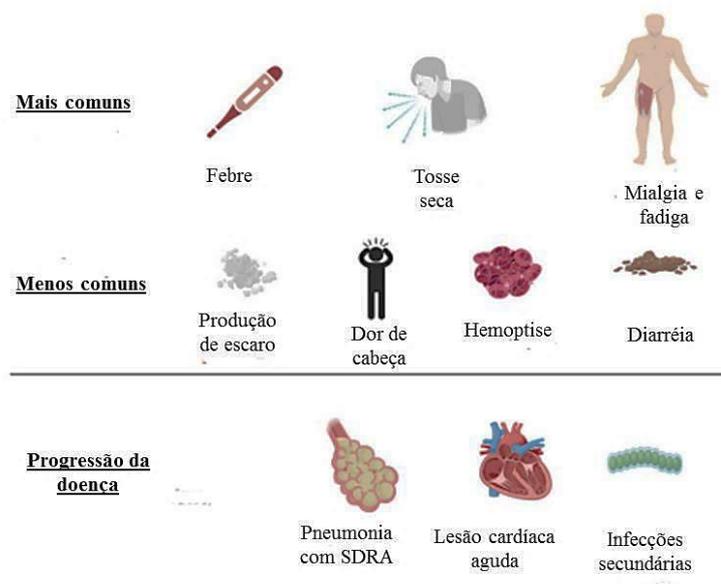
Uma vez dentro da célula hospedeira por meio de fusão de membrana, o vírus libera seu genoma no compartimento citoplasmático, onde a tradução de ORF-1a e ORF-1b começa, resultando na formação de duas grandes poliproteínas (pp1a e pp1ab). Três proteases funcionais então clivam as poliproteínas em 16 proteínas não estruturais (NSP1-16), que criam a RNA polimerase viral e outras proteínas acessórias para a montagem do vírus (HUSSAIN *et al.*, 2005). As glicoproteínas E após a síntese são incorporadas ao retículo endoplasmático rugoso ou membrana de Golgi. O genoma viral combina-se com a proteína do capsídeo para formar o nucleocapsídeo, seguido pelo brotamento de partículas virais montadas no Compartimento Intermediário ER-Golgi (PERRIER *et al.*, 2019). Por último, as vesículas carregadas de partículas de vírus são fundidas com a membrana celular para eliminação eficaz do vírus (DE WIT *et al.*, 2016). Esses novos vírions estão agora acessíveis para infectar as células saudáveis vizinhas e também são liberados no ambiente circundante por meio de gotículas respiratórias que são altamente contagiosas, fazendo com que o vírus se propague (DE WIT *et al.*, 2016).

### 2.1.2 Sintomas e aspectos imunológicos

As vias aéreas superiores e inferiores estão envolvidas precocemente na infecção por SARS CoV-2, geralmente seguida de outros sistemas, como o gastrointestinal, cardiovascular, renal e tegumentar. Isso faz com que as manifestações clínicas da doença sejam variáveis, incluindo fadiga, dores musculares, dificuldade respiratória, tosse seca, dor de garganta,

diarreia, calafrios, perda de olfato e do paladar (KHADKE *et al.*, 2020; SANTACROCE *et al.*, 2021).

Pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 apresentam amplo espectro clínico, variando de casos assintomáticos a sintomáticos graves. Entre os indivíduos sintomáticos, 80% apresentam sintomas leves, 15% a forma grave da doença e 5% precisam de cuidados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e/ou uso de ventilação mecânica (CDC, 2022). Parte dos pacientes com sintomas graves evolui para SDRA, choque séptico, acidose metabólica, coagulopatias, insuficiência cardíaca, insuficiência renal, dano hepático, choque e falência de múltiplos órgãos (**Figura 2**) (FARA *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2020). Isso pode ser atribuído a alguns fatores de risco, como idade avançada e a presença de comorbidades associadas (diabetes *mellitus*, doenças cardiovasculares, obesidade e doenças renais) (JOHN *et al.*, 2020).



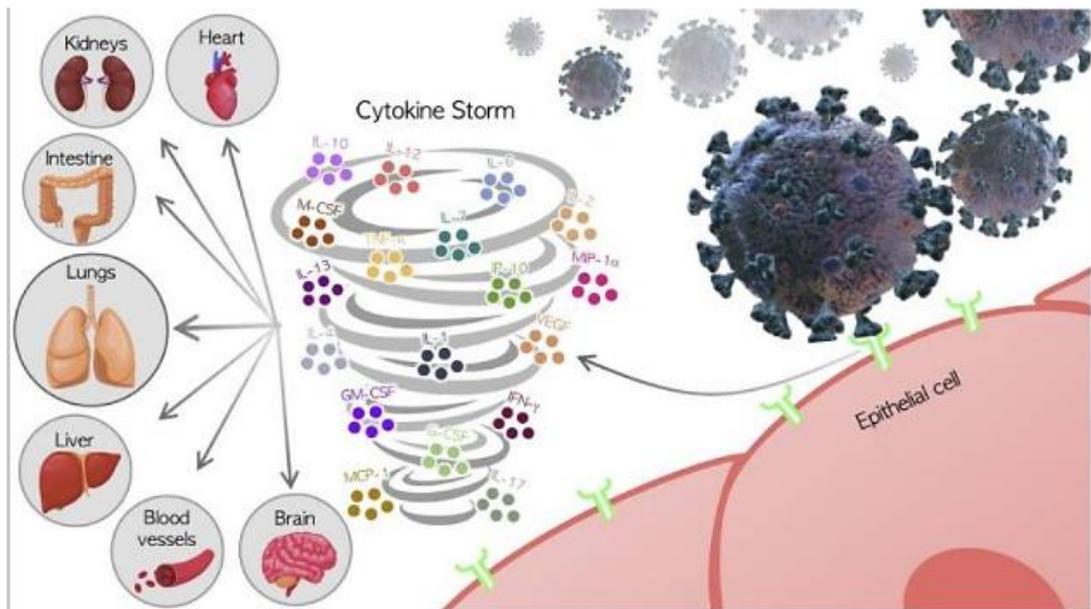
**Figura 2** - Sintomas na Covid-19 e progressão da doença.

Fonte: FARA *et al.*, 2020, adaptado pela autora.

Do ponto de vista imunológico, tanto o sistema inato quanto o adaptativo desempenham papel importante na determinação dos resultados de infecções virais. Geralmente, a resposta imune inata imediata auxilia na proteção contra a entrada do vírus no hospedeiro e sua eliminação. As etapas subsequentes são a ativação do sistema imunológico adaptativo, controlando a replicação do vírus, e a eliminação do mesmo pela geração de células T e B específicas. Semelhante a outras doenças infecciosas, são formados anticorpos (IgA, IgM e IgG), bem como células de memória (SHAH *et al.*, 2020).

As citocinas são mediadores essenciais da resposta inflamatória e importantes para a defesa do hospedeiro contra uma ampla variedade de vírus. A produção exacerbada dessas moléculas é um dos mecanismos propostos na patofisiologia da Covid-19, principalmente nos casos mais graves, onde aparentemente ocorre uma resposta pró-inflamatória descontrolada (GHAZAVI, 2020) denominada “tempestade de citocinas” (COSTELA-RUIZ *et al.*, 2020).

Esse fenômeno é caracterizado pela rápida liberação na circulação de uma grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios como IL-1, IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral (TNF), interferon (IFN) e fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta$ 1), que parece desempenhar um papel central, em conjunto com seus fatores sinérgicos (LIU, 2020), contribuindo para lesão pulmonar e falência múltipla de órgãos (**Figura 3**) (VILLALBA *et al.*, 2020; FU *et al.*, 2020).



genéticos humanos envolvidos na variabilidade da suscetibilidade à infecção viral e, em particular, na variabilidade das manifestações clínicas (DI MARIA *et al.*, 2020).

Polimorfismos genéticos, também denominados variantes genéticas, são variações na sequência de DNA que ocorrem em mais de 1% da população, sendo os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) o tipo mais comum de polimorfismo. Os SNPs podem influenciar a expressão gênica, estabilidade do RNA mensageiro (mRNA), splicing alternativo, sequência alvo de micro RNA, exportação de proteína para o retículo endoplasmático via peptídeos de sinal ou alterar a função da proteína quando um aminoácido é alterado, conferindo suscetibilidade ou gravidade para muitas doenças (NOGALES, 2019). Alguns SNPs já foram associados ao infarto do miocárdio (NAKAMURA *et al.*, 2002), hiperbilirrubinemia (SUGATANI *et al.*, 2002), hipercolesterolemia (ONO *et al.*, 2003), asma (JINNAI *et al.*, 2004) e lesão pulmonar aguda (MARZEC *et al.*, 2007).

Estudos têm demonstrado que alguns genes podem ter papel importante no desenvolvimento da Covid-19, como o gene que codifica a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) - uma enzima fundamental para a entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira, o gene *TMPRSS2* (Transmembrane Serine Protease 2) e o gene *HLA* (Human Leukocyte Antigen) (ANASTASSOPOULOU *et al.*, 2020).

O nível individual de citocinas é extremamente variável, com uma importante contribuição do componente genético, uma vez que foi demonstrado que polimorfismos localizados em genes que codificam citocinas podem influenciar sua atividade transcricional e contribuir com diferentes fenótipos (VANDENBROECK, 2012).

Assim, acredita-se que o perfil genético do indivíduo exerça importante papel na determinação da resposta clínica ao vírus. No entanto, o estabelecimento dos mecanismos genéticos envolvidos na suscetibilidade ou resistência à infecção causada pelo SARS-CoV-2 ainda não são completamente conhecidos e requerem estudos mais aprofundados (CASANOVA, 2020).

#### **2.1.4 TGF- $\beta$ 1**

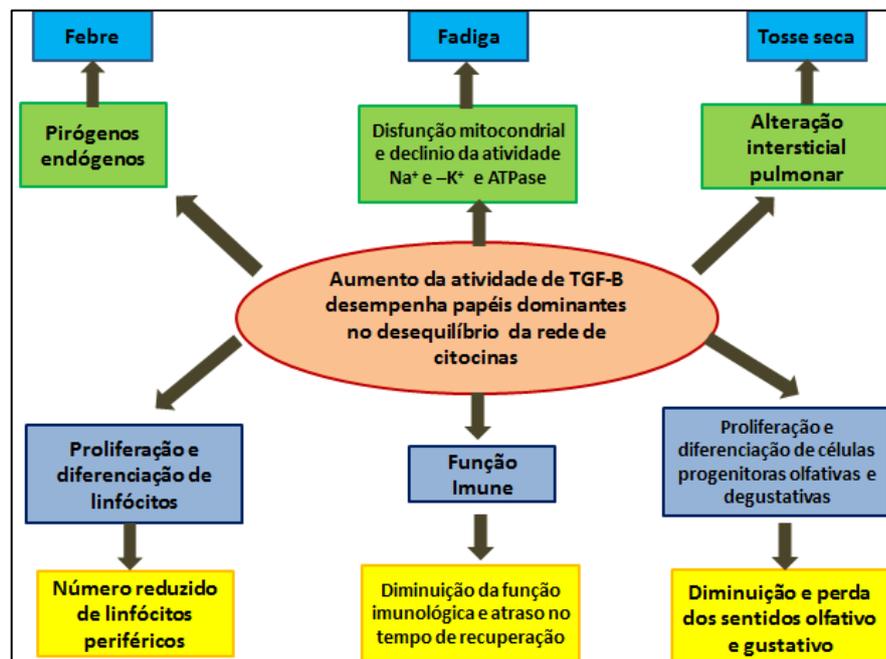
O TGF- $\beta$ 1 é uma citocina multifuncional com funções regulatórias, incluindo proliferação, diferenciação, migração e apoptose (MORIKAWA *et al.*, 2016). Exibe atividades pró-inflamatórias locais e imunossupressoras sistêmicas, desempenhando um papel crítico no reparo tecidual após lesão em múltiplos órgãos, incluindo o pulmão (SHULL *et al.*, 1992). Na lesão pulmonar aguda, o papel do TGF-B1 foi mais bem avaliado durante a fase

tardia do reparo tecidual, onde desempenha um papel crítico no desenvolvimento da resposta fibroproliferativa (BROEKELMANN *et al.*, 1991).

O TGF- $\beta$ 1 é o mediador central que inicia e termina o reparo tecidual e cuja produção sustentada está subjacente ao desenvolvimento da fibrose tecidual (BORDER, 1992). Possui poderosas propriedades anti-inflamatórias, incluindo inibição da ativação de macrófagos, atividade das células natural-killer e atividade das células-T. Várias linhas de evidência apontam que o TGF- $\beta$ 1 possui um papel essencial no alagamento alveolar que caracteriza a resposta precoce à lesão pulmonar (DHAINAUT *et al.*, 2003).

Estudos demonstram que a alteração da concentração de TGF- $\beta$ 1 no organismo foi acompanhada por alterações na produção de outras citocinas, como de TNF- $\alpha$ , indicando que o TGF- $\beta$ 1 pode direta ou indiretamente regular a cascata inflamatória, reduzir a liberação de fatores pró-inflamatórios, combater a inflamação excessiva e proteger o organismo (OMER *et al.*, 2003).

A tempestade de citocinas na Covid-19 é uma consequência da rede de citocinas desequilibrada resultante do aumento da atividade de TGF- $\beta$ 1, que liga-se aos seus receptores correspondentes, desencadeando uma série de reações bioquímicas em cascata, processos patológicos e manifestações clínicas (**Figura 4**) (SHEN *et al.*, 2021).



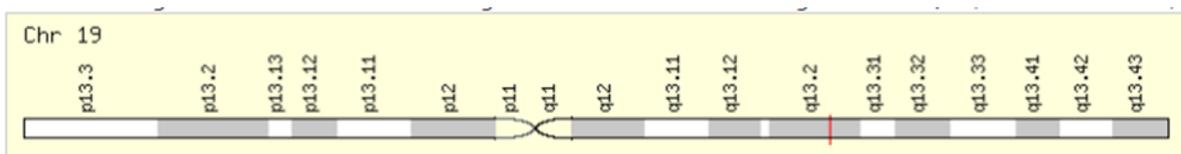
**Figura 4** – Mecanismo patogênico das manifestações da Covid-19  
Fonte: Shen, 2021. Adaptado pela autora.

No geral, as manifestações clínicas da Covid-19 são altamente consistentes com o aumento da atividade do TGF- $\beta$ 1, que é a evidência básica que aponta o papel central desta molécula na tempestade de citocinas resultante da infecção por SARS-CoV-2 (SHEN *et al.*,

2021). Como um pirógeno endógeno, o TGF- $\beta$ 1 pode causar febre, mas geralmente baixa (MATSUMURA *et al.*, 2007). A fadiga é um sintoma típico da COVID-19, potencialmente devido à disfunção mitocondrial e ao declínio da atividade da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (CASALENA *et al.*, 2015). A tosse seca e a alteração pulmonar intersticial também são causadas pelo aumento de TGF- $\beta$ , que é um fator de crescimento de fibroblastos e demonstrou induzir alteração pulmonar intersticial.

TGF- $\beta$ 1 promove a secreção de células mucosas brônquicas, induz grandes quantidades de muco espesso e embolia pulmonar, o que dificulta a respiração normal e pode levar a complicações críticas, como infecções graves e choque. Além disso, suprime significativamente a função imunológica, retardando a recuperação (SHENG, 2015), inibe a proliferação e diferenciação de linfócitos, reduzindo o número de linfócitos do sangue periférico e inibe a proliferação e diferenciação de células progenitoras, contribuindo para a diminuição e perda do sentido olfativo e gustativo em alguns pacientes (GETCHELL *et al.*, 2022; KAM *et al.*, 2014).

O gene *TGF- $\beta$ 1* está localizado no cromossomo 19q13.2 (**Figura 5**), tendo sete exons e seis introns e apresenta vários polimorfismos, sendo que oito SNPs e um polimorfismo de deleção/inserção possuem um impacto funcional na produção da molécula e já foram associados a doença arterial coronária, artrite reumatóide, hipertensão (LI *et al.*, 1999), esclerose múltipla (HE, 1998), osteoporose (YAMADA *et al.*, 2000) e câncer de mama, e podem ser usados como biomarcadores de susceptibilidade (MARTELOSSI *et al.*, 2016).



**Figura 5** - Localização cromossômica do gene *TGF- $\beta$ 1*

Fonte: [www.genecards.org](http://www.genecards.org)

Dois polimorfismos do gene *TGF- $\beta$ 1*, localizados na região 5' nas posições -800 (G  $\rightarrow$  A) e -509 (C  $\rightarrow$  T), respectivamente rs1800468 e rs1800469, possuem a função de regular os níveis de expressão da proteína (LUEDECKING *et al.*, 2000). O polimorfismo rs1800469 está localizado em uma região reguladora negativa (-731 a -453) e associado a uma atividade transcricional aumentada, elevando os níveis circulantes de TGF- $\beta$ 1, enquanto o polimorfismo rs1800468 está localizado em uma região que interrompe a ligação da proteína de ligação ao

fator de transcrição nuclear, fazendo com que ocorra uma menor produção de TGF- $\beta$ 1 total na circulação (LOEYS *et al.*, 2006; GRAINGER *et al.*, 1999).

Considerando que a concentração de TGF-  $\beta$ 1 no plasma tem sido correlacionada com o desenvolvimento de várias doenças e exerce influência em inúmeros processos inflamatórios, fisiológicos e participa da supressão do sistema imune (GRAINGER *et al.*, 1999), é importante avaliar a relação dos polimorfismos rs1800468 e rs1800469 quanto à gravidade dos casos (leve ou grave), à presença ou ausência de comorbidades e quanto ao desfecho dos pacientes (alta e óbito) e analisar a expressão deste gene quanto ao desfecho dos pacientes e aos genótipos dos polimorfismos estudados.

## 2.2 JUSTIFICATIVA

A patologia da Covid-19 está ligada à resposta hiperinflamatória do organismo, caracterizada pela produção exacerbada de determinadas citocinas. O TGF- $\beta$ 1 é uma citocina multifuncional e estudos demonstram que a alteração da sua concentração pode direta ou indiretamente regular a cascata inflamatória, reduzir a liberação de fatores pró-inflamatórios, combater a inflamação excessiva e proteger o organismo. O gene *TGF- $\beta$ 1* apresenta vários polimorfismos funcionais que têm sido associados a diferentes tipos de doenças, sendo, portanto, potenciais biomarcadores de susceptibilidade. Assim, a investigação de genes que estejam envolvidos com o desenvolvimento de várias doenças e exercem influência em inúmeros processos inflamatórios, fisiológicos e participam da supressão do sistema imune, são estratégias que podem auxiliar na compreensão dos mecanismos imunológicos e genéticos envolvidos na Covid-19.

## 2.3 OBJETIVOS

### 2.3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do gene *TGF- $\beta$ 1* no desfecho e prognóstico dos pacientes infectados por SARS-CoV-2.

### 2.3.2 Objetivos específicos

1. Investigar a frequência dos polimorfismos rs1800468 e rs1800469 do gene *TGF- $\beta$ 1* em pacientes com Covid-19.
2. Analisar a influência dos polimorfismos 1800468 e rs1800469 do gene *TGF- $\beta$ 1* quanto ao desfecho (óbito ou alta).
3. Analisar a expressão do gene *TGF- $\beta$ 1* quanto à gravidade (leve ou grave).
4. Analisar a expressão do gene *TGF- $\beta$ 1* quanto à presença ou ausência de comorbidades.
5. Analisar a expressão do gene *TGF- $\beta$ 1* quanto ao desfecho (óbito ou alta)
6. Avaliar a expressão do gene *TGF- $\beta$ 1* quanto aos genótipos dos polimorfismos rs1800468 e rs1800469.

## 2.4 METODOLOGIA

### 2.4.1 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (CEP – HC UFTM), (CAAE 31328220.8.0000.8667) e os participantes ou seus responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

### 2.4.2 Caracterização da amostra

Trata-se de um estudo observacional, que incluiu 178 pacientes (sintomáticos e internados) diagnosticados com Covid-19, de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2020), atendidos entre maio de 2020 e novembro de 2021 nos seguintes serviços do município de Uberaba/MG: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (01 paciente), Hospital Regional José Alencar Gomes da Silva (107 pacientes), Hospital São Domingos (30 pacientes) e Hospital Universitário Mário Palmério (40 pacientes). A gravidade dos quadros foi definida como leve e grave de acordo com a situação clínica e laboratorial do paciente no momento da coleta. Foram utilizados os seguintes parâmetros: quadro leve – paciente em bom estado geral, saturação acima de 95%, sem necessidade de ventilação mecânica; quadro grave – paciente necessitando de ventilação mecânica. Dados como idade, doenças pré-existentes, período de internação e desfecho (óbito ou alta) foram obtidos através de levantamento dos prontuários.

### 2.4.3 Coleta de sangue periférico

Foram coletados 10mL de sangue periférico, por venopunção, em tubos de coleta estéril contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). As coletas foram realizadas por profissionais devidamente habilitados e seguindo todas as recomendações de biossegurança necessárias, juntamente com a solicitação dos exames de rotina, para minimizar o desconforto dos pacientes.

### 2.4.4 Extração de DNA e genotipagem

A avaliação dos polimorfismos rs1800468 e rs1800469 foi realizada em 178 amostras, sendo 90 óbitos e 88 altas. O DNA genômico dos pacientes foi extraído utilizando-se kit de extração Wizard® Genomic DNA Purification kit (PROMEGA– EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

A genotipagem dos polimorfismos rs1800468 e rs1800469 do gene *TGFβ1* foi realizada através da técnica de discriminação alélica por PCR em Tempo Real utilizando o equipamento 7500 Standard Real Time PCR System (Applied Biosystems™, EUA). As sondas e os iniciadores foram desenhados pela Applied Biosystems (ABI, EUA) (ID dos ensaios: C\_\_8708473\_10; C\_\_8708474\_20).

As reações de PCR continham 2 µL de DNA (50ng/µL), 1,5 µL de TaqMan Genotyping Master Mix (2X), 0,1µL de iniciadores e sondas (10X) e água ultrapura suficiente para um volume final de 5,0µL, incluindo os controles negativos adequados em todos os ensaios. As reações foram realizadas sob as seguintes condições: 95°C por 10 minutos e 45 ciclos de amplificação (95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto). Para cada ciclo, o software determinou o sinal fluorescente a partir das sondas marcadas com VIC ou FAM.

#### **2.4.5 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)**

A extração do RNA total foi realizada com kit de extração SV Total RNA Isolation System (PROMEGA - EUA), segundo as orientações do fabricante.

A reação de transcrição reversa para obtenção do cDNA foi realizada com kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Para cada reação foram utilizados 10µL de RNA (100ng/µL), 4,2µL de água livre de nucleases, 2,0µL de tampão de transcrição reversa (10X), 2,0µL de iniciadores (10X), 1,0µL de transcriptase reversa (50U/µL) e 0,8µL de dNTPs (100mM) totalizando o volume final de 20µL por amostra. A transcrição reversa das amostras foi realizada no termociclador VERITI (Applied Biosystems™, EUA) nas seguintes condições: 25° C durante 10 minutos, 37° C durante 120 minutos e 85° C a 5 minutos. Ao final, as amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C para posterior utilização.

#### **2.4.6 Expressão gênica**

A quantificação relativa do gene *TGF-β1* foi realizada em 93 das 178 amostras iniciais, sendo 51 homens (54,8%) e 42 mulheres (45,2%). Em relação ao desfecho, verificou-se que 44 indivíduos vieram a óbito (47,3%) e 49 obtiveram alta (52,7%).

A quantificação relativa do gene *TGF-β1* foi avaliada por PCR em tempo real, utilizando o equipamento 7500 Standard Real Time PCR System (Applied Biosystems™, EUA). O gene de referência *Actin Beta (ACTB)* foi utilizado como controle endógeno. Os ensaios contendo primers e sondas específicas para cada gene (*ACTB* e *TGF-β1*) foram pré-desenhados pela Applied Biosystems (Hs99999903\_m1 e Hs00998133\_m1, respectivamente)

e realizados conforme instruções do fabricante. O volume final das reações foi de 10 $\mu$ L e continham 5 $\mu$ L de GoTaq® RT PCR Master Mix (2X) (PROMEGA - EUA), 4,5 $\mu$ L de cDNA (100 ng/ $\mu$ L) e 0,5 $\mu$ L de TaqMan® Gene Expression Assays (20X). Os controles negativos apropriados foram utilizados. O experimento foi realizado sob as seguintes condições de PCR: 50°C por 5 minutos, 95°C por 10 minutos e 45 ciclos de amplificação de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

A quantificação relativa (RQ) foi realizada pelo método  $2^{-\Delta Ct}$  (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008), onde o ciclo limiar (Ct) é o ciclo no qual o nível de fluorescência atinge quantidade suficiente para detecção da amostra.

#### **2.4.7 Análise estatística**

Variáveis contínuas foram descritas por média  $\pm$  desvio padrão e as variáveis categóricas foram expressas através de porcentagem. Utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 9 by Dotmatics, os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e as comparações estatísticas entre dois grupos realizadas com emprego do teste Mann-Whitney (para dados não paramétricos). Nas comparações entre mais de dois grupo foi empregado o teste Kruskal Wallis. Para variáveis qualitativas, as comparações estatísticas foram realizadas através do teste de Qui Quadrado ( $\chi^2$ ). A significância estatística foi definida como  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 CASUÍSTICA

Participaram desse estudo 178 indivíduos diagnosticados com Covid-19. Havia 108 homens (60,7%) e 70 mulheres (39,3%). Em relação ao desfecho, 90 vieram a óbito (50,6%) e 88 pacientes obtiveram alta (49,4%). A caracterização dos grupos é apresentada na **Tabela 1**. A etnia dos pacientes foi relatada em 136 pacientes, sendo: branca (59%), amarela (3,6%), preta (3,6%) e parda (33,8%). Foi observada diferença estatisticamente significativa na média de idade em relação ao desfecho, sendo maior no grupo de pacientes que foi a óbito ( $p = 0,001$ ). Em relação às comorbidades, 131 pacientes (73,6%) apresentavam uma ou mais comorbidades [82 com HAS - hipertensão arterial sistêmica, 42 com DM - diabetes mellitus e 75 com outras comorbidades (obesidade, hipotireoidismo, asma)]. Houve diferença significativa entre a presença de comorbidades e o desfecho, sendo a presença de comorbidades mais prevalente no grupo de pacientes que foi a óbito ( $p = 0,0055$ ), com destaque para a hipertensão.

**Tabela 1:** Caracterização da amostra.

	ALTA	ÓBITO	p
Idade (média $\pm$ DP) *	51,6 ( $\pm$ 15)	70 ( $\pm$ 15,9)	0,001
Período de internação, mediana (min – máx), dias*	8 (1 – 44)	10 (3 – 51)	0,88
Presença de comorbidades (n %)	55 (31,0%)	74 (41,6%)	0,0055
Hipertensão, n (%)	31 (17,4%)	50 (28,0%)	0,01
Diabetes, n (%)	17 (9,6%)	23 (13,0%)	0,41

Fonte: Elaborada pela autora. \*Teste de Mann-Whitney; Teste Qui-quadrado.

#### 3.2 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS rs1800468 e rs1800469 DO GENE *TGF- $\beta$ 1*

Para os polimorfismos rs1800468 e rs1800469 no gene *TGF- $\beta$ 1* foram analisadas 178 amostras. As frequências genóticas e alélicas para os polimorfismos comparadas ao desfecho dos pacientes estão apresentadas na **Tabela 2**.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as frequências alélicas e genóticas e o desfecho dos pacientes para os polimorfismos investigados (teste Qui-quadrado, sendo  $p = 0,248$  e  $p = 0,921$ ). Observou-se que os dois polimorfismos encontram-se em Equilíbrio de Hardy Weinberg: rs1800468 (Grupo Alta:  $\chi^2=0,56$ ,  $p=0,45$ ; Grupo Óbito:  $\chi^2=0,31$ ,  $p=0,58$ ); rs1800469 (Grupo Alta:  $\chi^2=0,0014$ ,  $p=0,97$ ; Grupo Óbito:  $\chi^2=0,90$ ,  $p=0,34$ ).

**Tabela 2:** Distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos rs1800468 G>A e rs1800469 C>T no gene *TGF-β1* em relação ao desfecho.

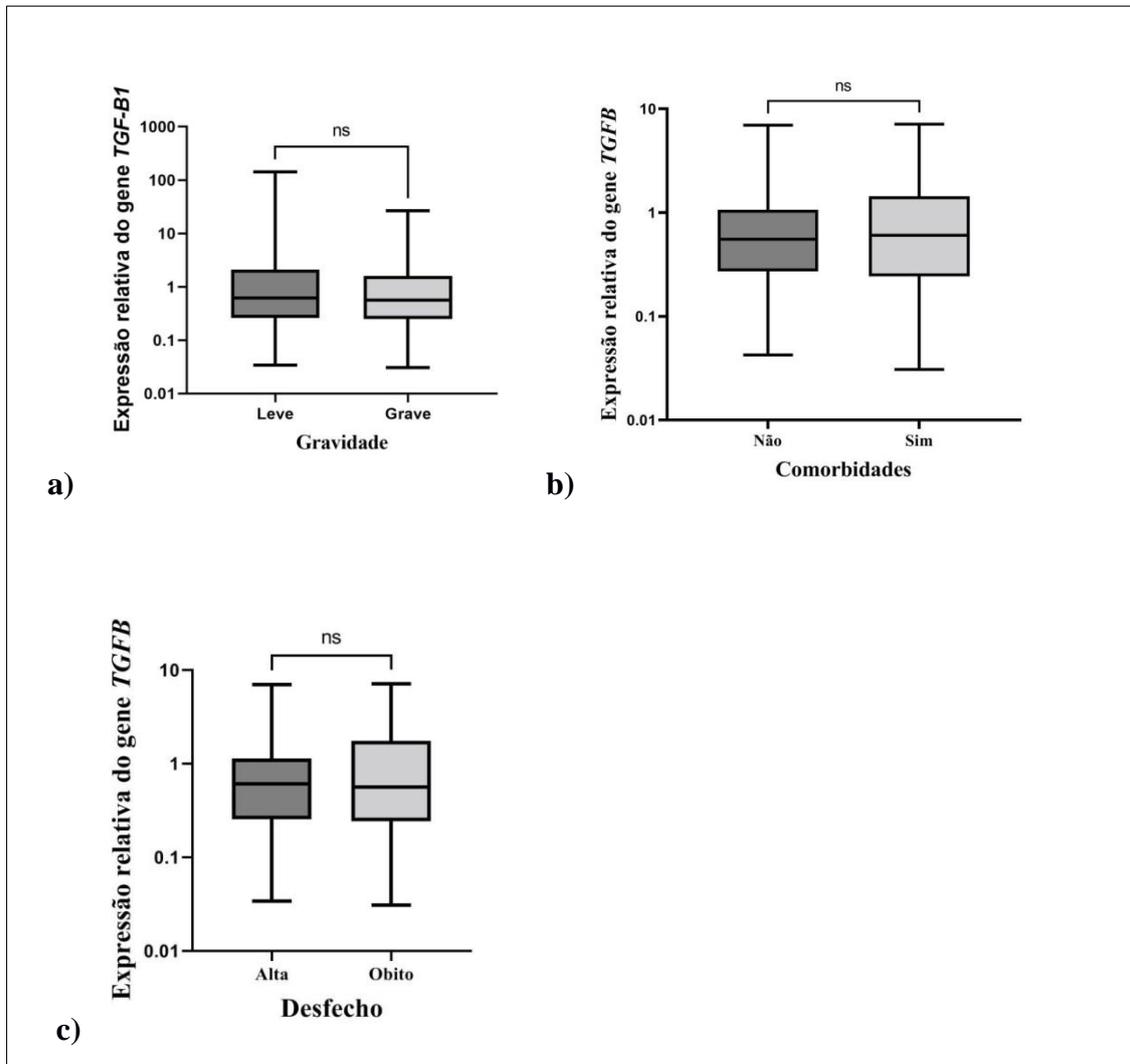
<b>Polimorfismo</b>	<b>Alta n(%)</b>	<b>Óbito n(%)</b>	<b>p</b>
rs1800468			
GG	75 (85,2)	80 (88,9)	0,25
GA	13 (14,8)	10 (11,1)	
AA	0	0	
rs1800469			
CC	11(12,5)	12 (13,3)	0,92
CT	40 (45,5)	36 (40,0)	
TT	37 (42,0)	42 (46,7)	
<b>Frequência alélica</b>			
rs1800468			
G	163 (92,6)	170 (94,5)	0,62
A	13 (7,4)	10 (5,5)	
rs1800469			
C	62 (35,2)	60 (33,3)	0,79
T	114 (64,8)	120 (66,7)	

Fonte: Elaborada pela autora. Teste: Qui-quadrado.

### 3.3 EXPRESSÃO DO GENE *TGF-β1*

#### 3.3.1 Comparação entre expressão gênica do *TGF-β1* e dados clínicos

A expressão do gene *TGF-β1* foi comparada com o desfecho (alta e óbito), presença ou ausência de comorbidades e a gravidade dos casos (leve e grave). Não houve diferenças significativas entre a expressão do gene e os dados clínicos avaliados ( $p= 0,65$ ;  $p= 0,53$  e  $p=0,65$ ) (**Figura 6**).

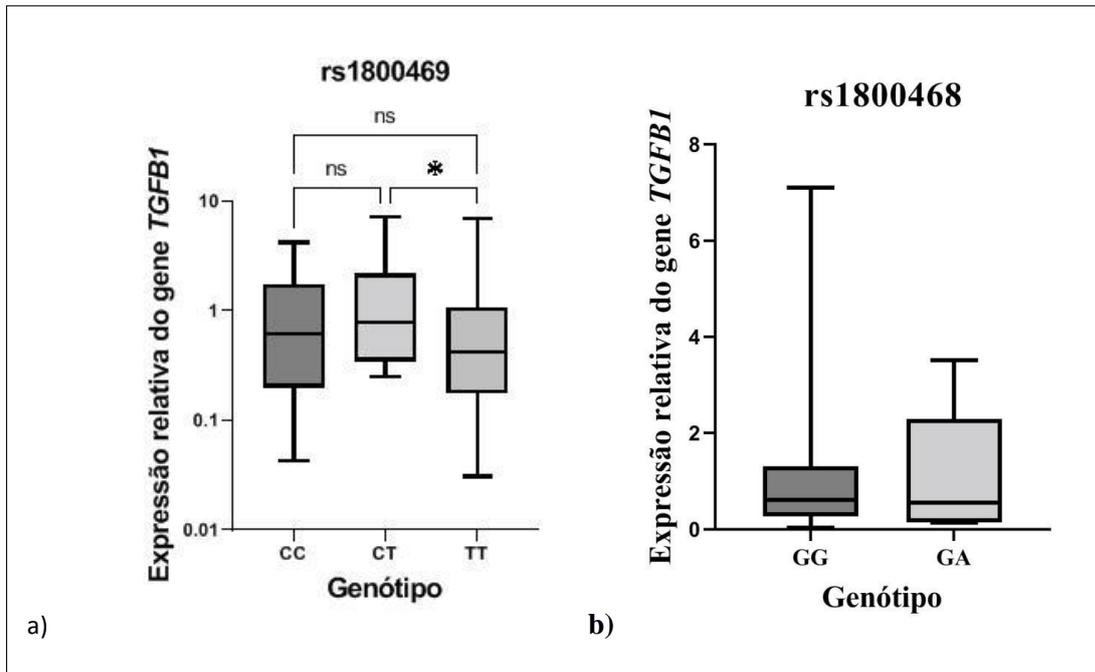


**Figura 6** - Comparação entre a expressão do gene *TGF-β1* e: (a) gravidade dos casos, (b) presença ou ausência de comorbidades e (c) desfecho dos pacientes.

Fonte: elaborado pela autora. Teste: Mann-Whitney

### 3.3.2 Comparação entre a expressão do gene *TGF-β1* e os genótipos dos polimorfismos rs1800468 e rs1800469

A expressão do gene *TGF-β1* foi comparada com os genótipos dos polimorfismos rs1800469 e rs1800468. Foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão do gene *TGF-β1* entre os genótipos CT e TT do polimorfismo rs1800469, havendo menor expressão do gene na presença do genótipo TT ( $p= 0,03$ ). Em relação ao polimorfismo rs1800468 não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão do gene *TGF-β1* em relação aos genótipos GG e GA ( $p= 0,91$ ) (**Figura 7**).



**Figura 7** – Comparação entre a expressão do gene *TGF-β1* e os genótipos dos polimorfismos: (a) rs1800469 C>T e (b) rs1800468 G>A.

Fonte: elaborado pela autora. Testes: Kruskal Wallis e Mann-Whitney.

## 4 DISCUSSÃO

Desde o aparecimento da Covid-19 no início de dezembro de 2019, fatores como diferenças de gênero e idade, presença de comorbidades incluindo diabetes mellitus, hipertensão e obesidade e a contribuição de fatores genéticos vêm sendo apontados como responsáveis pela suscetibilidade e variação na apresentação à infecção pelo SARS-CoV-2 (ADLI *et al.*, 2022).

Estudo realizado na China com dados de 13.077 indivíduos com Covid-19 atendidos em hospitais de Wuhan, entre janeiro e março de 2020 observou que diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares foram altamente prevalentes entre os pacientes, predispondo-os a resultados clínicos ruins (TIAN, 2020). De modo semelhante, uma revisão sistemática realizada com dados de 18.012 pacientes com Covid-19 concluiu que diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares são importantes fatores de risco para gravidade e mortalidade em pessoas infectadas com Covid-19 (DE ALMEIDA-PITITTO *et al.*, 2020). Esses dados são concordantes aos observados no presente estudo, onde se verificou que a hipertensão e diabetes foram comorbidades altamente prevalentes, especialmente no grupo com desfecho desfavorável, demonstrando a influência de determinados fatores de risco a um pior prognóstico.

Apesar das comorbidades, a genética do hospedeiro parece ser uma importante fonte das diferenças observadas na relação hospedeiro-patógeno. A identificação de determinantes genéticos da suscetibilidade à COVID-19 e gravidade pode ter implicações significativas na compreensão dos mecanismos subjacentes envolvidos na patogenicidade do SARS-CoV-2 (ADLI *et al.*, 2022).

Deste modo, o presente trabalho avaliou a influência dos polimorfismos rs1800468 e rs1800469 do gene *TGF-β1* na Covid-19, no entanto, não foi observada associação entre os polimorfismos investigados e o prognóstico de pacientes com Covid-19. Até o momento, não há trabalhos disponíveis na literatura que explorem o papel destes polimorfismos no desenvolvimento da infecção por SARS-CoV-2, mas os mesmos já foram amplamente estudados em uma infinidade de doenças

Estudo realizado por Juarez e colaboradores na Espanha (2021) avaliou os polimorfismos rs1800468 e rs1800469 em amostras de plasma de 108 pacientes com adenocarcinoma gástrico e observou associação entre o genótipo G/A do polimorfismo rs1800468 e pior prognóstico da doença, com menor produção de TFG-β1, conferindo maior propensão ao desenvolvimento de metástases. Os autores sugerem que esse SNP pode ajudar a identificar pacientes em risco de desenvolver doença disseminada avançada e menor

expectativa de vida, exigindo uma abordagem cirúrgica e terapêutica mais agressiva desde o início (JUAREZ *et al.*, 2021).

Uma metanálise investigou uma potencial correlação entre polimorfismos do gene *TGF- $\beta$ 1* e câncer de pulmão e concluiu que o polimorfismo rs1800469 não está implicado na suscetibilidade doença na população geral, no entanto, indivíduos com genótipo TT têm uma incidência ligeiramente menor de câncer de pulmão em comparação com indivíduos com os demais genótipos, sugerindo um possível papel protetor da variante TT para a suscetibilidade ao câncer de pulmão em pacientes com NSCLC (CHEN *et al.*, 2019).

Apesar do presente estudo não ter encontrado associação entre os polimorfismos investigados e a Covid-19, a influência de polimorfismos genéticos na suscetibilidade à infecção por SARS-CoV-2 tem sido demonstrada. GÓMEZ e colaboradores encontraram associação entre o polimorfismo rs2285666 do gene *ACE2* e o risco de desenvolvimento de Covid grave em um estudo realizado na Espanha com 204 pacientes com Covid-19 (137 casos não graves e 67 casos graves de UTI) e 536 controles pareados por idade (GÓMEZ *et al.*, 2020).

Outro exemplo é um estudo realizado por KIM e colaboradores na Coreia do Sul com o intuito de encontrar biomarcadores genéticos para a gravidade do Covid-19. Foi avaliada uma correlação no nível populacional entre a taxa de letalidade do Covid-19 e polimorfismos genéticos de vários genes potenciais como *IFITM3*, *ACE2*, *TMPRSS2*, *IL6*, *LZTFL1* e os genes *ABO*. Para investigar essa correlação, foi obtido o número de casos e mortes de Covid-19 do painel da OMS Covid-19 e calculada a taxa de letalidade de cada grupo étnico. As frequências alélicas dos polimorfismos dos genes acima citados foram obtidas através do Projeto 1000 Genomes. Três SNPs do gene *IFITM3*: rs12252, rs34481144 e rs6598045, foram fortemente correlacionados com a mortalidade. Esse gene é classificado como membro dos pequenos genes estimulados por interferon (ISGs) e desempenha um papel primordial na defesa contra vírus envelopados, incluindo vírus influenza A (KIM *et al.*, 2021).

No presente estudo não foi encontrada diferença entre os níveis de expressão do gene *TGF- $\beta$ 1* e o desfecho, gravidade ou presença de comorbidades em pacientes com Covid-19. Entretanto, um estudo realizado por VILLALBA e colaboradores (2020), em Cuba, com 45 pacientes infectados por SARS-CoV-2 (divididos em dois grupos: assintomáticos e sintomáticos) e 20 controles avaliou a resposta inflamatória precoce nas vias aéreas superiores através da análise da expressão dos genes *IFN- $\gamma$* , *TGF- $\beta$ 1* e *RANTES* e demonstrou que a expressão do *TGF- $\beta$ 1* foi significativamente menor em pacientes positivos para SARS-CoV-2 do que no grupo controle. De acordo com os sintomas, a concentração de mRNA de *TGF- $\beta$ 1*

não diferiu significativamente entre os grupos, embora a expressão tenha sido menor em pessoas assintomáticas em relação aos casos sintomáticos (VILLALBA *et al.*, 2020).

Estudo prévio feito por GHAZAVI e colaboradores no Irã, com 63 pacientes adultos com Covid-19 e 33 indivíduos saudáveis pareados por gênero e idade demonstrou que TGF- $\beta$ 1 aumentou significativamente em pacientes com a forma grave da doença, possivelmente devido à infiltração de células imunes nos pulmões, que podem liberar TGF- $\beta$ 1 no sangue dos pacientes (GHAZAVI *et al.*, 2020).

Já ZHENG e colaboradores em um estudo realizado na China com 285 pacientes com sepse (119 pacientes com sepse grave e 166 pacientes com sepse leve) e 285 indivíduos saudáveis (grupo controle) encontrou níveis plasmáticos de TGF- $\beta$ 1 mais altos nos pacientes com sepse grave, indicando que a maior concentração dessa citocina contribui para piora do quadro (ZHENG *et al.* 2021).

Em relação aos genótipos dos polimorfismos rs1800468 e rs1800469 e a expressão do gene *TGF- $\beta$ 1*, no presente estudo foi observado que indivíduos com o genótipo TT do polimorfismo rs1800469 expressavam quantidade significativamente menor de *TGF- $\beta$ 1* em comparação aos demais genótipos. De modo oposto, JUAREZ e colaboradores observaram menor quantidade de TGF- $\beta$ 1 em indivíduos com o genótipo CC do polimorfismo rs1800469.

Já a ausência de associação entre os polimorfismos rs1800469 e rs1800468 do gene *TGF- $\beta$ 1* com o desfecho e a expressão gênica com desfecho, gravidade ou presença de comorbidades em indivíduos com Covid-19 pode ser atribuído a complexa rede de interação existente na ativação da resposta imunológica à infecção. Assim, o amplo fenótipo observado em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 é possivelmente resultado de diferenças interindividuais, genéticas e adquiridas, que influenciam no curso clínico da doença, onde diferentes pacientes com Covid-19 e até mesmo o mesmo paciente em diferentes estágios da doença podem apresentar patogênese e manifestações clínicas diversas.

Como limitações do presente estudo, o tamanho amostral e a escassez de dados na literatura sobre a contribuição do gene *TGF- $\beta$ 1* e seus polimorfismos com o prognóstico de pacientes com Covid-19 dificultou a interpretação dos dados encontrados. No entanto, destacamos o ineditismo do presente trabalho em avaliar os polimorfismos rs1800468 e rs1800469 do gene *TGF- $\beta$ 1* e sua expressão em indivíduos com Covid-19 em uma população brasileira.

Desse modo, estudos adicionais comparando a expressão de *TGF- $\beta$ 1* em diferentes momentos da infecção, além de estudos que avaliem a influência de polimorfismos nesse gene em diferentes grupos étnicos se fazem necessários para melhor caracterizar o papel das

alterações moleculares envolvendo este gene e seus polimorfismos na patogênese da Covid-19.

## 5 CONCLUSÃO

O presente estudo conclui que não há associação entre os polimorfismos rs1800468 e rs1800469 do gene *TGFβ1* com o desfecho de pacientes com Covid-19. Além disso, a presença de comorbidades, a gravidade e o desfecho não influenciaram a expressão do gene *TGFβ1* na amostra avaliada. No entanto, constatamos que indivíduos com genótipo TT do polimorfismo rs1800469 possuem menores níveis de *TGFβ1*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLI, A.; RAHIMI, M.; KHODAIE, R.; HASHEMZAEI, N.; HOSSEINI, SM. Role of genetic variants and host polymorphisms on COVID-19: From viral entrance mechanisms to immunological reactions. **J Med Virol**, v.94, n.5, p. 1846-1865, 2022.
- ALSHARIF, W.; QURASHI, A. Effectiveness of COVID-19 diagnosis and management tools: A review. **Radiography**, v. 27, n. 2, p. 682–687, 2021.
- ANASTASSOPOULOU, Cleo *et al.* Human genetic factors associated with susceptibility to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease severity. **Human Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2020.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Diagnóstico e Tratamento da COVID-19 TRATAMENTO. **Secretaria De Ciência, Tecnologia, Inovação E Insumos Estratégicos Em Saúde**, v. 1, p. 1–398, 2020.
- BROEKELMANN T, LIMPER AH, COLBY TV, *et al.*, Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. **ProcNatlAcadSciUSA** v.88, p.6642–6646, 1991.
- BORDER WA, RUOSLAHTI E. TGF- in disease: The dark side of tissue repair. **J Clin Invest**, v.90, p.1–6, 1992.
- CASALENA, Gabriella *et al.* TGF $\beta$ -Induced Actin Cytoskeleton Rearrangement in Podocytes Is Associated with Compensatory Adaptation of Mitochondrial Energy Metabolism. **Nephronvol.** v.131, n.4, p.278-284, 2015.
- CASANOVA, J. L., SU, H. C. COVID Human Genetic Effort. A Global Effort to Define the Human Genetics of Protective Immunity to SARS-CoV-2 Infection. **Cell**, v.181, n.6, p.1194–1199, 2020.
- CDC. Center of Disease Control and Prevention Disponível em: <<https://www.cdc.gov/>>. , 2022
- CHEN, GUANGYUAN *et al.* Association between TGF- $\beta$ 1 rs1982073/rs1800469 polymorphism and lung cancer susceptibility: An updated meta-analysis involving 7698 cases and controls. **Medicine** v. 98, n.47, 2019.
- COSTELA-RUIZ, Víctor J. *et al.* SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 54, p. 62–75, 2020.
- CUI, Jie; LI, Fang; SHI, Zheng Li. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, 2019.
- DAVID, S.; DORADO, G.; DUARTE, EL.; DAVID-BOSNE, S.; TRIGUEIRO-LOURO, J.; REBELO-DE-ANDRADE, H. COVID-19: impact on Public Health and hypothesis-driven investigations on genetic susceptibility and severity. **Immunogenetics**. v. 29, p.1–27, 2022.

DE ALMEIDA-PITITTO, Bianca *et al.* Severity and mortality of COVID 19 in patients with diabetes, hypertension and cardiovascular disease: A meta-analysis. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2020.

DE WIT, Emmie *et al.* SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 523–534, 2016.

DHAINAUT JF, CHARPENTIER J, CHICHE JD. Transforming growth factor-beta: a mediator of cell regulation in acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Med.** 2003 v.4 Suppl: 258-64, 2003

DI MARIA, E., LATINI, A., BORGIANI, P., NOVELLI, G. Genetic variants of the human host influencing the coronavirus-associated phenotypes (SARS, MERS and COVID-19): rapid systematic review and field synopsis. **Human genomics**, v.14,n.1, p.30, 2020.

DUNNING, AM; ELLIS, PD; MCBRIDE, S.; *et al.* A transforming growth factorbeta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. **Cancer Res.** v.63, n.10, p.2610-2615, 2003.

FARA, Antonella *et al.* Cytokine storm and COVID-19: a chronicle of pro-inflammatory cytokines: Cytokine storm: The elements of rage! **Open Biology**, v. 10, n. 9, 2020.

FERREIRA-GOMES, M., KRUGLOV, A., DUREK, P. *et al.* SARS-CoV-2 in severe COVID-19 induces a TGF- $\beta$ -dominated chronic immune response that does not target itself. **Nat Commun**, v.12, p. 1961, 2021.

FU, Yajing; CHENG, Yuanxiong; WU, Yuntao. Understanding SARS-CoV-2-Mediated Inflammatory Responses: From Mechanisms to Potential Therapeutic Tools. **VirologicaSinica**, v. 35, n. 3, p. 266–271, 2020.

GETCHELL ML, BOGGESS MA, PRUDEN II SJ, LITTLE SS, BUCH S, THOMAS V. Expression of TGF- $\beta$  type II receptors in the olfactory epithelium and their regulation in TGF- $\alpha$  transgenic mice. **Brain Res**, v.945, p.232-241, 2002.

GHAZAVI, A.; GANJI, A.; Cytokine profile and disease severity in patients with COVID-19. **Cytokine**, v. 137, 2021.

GÓMEZ, Juan *et al.* Angiotensin-converting enzymes (ACE, ACE2) gene variants and COVID-19 outcome. **Gene** vol. 762, 2020.

GRAINGER, David J. *et al.* Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type  $\beta$ 1. **Human Molecular Genetics**, v. 8, n. 1, p. 93–97, 1999.

GUAN, Wei-jie *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 18, p. 1708–1720, 2020.

HE, Bing *et al.* Linkage and association analysis of genes encoding cytokines and myelin proteins in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 86, n. 1, p. 13–19, 1998.

HUSSAIN, Snawar et al. Identification of Novel Subgenomic RNAs and Noncanonical Transcription Initiation Signals of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. **Journal of Virology**, v. 79, n. 9, p. 5288–5295, 2005.

JINNAI, Nobuyoshi et al. Polymorphisms in the prostaglandin E2 receptor subtype 2 gene confer susceptibility to aspirin-intolerant asthma: A candidate gene approach. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 24, p. 3203–3217, 2004.

JOHN C. SMULIAN SONJA A. RASMUSSEN MD, M S. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-. **Ann Oncol**, n. January, p. 19–21, 2020.

JUAREZ, Ignacio et al. TGF-B1 polymorphisms and TGF-β1 plasma levels identify gastric adenocarcinoma patients with lower survival rate and disseminated disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 25, n. 2, p. 774–783, 2021.

KARUNASAGAR, Iddya; KARUNASAGAR, Indrani. Ongoing COVID-19 Global Crisis and Scientific Challenges. **Journal of Health and Allied Sciences NU**, v. 10, n. 01, p. 01–02, 2020.

KHADKE, Sumanth et al. Harnessing the immune system to overcome cytokine storm and reduce viral load in COVID-19: a review of the phases of illness and therapeutic agents. **Virology Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–18, 2020.

KAM, JWK.; RAJA, R.; CLOUTIER, JF. Cellular and molecular mechanisms regulating embryonic neurogenesis in the rodent olfactory epithelium. **Int J Dev Neurosci**, v.37, p.76–86, 2014.

KIM, Yong Chan; JEONG, ByungHoon. Strong correlation between the case fatality rate of covid-19 and the rs6598045 single nucleotide polymorphism (Snp) of the interferon-induced transmembrane protein 3 (ifitm3) gene at the population-level. **Genes**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2021.

LI, B., KHANNA, A., SHARMA, V., SINGH, T., SUTHANTHIRAN,M., AUGUST,P. TGF-beta1 DNA polymorphisms, protein levels, and blood pressure. **Hypertension (Dallas, Tex: 1979)**, v.33 (Pt 2), p.271–275., 1999.

LOEYS, Bart L. et al. Aneurysm Syndromes Caused by Mutations in the TGF-β Receptor. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 8, p. 788–798, 2006.

LUEDECKING, Erin K. et al. Analysis of genetic polymorphisms in the transforming growth factor-β1 gene and the risk of Alzheimer’s disease. **Human Genetics**, v. 106, n. 5, p. 565–569, 2000.

MARTELOSSI CEBINELLI, Guilherme Cesar et al. TGF-β1 functional polymorphisms: A review. **European Cytokine Network**, v. 27, n. 4, p. 81–89, 2016.

MARZEC, Jacqui M. et al. Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury .**The FASEB Journal**, v. 21, n. 9, p. 2237–2246, 2007.

MATSUMURA, S et al. Increase in transforming growth factor-beta in the brain during infection is related to fever, not depression of spontaneous motor activity. **Neuroscience**, v. 144, n.3, p.1133-1140, 2007

MONTALVO VILLALBA, MARÍA CARIDAD et al. Interferon gamma, TGF- $\beta$ 1 and RANTES expression in upper airway samples from SARS-CoV-2 infected patients. **Clinical immunology**. vol. 220, 2020.

MORIKAWA, Masato; DERYNCK, Rik; MIYAZONO, Kohei. Roles in Cell and Tissue Physiology. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, p. 1–24, 2016.

NAKAMURA, Shin ichi et al. Polymorphism in the 5'-flanking region of human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene is associated with myocardial infarction. **Circulation**, v. 105, n. 25, p. 2968–2973, 2002.

NOGALES, Aitor; DEDIEGO, Marta L. Host single nucleotide polymorphisms modulating influenza a virus disease in humans. **Pathogens**, v. 8, n. 4, p. 1–22, 2019.

OMER, Fakhreldin M.; DE SOUZA, J. Brian; RILEY, Eleanor M. Differential Induction of TGF- $\beta$  Regulates Proinflammatory Cytokine Production and Determines the Outcome of Lethal and Nonlethal Plasmodium yoelii Infections. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 10, p. 5430–5436, 2003.

ONO, Shujiet *al.* A promoter SNP (-1323T>C) in G-substrate gene (GSBS) correlates with hypercholesterolemia. **Journal of Human Genetics**, v. 48, n. 9, p. 447–450, 2003.

Painel da OMS COVID-19. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2020. Disponível online: <https://covid19.who.int/> (última citação: [28 de fevereiro de 2022]).

PERRIER, Anabelle *et al.* The C-terminal domain of the MERS coronavirus Mprotein contains a trans-Golgi network localization signal. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 39, p. 14406–14421, 2019.

RAI, Praveen *et al.* Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 2, p. 441–455, 2021.

SANTACROCE, Luigi *et al.* The human coronaviruses (HCoV) and the molecular mechanisms of SARS-CoV-2 infection. **Journal of Molecular Medicine**, v. 99, n. 1, p. 93–106, 2021.

SCHMITTGEN, Thomas D.; LIVAK, Kenneth J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SHAH, Vibhuti Kumar *et al.* Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons From the Past. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. August, p. 1–17, 2020.

SHEN, Wei Xi *et al.* Features of Cytokine Storm Identified by Distinguishing Clinical Manifestations in COVID-19. **Frontiers in Public Health**, v. 9, n. May, p. 1–6, 2021.

SHENG J, CHEN W, ZHU HJ. The immune suppressive function of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in human diseases. **Growth Factors**, v.33, n.2, p.92-101, 2015.

SHULL MM, ORMSBY I, KIER AB, *et al.*, Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. **Nature**, v. 359, p.693–699, 1992.

SINGHAL, Tanu. Review on COVID19 disease so far. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 87, n. April, p. 281–286, 2020.

SUGATANI, Junko *et al.* Identification of a defect in the UGT1A1 gene promoter and its association with hyperbilirubinemia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 292, n. 2, p. 492–497, 2002.

TIAN, Jianbo *et al.* “Clinical characteristics and risk factors associated with COVID-19 disease severity in patients with cancer in Wuhan, China: a multicentre, retrospective, cohort study.” **The Lancet. Oncology** vol. 21,7 (2020).

VANDENBROECK, Koen. Cytokine gene polymorphisms and human autoimmune disease in the era of genome-wide association studies. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 32, n. 4, p. 139–151, 2012.

WAHL, SM; WEN, J; MOUTSOPOULOS, N. TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege. **Immunol Rev**, v.213, p213–227, 2006.

WIELAND, Eberhard. Immunological Biomarkers in Blood to Monitor the Course and Therapeutic Outcomes of COVID-19. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 44, n. 1, p. 148–165, 2022.

WORLDOMETERS. Pandemia de coronavírus covid-19. Disponível em <https://www.worldometers.info/coronavirus/2021>. Acesso em 15/01/2022.

WU, D., *et al.* Type 1 Interferons Induce Changes in Core Metabolism that Are Critical for Immune Function. **Immunity**, v.4, n.6., p.1325–1336., 2016

WU, Zunyou; MCGOOGAN, Jennifer M. Asymptomatic and Pre-Symptomatic COVID-19 in China. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 1, p. 10–11, 2020.

XU, J.; YU, X.; HUANG, C., *et al.* Association of 5 Well-Defined Polymorphisms in the Gene Encoding Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 With Coronary Artery Disease Among Chinese Patients With Hypertension. **Angiology**. v. 66(7), p.652-658, 2015

YAMADA, Yoshiji *et al.* Association of a polymorphism of the transforming growth factor beta-1 gene with prevalent vertebral fractures in Japanese women. **American Journal of Medicine**, v. 109, n. 3, p. 244–247, 2000.

ZHANG, Yuanchun *et al.* Analysis of Serum Cytokines in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. **Infect Immun**, v. 72, n. 8, p. 4410–4415, 2004.

ZHAO, Wei *et al.* Relation between chest CT findings and clinical conditions of coronavirus disease (covid-19) pneumonia: A multicenter study. **American Journal of Roentgenology**, v. 214, n. 5, p. 1072–1077, 2020.

ZHENG, Ruibing *et al.* “Association of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Gene Polymorphisms and Inflammatory Factor Levels with Susceptibility to Sepsis. **Genetic testing and molecular biomarkers**, vol. 25, n. 3, 2021.

ZHOU, Yulong *et al.* Risk factors associated with disease progression in a cohort of patients infected with the 2019 novel coronavirus. **Annals of Cardiothoracic Surgery**, v. 9, n. 2, p. 428–436, 2020.

## APÊNDICE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **Avaliação do papel dos linfócitos citotóxicos na infecção pelo COVID-19 (SARS-CoV-2)**, coordenado por mim Helio Moraes de Souza, professor Titular da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). O objetivo dessa pesquisa é “Avaliar o papel dos linfócitos citotóxicos na infecção pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2)”, ou seja, analisar as células de defesa do organismo que são responsáveis por combater infecções causadas por vírus, como o coronavírus, por exemplo.

Como você coletou sangue por suspeita de infecção por coronavírus, gostaria de contar com sua participação, uma vez que nas últimas semanas o número de casos suspeitos e confirmados no Brasil vem aumentando, se tornando uma ameaça para a saúde pública.

Atualmente, as opções de tratamento para o Covid-19 necessitam de mais estudos para garantir a eficácia e segurança para os pacientes. O estudo das células da defesa imune contra o novo coronavírus pode auxiliar nesse propósito e também a entender se alterações nessas células modificam a forma como a doença se manifesta, seja com sintomas leves, moderados ou graves. Essa pesquisa vai avaliar a produção de substâncias produzidas por estas células e se existe alguma alteração genética que faz com que essas células respondam de maneira diferente, o que pode interferir na capacidade de defesa do organismo contra o novo coronavírus. Essa pesquisa é importante, pois, conhecer como o sistema de defesa do nosso organismo se comporta pode contribuir com novos tratamentos, mais bem direcionados e adequados aos pacientes com Covid-19.

Caso aceite participar, será necessário doar 10 mL de sangue (dois tubos de sangue) que será coletado de uma veia em seu braço, em dois momentos: no momento de sua admissão no serviço de saúde e no décimo quinto dia após a admissão. Não será feito nenhum procedimento que traga risco a sua vida. Você poderá ter algum desconforto na coleta de sangue, com possibilidade de um pequeno hematoma ou dor leve, como acontece em toda coleta de sangue. A coleta será realizada por profissional devidamente treinado (sempre com o seu consentimento prévio) no momento em que estiver coletando sangue para a realização dos seus exames de rotina, não sendo necessário que sua veia seja puncionada novamente para a coleta de amostras para essa pesquisa. O tempo estimado para a coleta de sangue é de aproximadamente 2 a 5 minutos. Essas amostras serão processadas em laboratório com nível

de biossegurança estruturado para os estudos de Covid-19, localizado no HC/UFTM e posteriormente analisadas no Laboratório de Pesquisas Hematológicas e Hemoterápicas da UFTM.

Para evitar a perda de confidencialidade, isto é, para que sua participação não seja divulgada, nós utilizaremos códigos (letras e/ou números) em substituição ao seu nome para a sua identificação na pesquisa, e todos os resultados serão armazenados em banco de dados com acesso exclusivo dos pesquisadores com vistas a manter a confidencialidade das informações.

Você não terá nenhum benefício direto com sua participação, entretanto com este trabalho haverá a possibilidade na melhoria e/ou desenvolvimento de terapias mais eficazes e precoces na assistência a indivíduos com Covid-19. Sua participação é voluntária, e em decorrência disso você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você também não terá nenhum gasto por participar nesse estudo.

Você pode se recusar a participar do estudo, ou se retirar a qualquer momento, sem que haja qualquer constrangimento junto aos pesquisadores ou prejuízo quanto aos atendimentos de saúde nesta ou em qualquer outra unidade hospitalar. Para isso basta dizer ao pesquisador que lhe entregou este documento. Em qualquer momento, você pode obter quaisquer informações sobre a sua participação nesta pesquisa, diretamente com os pesquisadores ou por contato com o CEP/HC-UFTM.

Sua identidade não será revelada para ninguém, ela será de conhecimento somente dos pesquisadores da pesquisa. Seus dados serão publicados em conjunto, sem o risco de você ser identificado, mantendo o seu sigilo e privacidade. Você tem direito a requerer indenização diante de eventuais danos que você sofra em decorrência dessa pesquisa.

Seu sangue será utilizado apenas para a realização dessa pesquisa e ficará armazenado por cinco anos no Laboratório de Pesquisas Hematológicas e Hemoterápicas – Disciplina de Hematologia e Hemoterapia/ICS-UFTM para eventual necessidade de repetição dos testes. Após esse período, os seus dados destruídos e o material biológico será descartado em local apropriado. Caso haja interesse de novo projeto ou emenda, o mesmo será submetido ao CEP e você será informado para decidir se aceita ou não participar. Caso aceite, você assinará um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**Contato**

Pesquisador Responsável: Helio Moraes de Souza

E-mail: [heliomoraes@uftm.edu.br](mailto:heliomoraes@uftm.edu.br)

Telefone: (34) 3074-3247

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, 250, Nossa Senhora da Abadia, 38025-440, Uberaba/MG.

\*Dúvidas ou denúncia em relação a esta pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (CEP/HC-UFTM), pelo e-mail: [cep.hctm@ebserh.gov.br](mailto:cep.hctm@ebserh.gov.br), pelo telefone (34) 3318-5319, ou diretamente no endereço Rua Benjamim Constant, 16, Bairro NossaSenhora da Abadia – Uberaba – MG – de segunda a sexta-feira, das 07h às 12h e das 13h às 16h.

## ANEXOS

### ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
TRIÂNGULO MINEIRO -  
HC/UFTM



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Avaliação do papel dos linfócitos citotóxicos na infecção pelo COVID-19 (SARS-CoV-2)

**Pesquisador:** Helio Moraes de Souza

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);  
A critério do CEP

**Versão:** 4

**CAAE:** 31328220.8.0000.8667

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**Patrocinador Principal:** CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.401.919

##### **Apresentação do Projeto:**

Trata-se de uma emenda ao Projeto aprovado no dia 16/05/2020 sob o parecer no.4.031.318.

Resumo do Projeto aprovado:

**ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO**

# Submission Confirmation

---

Thank you for your submission

---

**Submitted to**

Biomarkers in Medicine

**Manuscript ID**

BMM-2022-0177

**Title**

Relation of TGF- $\beta$ 1 gene with the prognosis of patients with Covid-19

**Authors**

Carminati, Christiane

Cameiro, Anna Cecília

Moraes-Souza, Helio

**Date Submitted**

18-Mar-2022

## ANEXO C – ARTIGO CIENTÍFICO

### RELATION OF TGF- $\beta$ 1 GENE WITH THE PROGNOSIS OF PATIENTS WITH COVID-19

Christiane Ruffato Carminati<sup>1</sup>, Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka<sup>2</sup>, Anna Cecília Dias Maciel Carneiro<sup>2</sup>, Fernanda Bernadelli de Vito<sup>2</sup>, Loren Queli Pereira<sup>2</sup>, Andrezza Cristina Cancian Hortolani da Cunha<sup>2</sup>, Mariângela Torreglosa Ruiz Cintra<sup>3</sup>, Marcos Vinícius da Silva<sup>4</sup>, Virmondes Rodrigues Júnior<sup>5</sup>, Roseane Lopes da Silva Grecco<sup>1</sup>, Helio Moraes de Sousa<sup>2</sup>.

1 Disciplina de Genética, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG; 2 Disciplina de Hematologia e Hemoterapia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG; 3 Disciplina de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 4, Disciplina de Parasitologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 5 Disciplina de Imunologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG.

Covid-19, Cytokine, Genetic Polymorphism, SARS-COV-2, TGF- $\beta$ 1

#### ABSTRACT

This study aimed to investigate the role of the TGF- $\beta$ 1 gene in SARS-CoV-2 infection. A total of 178 individuals diagnosed with Covid-19 participated and, they were divided in two groups related to the outcome (discharge or death). Genotyping of rs1800468 and rs1800469 polymorphisms of TGF- $\beta$ 1 gene was performed in 178 samples, using the allelic discrimination technique and, gene expression analysis was performed in 93 samples by Real Time PCR. There was no association between the genotypic frequencies of TGF- $\beta$ 1 gene polymorphisms analyzed with the prognosis of patients with Covid-19. There was no significant difference between gene expression and the clinical data evaluated. A statistically significant difference was observed in the expression of the TGF- $\beta$ 1 gene between the CT and TT genotypes of the rs1800469 polymorphism, with lower gene expression in the presence of the TT genotype. Regarding the rs1800468 polymorphism, no statistically significant difference was observed in the expression of the TGF- $\beta$ 1 gene in relation to the analyzed genotypes. The present study concluded that the rs1800468 and rs1800469 polymorphisms of the TGF- $\beta$ 1 gene are not associated with the prognosis of patients with Covid-19 and which the TT genotype of the rs1800469 polymorphism reduces the expression of TGF- $\beta$ 1.

Keywords: Covid-19, Cytokines, Genetic polymorphism, SARS-COV-2, TGF- $\beta$ 1

## INTRODUCTION

The Corona Virus Disease 19 (Covid-19) was initially related in Wuhan, China, in the end of December 2019, as a pneumonia of unknown cause. The causative agent was quickly identified as a  $\beta$ -coronavirus genera, was then called SARS-CoV-2 because of its closed relation with severe acute respiratory syndrome (SARS) (RAI *et al.*, 2021). This disease, transmitted mainly by respiratory droplets, has a rapid spread, which made the World Health Organization (WHO) officially declare Covid-19 as a public health emergency of international concern in early 2020 (KARUNASAGAR, 2020).

The clinical spectrum of this disease variates of asymptomatic to symptomatic cases and, the severe complications are more frequently in elderly patients and/or with associated comorbidities (diabetes mellitus, cardiovascular diseases, obesity and kidney diseases), suggesting which inefficient immune responses can play an important role in infection outcome (FERREIRA-GOMES *et al.*, 2021; KHADKE *et al.*, 2020). The Covid-19 has a particular feature, mainly in severe cases, which is an exacerbated inflammatory response, where abnormal levels of different cytokines such as IL6, IL8, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ 1 have already been related (COSTELA-RUIZ *et al.*, 2020; DI MARIA *et al.*, 2020).

The TGF- $\beta$ 1 is a multifunctional cytokine with regulatory functions including proliferation, differentiation, migration and apoptosis (MORIKAWA, *et al.*, 2016). It performed an important role in tissue repair after lesions in multiple organs, including lungs, where its acting in tissue repair is fundamental for the fibroproliferative response development (SHULL, *et al.*, 1992; BROEKELMANN *et al.*, 1991). The literature shows which TGF- $\beta$ 1 has a crucial role in respiratory complications caused by Covid-19, because it promotes the activation of bronchial mucosal cells and inducing the production of large amounts of thick mucus and pulmonary. Also, the clinical manifestations of this disease are highly consistent with the increase of TGF- $\beta$ 1 activity, reinforcing its key role in the cytokine storm resulting of SARS-CoV-2 infection (SHEN *et al.*, 2021).

The TGF- $\beta$ 1 gene is localized in 19q13.2 chromosome and genetic variants in this gene have been associated with susceptibility to several diseases such as rheumatoid arthritis, hypertension (LI *et al.*, 1999), multiple sclerosis (HE, 1998) and, osteoporosis (YAMADA *et al.*, 2000). It is believed which the individual genetic profile plays an important role in determining the clinical response to the virus. However, the establishment of molecular mechanisms involving TGF- $\beta$ 1 are still not fully understood and require further studies

(CASANOVA, 2020). Therefore, the aimed of this study is to evaluate the role of TGF- $\beta$ 1 gene in the prognostic of patients infected by SARS-CoV-2.

## **METHODS**

### **Ethical considerations**

This study was approved by the Research Ethics Committee of Clinical Hospital of the Federal University of Triângulo Mineiro (CAAE 31328220.8.0000.8667), and the participants signed the consent form.

### **Sample characterization**

This is an observational, cohort study. A total of 178 patients diagnosed with Covid-19 were included, according to the guidelines established by the Ministry of Health (BRASIL, 2020) treated in hospital units in the city of Uberaba-MG, from May 2020 to November 2021. Data such as age, pre-existing diseases, period of hospitalization, outcome (death or discharge) and severity were obtained through a survey of medical records. To define severity, the following parameters were used: mild condition – patient in good general condition, saturation above 95%, without the need for mechanical ventilation; severe condition – patient requiring mechanical ventilation.

### **DNA Extraction and Genotyping**

Samples of 10mL of peripheral blood were collected by venipuncture, in sterile collection tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The patients genomic DNA were extracted using Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification kit (PROMEGA<sup>®</sup> – EUA), according to manufacturer recommendations.

The genotyping of TGF- $\beta$ 1 gene and, the polymorphisms rs1800468 and rs1800469 were performed in 178 samples, by the allelic discrimination technique with TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays System (ABI, EUA) by Real-time PCR using the 7500 equipment (ABI, EUA). The probes and the primers were designed by Applied Biosystems (Assay ID: C\_\_8708473\_10; C\_\_8708474\_20). The PCR reactions were performed according to the manufacturer recommendations.

### **RNA Extraction and Gene expression**

The RNA extraction was performed in 93 samples, using extraction kit SV Total RNA Isolation System (PROMEGA - EUA), according to manufacturer recommendations. The reverse transcription for cDNA obtaining were performed with High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems<sup>™</sup>, EUA), according to manufacturer instructions.

Relative quantification of the TGF- $\beta$ 1 gene was performed by real time PCR, using the 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems<sup>™</sup>) equipment. The ACTB reference gene

was used as an endogenous control. Assays containing specific primers and probes for each gene (ACTB and TGF- $\beta$ 1) were pre-designed by Applied Biosystems (Hs99999903\_m1 and Hs00998133\_m1, respectively) and performed according to the manufacturer recommendations. Relative quantification (RQ) was performed by the  $2^{-\Delta C_t}$  method (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008), where the threshold cycle (Ct) is the cycle in which the fluorescence level reaches sufficient quantity for sample detection.

### **Statistical Analysis**

Continuous variables were described as mean  $\pm$  standard deviation and categorical variables were expressed as percentage. Statistical comparisons between two groups were performed using the Mann-Whitney test and for comparisons between more than two groups the Kruskal Wallis test was used. For qualitative variables, statistical comparisons were performed using the chi-square test. The statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Sample characterization**

In this study, 178 patients diagnosed with Covid-19 participated. It was 108 men (60,7%) and 70 women (39,3%) participated. The mean age was 59 years ( $\pm 17,5$ ) and was a statistical significant difference relative to age and the outcome (death) of patients,  $p = 0.001$ . The ethnicity of patients was reported in 136 cases, as follows: white (59%), oriental (3,6%), black (3,6%) and, mixed race (33,8%). Regarding the outcome of the patients, it was found that 90 died (50.6%) and 88 patients were discharged (49.4%). Regarding comorbidities, 131 (73.6%) had one or more comorbidities: 82 with systemic arterial hypertension, 42 with diabetes mellitus, 75 with other comorbidities (obesity, hypothyroidism, asthma), and 47 had no comorbidities. There was a significant difference between the outcome (death) of patients with comorbidities,  $p = 0.005$ .

### **Analysis of TGF- $\beta$ 1 gene polymorphisms (rs1800468 and rs1800469)**

The polymorphisms rs1800469 and rs1800468 in the TGF- $\beta$ 1 were analyzed in 178 samples. The genotypical and allelic frequencies to the polymorphisms compared to the outcome of patients are presented in the Table 1. No statistically significant difference was observed between genotypic frequencies and patient outcomes for the investigated polymorphisms ( $p = 0.248$  and  $p = 0.921$ ). Both polymorphisms are in Hardy Weinberg Equilibrium: rs1800468 (High Group:  $\chi^2 = 0.56$ ,  $p = 0.45$ ; Death Group:  $\chi^2 = 0.31$ ,  $p = 0.58$ ); rs1800469 (High Group:  $\chi^2 = 0.0014$ ,  $p = 0.97$ ; Death Group:  $\chi^2 = 0.90$ ,  $p = 0.34$ ).

**Table 1:** Distribution of genotypic and allelic frequencies of rs1800469 C>T and rs1800468 G>A polymorphisms in the TGF- $\beta$ 1 gene in relation to outcome.

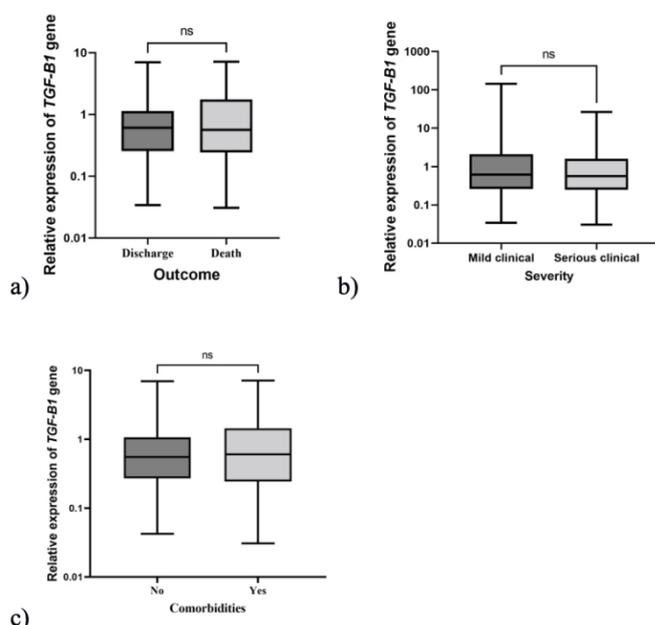
Polymorfism	Discharge n(%)	Death n(%)	p
rs1800468			
GG	75 (85,2)	80 (88,9)	0,248
GA	13 (14,8)	10 (11,1)	
AA	0	0	
rs1800469			
CC	11(12,5)	12 (13,3)	0,921
CT	40 (45,5)	36 (40,0)	
TT	37 (42,0)	42 (46,7)	
<b>Allelic frequencies</b>			
rs1800468			
G	163(49,0)	170 (51,0)	
A	13 (56,6)	10 (43,4)	
rs1800469			
C	62 (50,9)	60 (49,1)	0,79
T	114 (48,7)	120 (51,3)	

Chi-squared test.

## TGF- $\beta$ 1 gene expression

### Comparison between TGF- $\beta$ 1 gene expression and clinical data

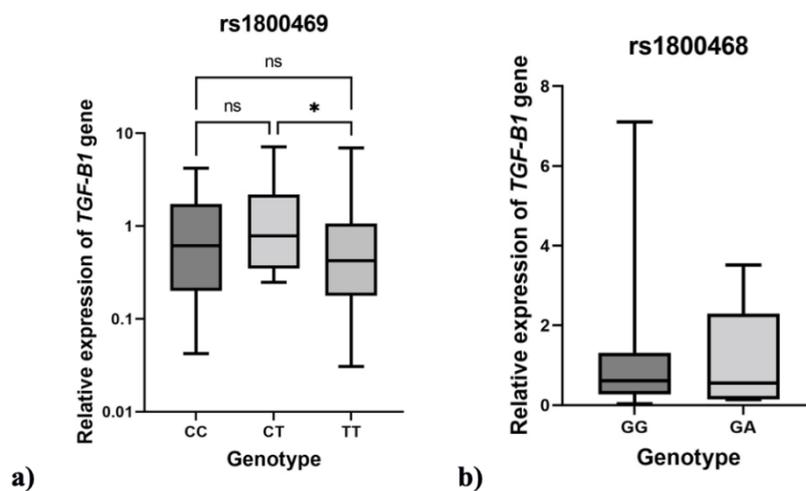
The relative quantification of the TGF- $\beta$ 1 gene was performed in 93 samples. TGF- $\beta$ 1 gene expression was compared for outcome (discharge and death), severity (mild and severe) and, presence or absence of comorbidities. There were no significant differences between gene expression and the evaluated data ( $p=0.65$ ,  $p=0.65$  and  $p=0.53$ ) (**Figure 1**).



**Figure1** – Comparison between TGF- $\beta$ 1 gene expression and: (a) patient's outcome, (b) severity of cases, (c) presence or absence of comorbidities. Mann-Whitney test.

### Comparison between TGF- $\beta$ 1 gene expression and genotypes of polymorphisms rs1800468 and rs1800469

The expression of the TGF- $\beta$ 1 gene was compared with the genotypes of the rs1800469 and rs1800468 polymorphisms. A statistically significant difference was observed in the expression of the TGF- $\beta$ 1 gene between the CT and TT genotypes of the rs1800469 polymorphism, with lower gene expression in the presence of the TT genotype ( $p=0.03$ ). In contrast, in the rs1800468 polymorphism, no statistically significant difference was observed in the expression of the TGF- $\beta$ 1 gene in relation to the GG and GA genotypes ( $p= 0.91$ ) (Figure 2).



**Figure 2** – Comparison between TGF- $\beta$ 1 gene expression and genotypes of the rs1800469 C>T polymorphism. Kruskal Wallis test.

## DISCUSSION

Comorbidities are conditions which actively affect manifestations and clinical outcomes of patients infected with SARS-CoV-2. Tian and collaborators (2020) evaluated data from 13.077 individuals with Covid-19 at nine hospitals of Wuhan, China, between January and March 2020. They observed which diabetes, hypertension and cardiovascular disease were highly prevalent among patients, predisposing them to poor clinical outcomes (TIAN, 2020).

Similarly, a systematic review realized with data of 18.012 patients with Covid-19 concluded which diabetes, hypertension and cardiovascular diseases are important risk factors for severity and mortality in people infected (DE ALMEIDA-PITITTO *et al.*, 2020). These data are in line with those observed in the present study, where it was found that hypertension and diabetes were the predominant comorbidities, demonstrating the influence of certain risk factors on the outcome of the infection.

Considering which TGF- $\beta$ 1 plays an important task in innate and acquired immunity (WAHL *et al.*, 2006) and, rs1800468 and rs1800469 polymorphisms regulate protein expression levels (LUEDECKING *et al.*, 2000), increasing and decreasing, respectively, the production of TGF- $\beta$ 1 (LOEYS *et al.*, 2006; GRAINGER *et al.*, 1999), we expected to find correlation between the presence of these polymorphisms and disease severity, which was not observed.

However, although the present study did not find an association between the evaluated polymorphisms and Covid-19, the influence of genetic polymorphisms on the susceptibility to SARS-CoV-2 infection has been demonstrated. Gómez and collaborators found an association between the rs2285666 polymorphism of ACE2 gene and the risk of developing severe Covid-19, in a study realized in Spain with 204 patients (137 non-severe cases and 67 severe ICU cases) and 536 controls paired by age. That study suggested that *ACE-ID* polymorphism was associated to the risk of severe COVID-19 development, depending on hypertension status. The ACE rs2285666 variant was associated with hypertension in the elderly population, with no significant difference between patients with Covid-19 mild and severe (GÓMEZ *et al.*, 2020).

Another example is a study conducted by KIM and collaborators in South Korea to find genetic biomarkers for Covid-19 severity. It was evaluated a populational-level correlation between Covid-19 fatality rate and genetic polymorphisms of several potential genes related to Covid-19, including IFITM3, ACE2, TMPRSS2, IL6, LZTFL1 and, the ABO genes. These correlations were investigated with the numbers of Covid-19 cases and deaths from the WHO Covid-19 panel and calculated the fatality rate for each ethnic group. The allelic frequencies of polymorphisms evaluated were obtained through the 1000 Genomes Project. Three SNPs of the IFITM3 gene, rs12252, rs34481144, and rs6598045, were strongly correlated with mortality. This gene is classified as a member of small interferon-stimulated genes for (ISGs) and plays a primordial role in defense against enveloped viruses, including influenza A virus (KIM, *et al.*, 2021).

The influence of TGF- $\beta$ 1 gene polymorphisms, rs1800468 and rs1800469, and Covid-19 has not available data yet however it has already been analyzed in other diseases. Juarez and collaborators in Spain (2021) evaluated these same polymorphisms in plasma samples from 108 patients with gastric adenocarcinoma and observed an association between the G/A genotype of the rs1800468 polymorphism and the worse disease prognostic. It was also noticed which this polymorphism promotes lower production of TFG- $\beta$ 1, increasing chances of metastasis development and, concluded that these SNPs can help to identify patients at risk

of developing advanced disseminated disease and shorter life expectancy, requiring surgical and therapeutic more aggressive approach from the beginning (JUAREZ *et al.*, 2021).

A review study, by meta-analysis, investigated a potential correlation between the TGF- $\beta$ 1 gene rs1800469 polymorphism and lung cancer. This study concluded which this polymorphism is not implicated in lung cancer susceptibility in the general population, however, the analysis indicated that it decreases the risk of lung cancer in patients with NSCLC (non-small cell lung cancer). Individuals with the TT genotype have a slightly lower incidence of lung cancer compared to individuals with the other genotypes, suggesting a possible protective role of the TT variant for lung cancer susceptibility in patients with NSCLC. (CHEN *et al.*, 2019).

In the present study, no difference was found between the expression levels of the TGF- $\beta$ 1 gene and the outcome, severity or presence of comorbidities in patients with Covid-19. However, a study carried out by Villalba *et al.* (2020), in Cuba, with 45 patients positive for SARS-CoV-2 (divided into two groups: asymptomatic and symptomatic) and 20 controls, evaluated the early inflammatory response in the upper airways through the analysis of the expression of IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1 and RANTES genes. It was demonstrated which the expression of TGF- $\beta$ 1 was significantly lower in patients positive for SARS-CoV-2 than in the control group. According to symptoms, the concentration of TGF- $\beta$ 1 mRNA did not differ significantly between the groups, although the expression was lower in asymptomatic people compared to symptomatic cases (VILLALBA *et al.*, 2020).

A previous study by Ghazavi and colleagues in Iran, with 63 adult patients with Covid-19 and 33 healthy individuals matched for gender and age, showed that TGF- $\beta$ 1 increased significantly in patients with the severe form of the disease, possibly due to the infiltration of immune cells. in the lungs, which can release TGF- $\beta$ 1 into the blood of patients (GHAZAVI *et al.*, 2020). Zheng *et al.*, in a study carried out in China with 285 patients with sepsis (119 patients with severe sepsis and 166 patients with mild sepsis) and 285 healthy individuals (control group) found plasma levels of TGF- $\beta$ 1 higher in patients with severe sepsis, indicating that the higher concentration of this cytokine contributes to the worsening of the condition (ZHENG *et al.* 2021).

Regarding the genotypes of the rs1800468 and rs1800469 polymorphisms and the expression of the TGF- $\beta$ 1 gene, in the present study it was observed that individuals with the TT genotype of the rs1800469 polymorphism expressed significantly lower amounts of TGF- $\beta$ 1 compared to the other genotypes. Conversely, JUAREZ *et al.* observed lower amounts of TGF- $\beta$ 1 in individuals with the CC genotype of the rs1800469 polymorphism. As for the

rs1800468 polymorphism, no homozygous mutant was identified and no statistically significant difference was observed in gene expression between the GG and GA genotypes.

A study carried out in China in patients with sepsis associated the rs1800469 polymorphism of the TGF- $\beta$ 1 gene to lower plasma levels of this cytokine and a reduced risk of susceptibility to sepsis. However, the same study observed that the rs1800468 polymorphism was associated with higher levels of TGF- $\beta$ 1 and greater susceptibility to sepsis (ZHENG, et al. 2021), a result that is different from the result found in our study.

The fact that the present study had not found an association between the rs1800469 and rs1800468 polymorphisms of the TGF- $\beta$ 1 gene and the outcome, nor with the gene expression with the outcome, severity, or presence of comorbidities in individuals with Covid-19, can be attributed to the complex network of interaction in the activation of the immune response to infection. Thus, the broad phenotype observed in patients infected with SARS-CoV-2 is possibly the result of inter-individual, genetic, and acquired differences, which influence the clinical course of the disease, where different patients with Covid-19 and even the same patient at different stages of the disease can present diverse pathogenesis and clinical manifestations.

As limitations of the study, the sample size and the scarcity of data in the literature on the contribution of the TGF- $\beta$ 1 gene and its polymorphisms to the prognosis of patients with Covid-19 made it difficult to interpret the data found. However, we highlighted the novelty of this work in evaluating the rs1800468 and rs1800469 polymorphisms of TGF- $\beta$ 1 gene and its expression in individuals with Covid-19 in a Brazilian population. Thus, more studies comparing the expression of TGF- $\beta$ 1 at different times of infection, in addition to studies which evaluate the influence of polymorphisms in this gene in different ethnic groups are necessary to better characterize the role of molecular alterations involving this gene in the pathogenesis of the disease. Covid-19.

## **CONCLUSION**

This study concluded that there is no association between rs1800468 and rs1800469 *TGF $\beta$ 1* polymorphisms with prognostic of patients with Covid-19. Besides, the presence of comorbidities, severity and outcome did not influence the gene expression of *TGF $\beta$ 1* in the samples evaluated. Thus, we concluded that individuals with TT genotype of rs180046 polymorphism has lower levels of *TGF $\beta$ 1*.

## REFERENCES

- BROEKELMANN T, LIMPER AH, COLBY TV, *et al.*, Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. **ProcNatlAcadSciUSA** v.88, p.6642–6646, 1991.
- CASANOVA, J. L., SU, H. C. COVID Human Genetic Effort. A Global Effort to Define the Human Genetics of Protective Immunity to SARS-CoV-2 Infection. **Cell**, v.181, n.6, p.1194–1199, 2020.
- CHEN, GUANGYUAN *et al.* Association between TGF- $\beta$ 1 rs1982073/rs1800469 polymorphism and lung cancer susceptibility: An updated meta-analysis involving 7698 cases and controls. **Medicine** v. 98, n.47, 2019.
- COSTELA-RUIZ, Víctor J. *et al.* SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 54, n. January, p. 62–75, 2020.
- DE ALMEIDA-PITITTO, Bianca *et al.* Severity and mortality of COVID 19 in patients with diabetes, hypertension and cardiovascular disease: A meta-analysis. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2020.
- DI MARIA, E., LATINI, A., BORGIANI, P., NOVELLI, G. Genetic variants of the human host influencing the coronavirus-associated phenotypes (SARS, MERS and COVID-19): rapid systematic review and field synopsis. **Human genomics**, v.14,n.1, p.30, 2020.
- FERREIRA-GOMES, M., KRUGLOV, A., DUREK, P. *et al.* SARS-CoV-2 in severe COVID-19 induces a TGF- $\beta$ -dominated chronic immune response that does not target itself. **Nat Commun**, v.12, p. 1961, 2021.
- GHAZAVI, A.; GANJI, A.; Cytokine profile and disease severity in patients with COVID-19. **Cytokine**, v. 137, 2021.
- GÓMEZ, Juan *et al.* Angiotensin-converting enzymes (ACE, ACE2) gene variants and COVID-19 outcome. **Gene** vol. 762, 2020.
- HE, Bing *et al.* Linkage and association analysis of genes encoding cytokines and myelin proteins in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 86, n. 1, p. 13–19, 1998.
- JUAREZ, Ignacio *et al.* TGF- $\beta$ 1 polymorphisms and TGF- $\beta$ 1 plasma levels identify gastric adenocarcinoma patients with lower survival rate and disseminated disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 25, n. 2, p. 774–783, 2021.
- KARUNASAGAR, Iddya; KARUNASAGAR, Indrani. Ongoing COVID-19 Global Crisis and Scientific Challenges. **Journal of Health and Allied Sciences NU**, v. 10, n. 01, p. 01–02, 2020.
- KHADKE, Sumanth *et al.* Harnessing the immune system to overcome cytokine storm and reduce viral load in COVID-19: a review of the phases of illness and therapeutic agents. **Virology Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–18, 2020

KIM, Yong Chan; JEONG, Byung Hoon. Strong correlation between the case fatality rate of covid-19 and the rs6598045 single nucleotide polymorphism (Snp) of the interferon-induced transmembrane protein 3 (ifitm3) gene at the population-level. **Genes**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2021.

LI, B., KHANNA, A., SHARMA, V., SINGH, T., SUTHANTHIRAN, M., AUGUST, P. TGF-beta1 DNA polymorphisms, protein levels, and blood pressure. **Hypertension (Dallas, Tex: 1979)**, v.33 (Pt 2), p.271–275., 1999.

LOEYS, Bart L. et al. Aneurysm Syndromes Caused by Mutations in the TGF- $\beta$  Receptor. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 8, p. 788–798, 2006.

LUEDECKING, Erin K. et al. Analysis of genetic polymorphisms in the transforming growth factor- $\beta$ 1 gene and the risk of Alzheimer's disease. **Human Genetics**, v. 106, n. 5, p. 565–569, 2000.

MONTALVO VILLALBA, MARÍA CARIDAD et al. Interferon gamma, TGF- $\beta$ 1 and RANTES expression in upper airway samples from SARS-CoV-2 infected patients. **Clinical immunology**. vol. 220, 2020.

MORIKAWA, Masato; DERYNCK, Rik; MIYAZONO, Kohei. Roles in Cell and Tissue Physiology. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, p. 1–24, 2016.

RAI, Praveen *et al.* Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 2, p. 441–455, 2021.

SHEN, Wei Xi *et al.* Features of Cytokine Storm Identified by Distinguishing Clinical Manifestations in COVID-19. **Frontiers in Public Health**, v. 9, n. May, p. 1–6, 2021.

SHULL MM, ORMSBY I, KIER AB, *et al.*, Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. **Nature**, v. 359, p.693–699, 1992.

TIAN, Jianbo et al. “Clinical characteristics and risk factors associated with COVID-19 disease severity in patients with cancer in Wuhan, China: a multicentre, retrospective, cohort study.” **The Lancet. Oncology** vol. 21,7 (2020).

WAHL, SM; WEN, J; MOUTSOPOULOS, N. TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege. **Immunol Rev**, v.213, p213–227, 2006.

ZHENG, Ruibing et al. “Association of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Gene Polymorphisms and Inflammatory Factor Levels with Susceptibility to Sepsis.” **Genetic testing and molecular biomarkers** vol. 25, 3, 2021.

