

Perfil genético do locus HLA-B em pacientes admitidos por COVID-19 no Hospital Municipal Padre Germano Lauck (Foz do Iguaçu/PR, Brasil)

Resumo: As manifestações clínicas causadas pela COVID-19 foram diversificadas, compreendendo níveis assintomáticos e brandos à casos graves de proporções letais. O sistema Antígeno Leucocitário Humano (HLA) classe I possui um papel fundamental na modulação da resposta imune específica ao processo de infecção de SARS-CoV-2. Essa função está relacionado com sua capacidade de apresentação de antígenos aos linfócitos T CD8 +, desencadeando uma cascata de sinalizações. Nesse estudo preliminar, foram identificados os grupos alélicos de HLA classe I locus B de 27 e 47 pacientes da Unidade de Tratamento Intensivo (UTI), do Hospital Municipal de Foz do Iguaçu, de 2020 e 2021, respectivamente. O grupo alélico B*07 apresentou uma mudança na ocorrência, entre os anos, para pacientes que receberam alta ou foram à óbito, seguido de uma mesma tendência apresentada pelo B*35. Em relação ao tempo de permanência, pacientes portadores de B*07 apresentaram menor tempo em relação aos demais grupos, esse tempo inferior está relacionada com sua prevalência em pacientes que vieram a óbito.

Keywords: Genética, HLA-B, COVID-19

Genetic profile of the HLA-B locus in patients admitted for COVID-19 at Hospital Municipal Padre Germano Lauck (Foz do Iguaçu/PR, Brazil)

Abstract: Clinical manifestations caused by COVID-19 ranged from asymptomatic and mild levels to severe cases of lethal proportions. The Human Leukocyte Antigen (HLA) class I system presents a key role in modulating the immune response to the SARS-CoV-2 infection process. This function is related to its ability to present antigens to CD8 + T lymphocytes, triggering a signaling cascade. In this preliminary study, the allelic groups of HLA class I locus B were identified in 27 and 47 patients from the Intensive Care Unit (ICU) at the Municipal Hospital of Foz do Iguaçu, in 2020 and 2021, respectively. The allelic group B*07 showed a change in occurrence, between the years,

for patients who were discharged or died, followed by the same trend presented by B*35. Regarding the days in ICU, patients with B*07 had a shorter time than the other groups, this effect is related to the prevalence in patients who died soon after admission.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

No Brasil, a doença respiratória aguda grave COVID-19 causada pelo agente viral SARS-CoV-2, já foi responsável por, aproximadamente, 26 milhões de casos e 628 mil óbitos (atualizado em fevereiro de 2022: <https://covid.saude.gov.br/>). O país é caracterizado pela variabilidade genômica com proporções de difícil caracterização, fator que pode resultar em diferentes respostas ao processo de infecção na população (SECOLIN et al., 2021).

Um possível fator que impacta os quadros de infecções é o sistema HLA (Antígeno Leucocitário Humano), uma versão humana do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) (KLEIN; SATO, 2000). Esse sistema governa nosso sistema imune adaptativo por meio da apresentação de peptídeos patogênicos para os linfócitos T, de forma intracelular e extracelular (ITURRIETA-ZUAZO et al., 2020; KLEIN; SATO, 2000; NGUYEN et al., 2020; NOVELLI et al., 2020). O HLA Classe I possui um papel fundamental na modulação da resposta imune específica ao processo de infecção de SARS-CoV-2. Essa função está relacionado com sua capacidade de apresentação de antígenos intracelulares aos linfócitos T CD8 +, desencadeando uma cascata de sinalizações de ativação (SHKURNIKOV et al., 2021).

Assim, esse sistema compreende um importante componente para suscetibilidade ou resistência para muitas doenças infecciosas, tais como malária, tuberculose, hanseníase, HIV, entre outros (ITURRIETA-ZUAZO et al., 2020). O polimorfismo na região do sistema HLA gera modificações na composição de aminoácidos no sítio de ligação de peptídeos do MHC, resultando em diferentes padrões na apresentação de epitopos às células T. Em relação a COVID-19, diferentes grupos concentram esforços na identificação de um perfil alélico dos loci HLA na modulação da resistência ou suscetibilidade. Nguyen e colaboradores (2020) utilizaram análise in silico para definir a

afinidade de ligação de peptídeos conservados de SARS-CoV-2 com sítios de apresentação do MHC e estimaram que certos alelos apresentam baixa (HLA-B*46:01) e alta (HLA-B*15:03) capacidade de apresentação, podendo resultar em progressões severas ou brandas, respectivamente.

Outros grupos sequenciaram os loci HLA de pacientes admitidos por COVID-19 e avaliaram a relação com a progressão dos casos, demonstrando que certos alelos podem apresentar suscetibilidade à doença, como: na Itália, com HLA-DRB1*15:01, HLA-DQB1*0602, HLA-B*27:07 (NOVELLI et al., 2020); na China, com HLA-C*07:29 e HLA-B*15:27 e também, o sorotipo HLA-B22 (YUNG et al., 2021); no Reino Unido, com HLA-DRB1*04:01 (LANGTON et al., 2021); na Alemanha, Suíça e Espanha, com HLA-C*04:01; nos Estados Unidos, o desfecho negativo de uma coorte de pacientes negros está relacionado ao sorotipo HLA-B53 (NORIN et al., 2021). Em contrapartida, uma Estudo de Associação de Genômica Ampla (GWAS - sigla em inglês) não identificou associação entre a progressão de pacientes com COVID-19 e SNPs na região do locus HLA, assim como, nenhuma associação alélica significativa (THE SEVERE COVID-19 GWAS GROUP, 2020).

Em relação ao Brasil, Secolin e colaboradores (2021) apresentam apenas dois alelos HLA-B com afinidade alta por peptídeos virais de SARS-CoV-2 (>300 peptídeos em alta afinidade) presentes na população brasileira. Portanto, esta classe pode essa apresentar mais alelos com associação de suscetibilidade à COVID-19. Neste contexto o presente projeto busca descrever o perfil alélico do locus HLA-B para pacientes admitidos na Unidade de Tratamento Intensivo (UTI), no Hospital Municipal de Foz do Iguaçu, entre os anos de 2020 e 2021, correlacionando as variáveis clínicas e o desfecho de cada paciente.

2 METODOLOGIA

2.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto faz parte do projeto "Perfil da população do oeste paranaense acometido de Síndrome Respiratória Aguda Grave entre 2020 a 2022", aprovado pelo

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, CAAE 36189220.3.0000.8527, Número do Parecer: 4.250.900.

2.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os pacientes COVID-19 positivo admitidos na Unidade de Tratamento Intensivo (UTI), no Hospital Municipal Paulo Germano Lauck, entre 2020 e 2021, foram submetidos à análise genotípica de HLA-B. Os indivíduos foram selecionados priorizando o histórico hospitalar e quadro clínicos melhor documentados durante o período de internação. A pesquisa faz parte da Ação 9 de enfrentamento à COVID-19 no âmbito da Universidade Federal da Integração Latino-Americana – Unila, intitulada “Medicina personalizada para tratamento de pacientes COVID-19 em Foz do Iguaçu” (PORTARIA No 193/2020/GR) (ProjCOVID).

2.2.1 Seleção de Indivíduos COVID-19 positivo

As amostras foram coletadas de pacientes admitidos e apresentando testes RT-qPCR positivo anteriormente ou na admissão hospitalar. O perfil clínico dos indivíduos foi coletado com as seguintes variáveis: idade; sexo; número de comorbidades (comorbidade cardiovascular, renal, neurológica, hematológica ou hepática, diabetes, doença respiratória crônica, obesidade ou imunodeficiência); autodeclaração racial e étnica (Branco, Preto, Pardo, Amarelo ou Indígena); tempo de hospitalização; tempo de UTI; tempo de ventilação mecânica; necessidade de internação na UTI; e quadro de vacinação.

Os pacientes com declaração de nacionalidade estrangeira, tempo de internação no Hospital superior a 65 dias (considerados *outliers*) e que apresentam resultados ambíguos para os genótipos dos grupos alélicos de HLA foram removidos desta análise.

O histórico hospitalar foi consultado por meio do Sistema de Gestão Tasy (Koninklijke Philips N.V, Inc., Amsterdam, NL) utilizado pelo Hospital Municipal Padre

Germano Lauck, assim como, os quadros clínicos atuais foram coletados no projeto ProjCOVID.

2.2.2 Fase Laboratorial

De cada paciente foram coletados cerca de 6 ml de sangue periférico em tubo contendo anticoagulante EDTA (Tubo Greiner Bio-One) e armazenados em refrigeração - 80°C pela equipe de enfermagem hospitalar. As amostras tiveram o DNA extraído via kit extração *Geno Plus Mini* VIOGENE, numerados e armazenados no banco de amostras do LPCM-UNILA. A quantificação de cada amostra foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop ND2000 (Thermo Fischer Inc., Waltham, MA, EUA).

Os éxons de HLA classe I *loci* B foram genotipados por Sequenciamento de Grupo Específico (GSSP) via kit *SeScore Sequencing GSSP* (One Lambda, Inc), a partir de amostras do DNA extraído dos pacientes SARS-CoV-2 positivo. As amostras foram checadas, purificadas e sequenciadas em sequenciador automático de *DNA ABI 3500* (Thermo Fischer Inc., Waltham, MA, EUA). As análises dos dados obtidos foram realizadas em Software *uTYPE Dx HLA Sequence Analysis* (One Lambda, Inc). Eventualmente algumas amostras apresentaram resultados com ambiguidade em baixo nível de resolução (grupos alélicos), essas amostras foram filtradas.

2.2.3 Análise Estatística

As frequências dos grupos alélicos foram determinadas por meio de contagem direta. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado por teste exato por Guo & Thompson, aplicando uma abordagem modificada do algoritmo da Cadeia de Markov para análise de múltiplos alelos (GUO; THOMPSON, 1992). As frequências relativas dos grupos alélicos de HLA-B do Estado do Paraná foram coletadas a partir do

depósito de informações da Rede Nacional de Doadores de Médula Óssea (REDOME), no *Allele Frequency Net Database* (GONZALEZ-GALARZA et al., 2020).

As variáveis clínicas foram representadas por mediana e interquartil, média e desvio padrão ou contagem direta e porcentagem quando forem variáveis contínuas com distribuição paramétrica, não-paramétrica e contagem direta, respectivamente. A comparação das variáveis clínicas entre desfecho para cada ano e entre os anos de coleta receberam p-valor calculado por Teste Exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson para análises paramétricas e Teste de U Mann-Whitney para análises não-paramétricas. As variáveis clínicas foram submetidas a análises de correlação parciais e ajustadas para métodos mais relevantes para cada tipo de variáveis (Correlação policrônica foi conduzida quando valores ordinais estavam envolvidos (por exemplo, tabagismo, 1 - Não, 2 - Ex, 3 - Sim), tetracrônica quando as variáveis possuem fatores binários, ponto-biserial para comparações entre binárias com valores contínuos e Pearson para testes contendo variáveis contínuas).

Os p-valores das comparações das frequências de HLA-B entre os grupos foram obtidos por Teste Exato de Fisher. As frequências alélicas inferiores a 5% (ou $n < 5$) em cada ano foram agrupadas em "binned" para reduzir possíveis erros de sequenciamento e genotipagem. Para testar os modelos, foram selecionadas as variáveis clínicas que apresentaram potencial confundidor e preditor, a partir das análises de associação e correlação. Para testar a associação entre as variáveis categóricas dependentes, desfecho e ano de coleta, e as doses dos grupos alélicos (ex: 0, 1 e 2 para genótipos homozigotos ausente, heterozigoto e homozigoto presente para determinado alelo, respectivamente) de HLA foi analisado um modelo aditivo de regressão logística ajustado para covariáveis, obtendo a razão de chances, intervalos de confiança e seus respectivos p-valores.

Em relação à variável contínua dependente, dias de internação na UTI, foi avaliado o modelo que melhor se ajustou a distribuição amostral por meio da verificação da distribuição dos resíduos e comparação entre resíduos ajustados e observados. O modelo aditivo de regressão negativa binomial foi utilizado para avaliar a razão de efeito da interação entre doses dos grupos alélicos e defecho, e a influencia dos grupos alélicos ajustados para idade, no tempo de internação na UTI. Uma análise

de contraste foi realizada entre as médias marginais estimadas para obter a razão de efeito entre as interações. Não houve grupo controle, portanto, a base para os cálculos de regressão foi obtida a partir do alelo com menor tempo de internação. Todas análises foram realizadas no software RStudio (R versão 4.1.2) ao nível de significância adotado de 5% ($p < 0.05$). Quando mencionado, os p-valores foram ajustados para múltiplas comparações com o método de Bonferroni.

2.3 FERRAMENTAS E PACOTES

Todas as análises foram executadas utilizando pacotes R. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado com o pacote *Genepop* e sua função *test_HW()*. As frequências alélicas do REDOME foram obtidas com o pacote *immunotation* e função *query_allele_frequencies()*. As comparações das variáveis clínicas entre os grupos amostrais tiveram suas médias (Desvio Padrão), mediana (interquartil), contagem (porcentagem) e p-valor calculados com o pacote *gt_summary*, disponível com o objeto/função *tbl_summary()*. As comparações entre as frequências alélicas foram analisadas com pacote *rstatix*, utilizando *row_wise_fisher_test()*. A análise de correlação utilizou o pacote *correlation* e sua função *correlation()*, o gráfico elaborado utilizou *corrplot.mixed()* do pacote *corrplot*. A razão de chances obtida com regressão logística utilizou o pacote *HIBAG* e sua função *hlaAssocTest()*. Os parâmetros de associação na análise de interação utilizando modelo de regressão binomial negativa foi realizado com o pacote *MASS* e sua função *glm.nb()*. O cálculo das médias marginais estimadas e a análise de contraste foi realizado com pacote *emmeans* e suas funções *emmeans()* e *contrast()*, respectivamente. O diagnóstico para os modelos lineares generalizados foi executado com pacote *DHARMA* e suas funções *simulatedResiduals()* e *testDispersion()*. Os gráficos foram elaborados utilizando variadas funções de *ggplot2* e *ggpubr*. A descrição das análises, figuras e tabelas foram escritas em RMarkdown e disponibilizadas em: <https://chagas98.github.io/hlafozpublic/SupplementaryMaterial.html>.

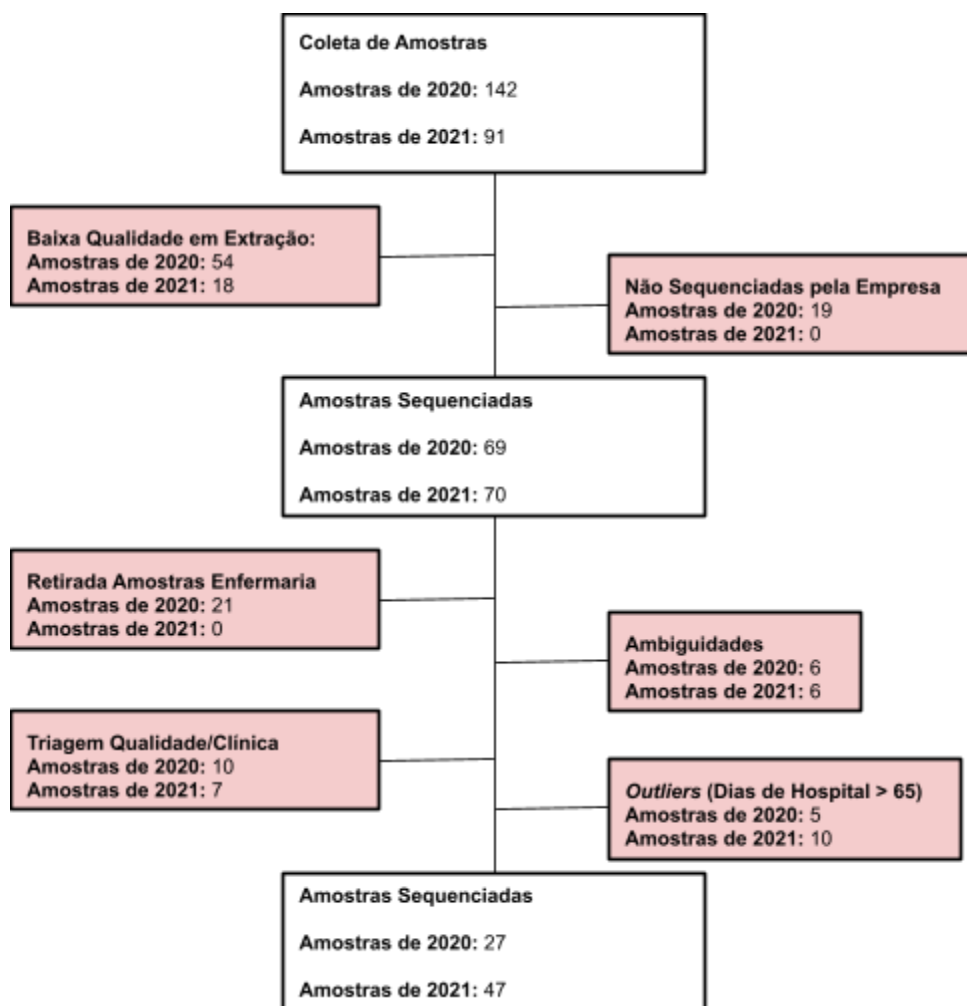
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 COLETA E TRIAGEM DE AMOSTRAS

No total, 142 e 91 amostras foram coletadas em 2020 e 2021, respectivamente. Após o processamento de controle de qualidade e triagem em relação à informação de nacionalidade, dias de hospital e ambiguidades dos alelos, as amostras sequenciadas utilizadas nesse estudo totalizaram em 27 e 47 amostras, representando 19% e 33% da coleta inicial, de 2020 e 2021, respectivamente (Esquema 1).

Em comparação à 2021, as amostras de 2020 apresentaram um baixo percentual de sucesso nas análises de qualidade. Esse fator pode ser justificado pela falta de cuidados com as amostras durante as etapas de coleta e seleção quando direcionados ao laboratório, fator que foi resolvido em relação ao ano de 2021. A análise de valores dos dias de internação no hospital discrepantes foi conduzida por mediana e interquartil (Figura S1). As amostras foram coletadas logo após a primeira e segunda onda (Figura S2), compreendendo as semanas epidemiológicas entre 8/2020 à 43/2020 e 43/2020 à 21/2021, respectivamente.

Esquema 1 - Fluxograma da Coleta e Separação de Amostras. *Fundo vermelho:* amostras retiradas.



Fonte: o autor, 2022.

3.2 PERFIL CLÍNICO

A idade entre os grupos divididos pelo ano de coleta e desfecho apresentam uma variação significativa ($p < 0.01$). Essa mudança na faixa-etária dos pacientes admitidos entre os anos de coleta pode estar relacionado com o período de vacinação (Figura S2) das faixa etárias mais idosas. Em relação ao desfecho, alta e óbito, a idade é um fator crucial na progressão dos casos de COVID-19, especialmente, em 2020 (RANZANI et al., 2021). Outro fator relevante é a ocorrência de dados ignorados entre os anos de 2020 e 2021, onde no segundo ano houve um registro melhor detalhado do perfil clínico dos pacientes.

Tabela 1 - Comparações das variáveis clínicas.

	Desfechos						p-valores		
	Alta20, N = 14 ¹	Alta21, N = 26 ¹	Óbito20, N = 13 ¹	Óbito21, N = 21 ¹	2020, N = 27 ¹	2021, N = 47 ¹	Alta20 vs. Óbito20 ²	Alta21 vs. Óbito21 ²	2020 vs. 2021 ²
Idade (em anos)	57.5 (52.8, 62.5)	44.0 (42.0, 50.0)	75.0 (65.0, 79.0)	58.0 (54.0, 65.0)	64.0 (55.5, 75.5)	52.0 (43.0, 58.5)	0.010	<0.001	<0.001
Faixa-etária (em anos)							0.029	<0.001	0.002
20-29	0.0 (0.0%)	0.0 (0.0%)	1.0 (7.7%)	0.0 (0.0%)	1.0 (3.7%)	0.0 (0.0%)			
30-39	1.0 (7.1%)	6.0 (23.1%)	0.0 (0.0%)	1.0 (4.8%)	1.0 (3.7%)	7.0 (14.9%)			
40-49	2.0 (14.3%)	13.0 (50.0%)	0.0 (0.0%)	2.0 (9.5%)	2.0 (7.4%)	15.0 (31.9%)			
50-59	7.0 (50.0%)	5.0 (19.2%)	1.0 (7.7%)	11.0 (52.4%)	8.0 (29.6%)	16.0 (34.0%)			
60-69	2.0 (14.3%)	2.0 (7.7%)	4.0 (30.8%)	5.0 (23.8%)	6.0 (22.2%)	7.0 (14.9%)			
70-79	2.0 (14.3%)	0.0 (0.0%)	6.0 (46.2%)	2.0 (9.5%)	8.0 (29.6%)	2.0 (4.3%)			
80+	0.0 (0.0%)	0.0 (0.0%)	1.0 (7.7%)	0.0 (0.0%)	1.0 (3.7%)	0.0 (0.0%)			
Sex							0.085	0.7	0.6
Feminino	4.0 (28.6%)	14.0 (53.8%)	8.0 (61.5%)	10.0 (47.6%)	12.0 (44.4%)	24.0 (51.1%)			
Masculino	10.0 (71.4%)	12.0 (46.2%)	5.0 (38.5%)	11.0 (52.4%)	15.0 (55.6%)	23.0 (48.9%)			
Raça Autodeclarada							>0.9	>0.9	0.8
Asiática	1.0 (7.1%)	1.0 (3.8%)	0.0 (0.0%)	0.0 (0.0%)	1.0 (3.7%)	1.0 (2.1%)			
Branca	7.0 (50.0%)	10.0 (38.5%)	7.0 (53.8%)	10.0 (47.6%)	14.0 (51.9%)	20.0 (42.6%)			
Parda	6.0 (42.9%)	14.0 (53.8%)	6.0 (46.2%)	11.0 (52.4%)	12.0 (44.4%)	25.0 (53.2%)			
Preta	0.0 (0.0%)	1.0 (3.8%)	0.0 (0.0%)	0.0 (0.0%)	0.0 (0.0%)	1.0 (2.1%)			
Número de Comorbidades							0.3	0.4	0.8
≥ 3 Comorbidades	1.0 (7.1%)	0.0 (0.0%)	0.0 (0.0%)	2.0 (9.5%)	1.0 (3.7%)	2.0 (4.3%)			
1 Comorbidade	6.0 (42.9%)	10.0 (38.5%)	6.0 (46.2%)	6.0 (28.6%)	12.0 (44.4%)	16.0 (34.0%)			
2 Comorbidades	3.0 (21.4%)	8.0 (30.8%)	6.0 (46.2%)	8.0 (38.1%)	9.0 (33.3%)	16.0 (34.0%)			
Sem Comorbidades	4.0 (28.6%)	8.0 (30.8%)	1.0 (7.7%)	5.0 (23.8%)	5.0 (18.5%)	13.0 (27.7%)			
Tabagismo							0.058	0.5	0.2
Ex	6.0 (42.9%)	2.0 (7.7%)	1.0 (7.7%)	4.0 (19.0%)	7.0 (25.9%)	6.0 (12.8%)			
Ignorado	1.0 (7.1%)	3.0 (11.5%)	5.0 (38.5%)	4.0 (19.0%)	6.0 (22.2%)	7.0 (14.9%)			
Não	6.0 (42.9%)	19.0 (73.1%)	4.0 (30.8%)	11.0 (52.4%)	10.0 (37.0%)	30.0 (63.8%)			
Sim	1.0 (7.1%)	2.0 (7.7%)	3.0 (23.1%)	2.0 (9.5%)	4.0 (14.8%)	4.0 (8.5%)			
Alcoolismo							0.2	0.8	0.3
Ex	1.0 (7.1%)	0.0 (0.0%)	0.0 (0.0%)	0.0 (0.0%)	1.0 (3.7%)	0.0 (0.0%)			
Ignorado	3.0 (21.4%)	8.0 (30.8%)	8.0 (61.5%)	9.0 (42.9%)	11.0 (40.7%)	17.0 (36.2%)			
Não	8.0 (57.1%)	17.0 (65.4%)	4.0 (30.8%)	11.0 (52.4%)	12.0 (44.4%)	28.0 (59.6%)			
Sim	2.0 (14.3%)	1.0 (3.8%)	1.0 (7.7%)	1.0 (4.8%)	3.0 (11.1%)	2.0 (4.3%)			
Coinfec. Bacteriana							0.3	0.3	0.6
Não	6.0 (42.9%)	10.0 (38.5%)	8.0 (61.5%)	11.0 (52.4%)	14.0 (51.9%)	21.0 (44.7%)			
Sim	8.0 (57.1%)	16.0 (61.5%)	5.0 (38.5%)	10.0 (47.6%)	13.0 (48.1%)	26.0 (55.3%)			
Dias de Internação	31.5 (26.2, 41.5)	29.5 (20.0, 40.0)	22.0 (19.0, 32.0)	28.0 (19.0, 36.0)	30.0 (20.0, 39.5)	29.0 (19.5, 38.0)	0.3	0.6	>0.9
Dias de UTI	25.5 (17.8, 30.8)	24.0 (11.2, 35.0)	20.0 (13.0, 30.0)	24.0 (16.0, 30.0)	25.0 (14.5, 30.5)	24.0 (13.5, 35.0)	0.6	0.8	0.8
Dias de Suporte Ventilatório	17.5 (11.2, 24.5)	20.5 (9.2, 29.2)	22.0 (13.0, 30.0)	25.0 (18.0, 36.0)	20.0 (11.5, 30.0)	24.0 (13.0, 32.5)	0.3	0.057	0.6
Período Primeiros Sintomas	9.2 (3.8)	9.7 (4.8)	6.2 (5.0)	9.5 (3.4)	7.7 (4.6)	9.6 (4.2)	0.075	0.7	0.058

¹Mediana (IQR); n (%); Mean (SD)

²Wilcoxon rank sum test; Fisher's exact test; Pearson's Chi-squared test

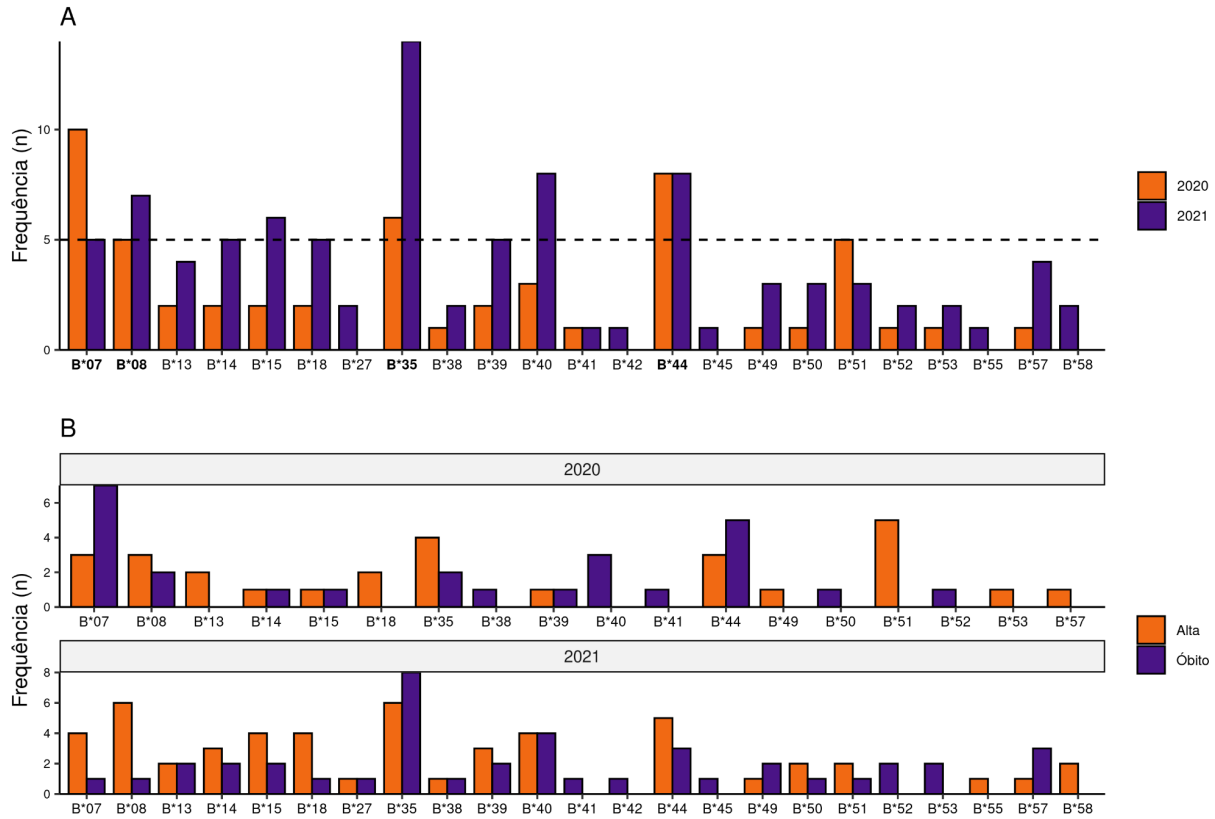
Fonte: o autor, 2022.

3.3 FREQUÊNCIAS DOS GRUPOS ALÉLICOS

As frequências dos grupos alélicos foram comparadas entre ano de coleta e desfecho (alta e óbito). No total, foram identificados 23 grupos alélicos do locus HLA-B, onde somente 4 grupos não foram agrupados em "binned" (Figura 1).

O B*07 apresentou diferença significativa entre os anos de coleta ($p = 0.02$) e óbitos em 2020 e 2021 ($p = 0.004$), esse último sugerindo uma mudança na ocorrência em pacientes com alta e óbito (Tabela 2). Já o B*41 apresentou diferença considerável entre os desfechos para 2020, mas não atingindo o limiar de significância. Quando ajustado os p-valores para múltiplas comparações, no entanto, os p-valores perdem significância. Outro grupo alélico que apresentou diferença entre os desfechos de cada ano é o grupo alélico B*35. As demais comparações realizadas podem ser conferidas no material suplementar.

Figura 1 - Frequência dos alelos identificados. (A) agrupados em ano de coleta e (B) desfecho por ano de coleta. A linha tracejada em (A), $n = 5$, identifica os alelos com menor e maior frequência; as anotações destacadas no eixo x representam os alelos de maior frequência, não agrupados em “binned”.



Fonte: o autor, 2022.

Além disso, quando comparadas as frequências relativas do grupo controle com as frequências coletadas do REDOME, o grupo alélico B*07 apresentou uma diferença percentual evidente entre 2020 (18%), 2021 (5%) e REDOME (7%) (Figura S1).

Tabela 2 - Comparações entre as Frequências dos Grupos Alélicos.

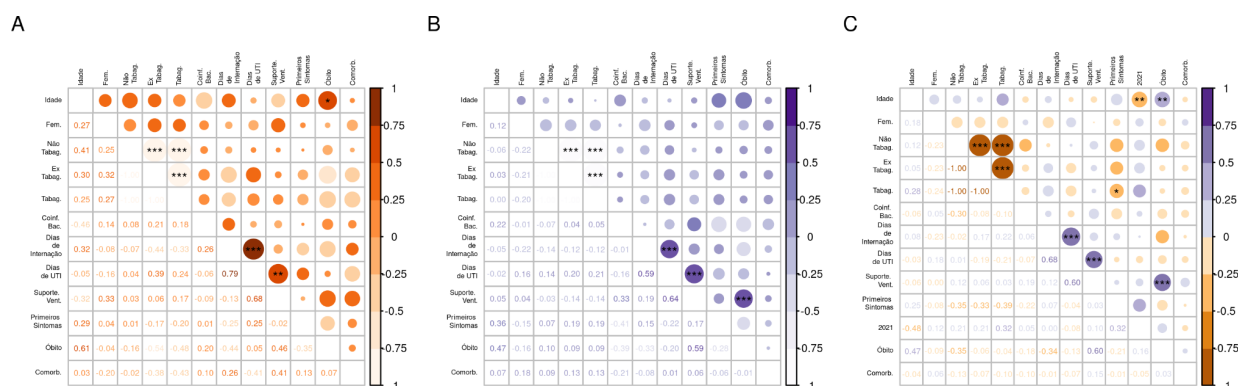
Alelos	p	p.adj	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1 (n)	Grupo 2 (n)	Outros 1 (n)	Outros 2 (n)
B*41	0.052	1.0000	Alta20	Óbito20	5	0	23	26
B*07	0.020	0.4720	2021	2020	5	10	89	44
B*07	0.004	0.0909	Óbito20	Óbito21	7	1	19	41

Fonte: o autor, 2022.

3.4 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO

Primeiramente, as análises de correlação apresentaram covariáveis com potencial confundidor e que podem ser adicionadas aos próximos modelos de regressão para ajuste. A idade, novamente, foi a covariável que apresentou maior índice de correlação, apresentaram uma correlação positiva entre óbitos em 2020 e a idade ($r = 0.61$, $p_{\text{Bonferroni}} = 0.047$) e uma correlação negativa entre a idade e a incidência em 2021 ($r = -0.48$, $p_{\text{Bonferroni}} = 0.001$) (Figura 2).

Figura 2 - Correlação entre variáveis clínicas em (A) 2020, (B) 2021 e (c) ambos os anos. $p < 0.05$ (*), $p < 0.02$ (**), $p < 0.01$ (***)



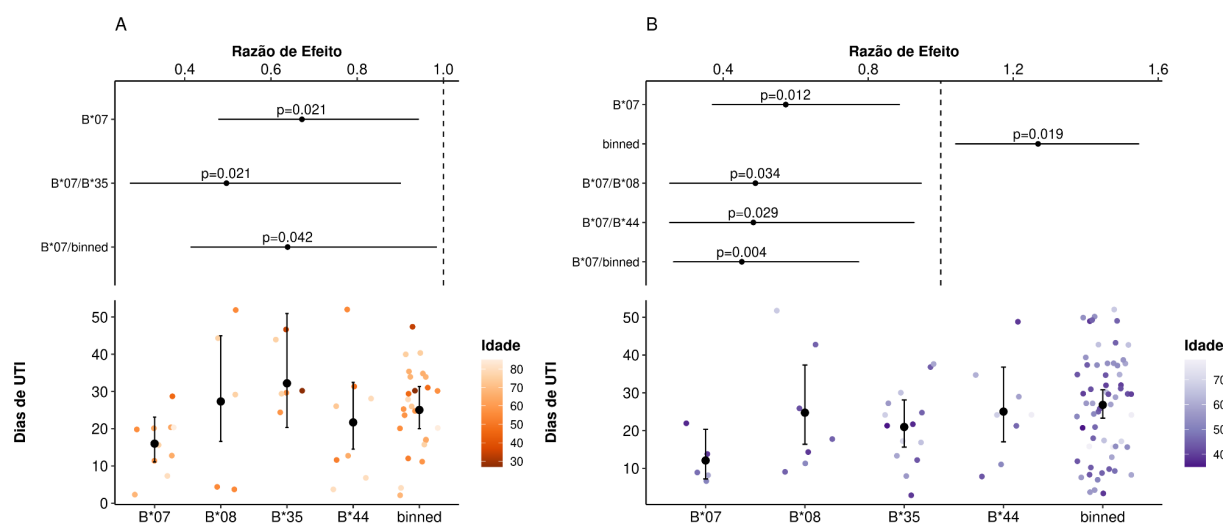
Fonte: o autor, 2022.

Na análise de associação utilizando modelos de regressão, apenas a influência do grupo alélico B*07 ajustado para idade na incidência entre os anos apresentou significâncias (RC = 0.25, 95% IC [0.07, 0.93], $p = 0.04$). Em relação as demais análises, entre os desfechos de cada ano, não houve valores significantes (Material Suplementar: logisticregression.xlsx) e ajuste para idade não apresenta alterações

significativas na influência dos grupos, apesar de apresentar alta influência no desfecho.

Em relação ao tempo de internação, indivíduos portadores do grupo alélico B*07 apresentaram um tempo de permanência na UTI inferior ao demais grupos ajustados para idade em 2020 (RE = 0.672, 95% IC [0.48, 0.942], $p = 0.021$) e em 2021 (RE = 0.57, 95% IC [0.37, 0.88], $p = 0.012$) (Figura 3).

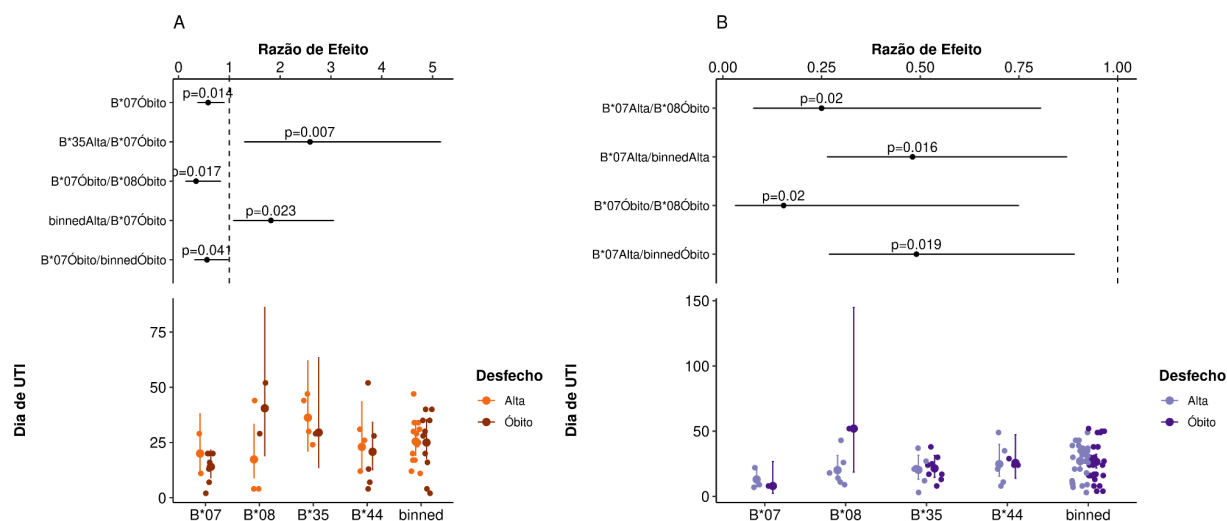
Figura 3 - Razão de efeito a partir do modelo de regressão binomial negativa ajustado para idade para (A) 2020 e (B) 2021.



Fonte: o autor, 2022.

Em contrapartida, quando condicionada a uma interação com o desfecho, em 2020, portadores do B*07 que vieram a óbito apresentaram uma menor permanência em relação aos demais grupos alélicos condicionados a alta e óbito (Fig. 4A), enquanto em 2021 não houve uma razão de efeito significativo em relação a média geral, somente em agrupamentos (Fig. 4B). Além disso, em uma análise exploratório prévia, quinze pacientes com dias de internação discrepantes foram removidos (> 65 dias), dos quais dez eram de 2021 e quatro portavam o grupo alélico B*07, sugerindo uma participação desse grupo alélico na mortalidade e baixo tempo de internação.

Figura 4 - Razão de efeito a partir do modelo de regressão binomial negativa de interação entre grupos alélicos e defecho para (A) 2020 e (B) 2021.



Fonte: o autor, 2022.

4 CONCLUSÃO

O desenho experimental desse estudo apresentou diferentes limitações, a principal é a falta de um grupo controle em relação aos anos de coleta. No entanto, esse estudo é parte de um projeto que engloba pacientes que foram internados somente na enfermaria e tiveram seus grupos alélicos genotipados paralelos aos pacientes de UTI. Por outro lado, outro fator que é a comparação de grupos de diferentes momentos epidemiológicos, fazendo com que a circulação de variantes influencie no perfil alélico dos grupos amostrais. Esse último fator pode ser confrontado com uma análise *in silico* das variantes em Foz do Iguaçu durante esse mesmo período e os grupos alélicos identificados, como proposto em (HAMELIN et al., 2022).

Apesar das limitações desse estudo, esses resultados indicam um efeito negativo do grupo alélico B*07 no quadro dos pacientes, como reportado previamente em análises de coorte e *in silico* (SHKURNIKOV et al., 2021; TAVASOLIAN et al., 2021) e confrontando resultados *in vitro* utilizando cultivo de células T (PENG et al., 2022). O grupos B*35 apresentou alteração na prevalência nos desfechos entre os anos de coleta, porém sem uma significância estatística considerável. Portanto, como

perspectiva, cabe explorar esses dados em relação ao grupo controle e realizar uma análise in silico mais aprofundada em relação aos alelos ligados aos grupos alélicos B*07 e B*35.

REFERÊNCIAS

- GONZALEZ-GALARZA, F. F. et al. Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D783–D788, 8 jan. 2020.
- GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, n. 2, p. 361–372, jun. 1992.
- HAMELIN, D. J. et al. The mutational landscape of SARS-CoV-2 variants diversifies T cell targets in an HLA-supertype-dependent manner. **Cell Systems**, v. 13, n. 2, p. 143–157.e3, fev. 2022.
- ITURRIETA-ZUAZO, I. et al. Possible role of HLA class-I genotype in SARS-CoV-2 infection and progression: A pilot study in a cohort of Covid-19 Spanish patients. **Clinical Immunology**, v. 219, p. 108572, 1 out. 2020.
- KLEIN, J.; SATO, A. The HLA System. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 10, p. 702–709, 7 set. 2000.
- LANGTON, D. J. et al. The influence of HLA genotype on the severity of COVID-19 infection. **HLA**, v. 98, n. 1, p. 14–22, jul. 2021.
- NGUYEN, A. et al. Human Leukocyte Antigen Susceptibility Map for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. **Journal of Virology**, v. 94, n. 13, p. e00510-20, 16 jun. 2020.
- NORIN, A. J. et al. HLA B53 is associated with a poor outcome in black COVID-19 patients. **Human Immunology**, v. 82, n. 10, p. 713–718, 1 out. 2021.
- NOVELLI, A. et al. HLA allele frequencies and susceptibility to COVID-19 in a group of 99 Italian patients. **HLA**, v. 96, n. 5, p. 610–614, 2020.
- PENG, Y. et al. An immunodominant NP105–113-B*07:02 cytotoxic T cell response controls viral replication and is associated with less severe COVID-19 disease. **Nature Immunology**, v. 23, n. 1, p. 50–61, jan. 2022.
- RANZANI, O. T. et al. Characterisation of the first 250 000 hospital admissions for COVID-19 in Brazil: a retrospective analysis of nationwide data. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 9, n. 4, p. 407–418, 1 abr. 2021.
- SECOLIN, R. et al. Genetic variability in COVID-19-related genes in the Brazilian population. **Human Genome Variation**, v. 8, n. 1, p. 15, dez. 2021.
- SHKURNIKOV, M. et al. Association of HLA Class I Genotypes With Severity of Coronavirus Disease-19. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 641900, 23 fev. 2021.
- TAVASOLIAN, F. et al. HLA, Immune Response, and Susceptibility to COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 601886, 8 jan. 2021.
- THE SEVERE COVID-19 GWAS GROUP. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 16, p. 1522–1534, 15 out. 2020.
- YUNG, Y.-L. et al. Association of HLA-B22 serotype with SARS-CoV-2 susceptibility in Hong Kong Chinese patients. **HLA**, v. 97, n. 2, p. 127–132, 2021.