



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Rita Alexandra Lima Marques

FATORES IMUNOGENÉTICOS PARA
AVALIAÇÃO DO RISCO DE INFEÇÃO POR
SARS-CoV-2

Dissertação no âmbito do Mestrado em Bioquímica orientada pela
Professora Doutora Raquel Monteiro Marques da Silva e pela
Professora Doutora Isabel da Silva Henriques e apresentada ao
Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021

Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

Fatores imunogenéticos para avaliação do risco de infeção por SARS-CoV-2

Rita Alexandra Lima Marques

Dissertação no âmbito do Mestrado em Bioquímica orientada pela Professora Doutora Raquel Monteiro Marques da Silva e pela Professora Doutora Isabel da Silva Henriques e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Agradecimentos

A realização de uma dissertação de mestrado não é um processo fácil e inclui momentos muito desafiantes. A ajuda de pessoas que nos incentivam nos momentos mais difíceis é essencial. Assim, agradeço às pessoas que mais me apoiaram durante este processo e contribuíram para o meu desenvolvimento.

Começo por agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Raquel Monteiro Marques da Silva. Agradeço por todos os conhecimentos que partilhou comigo, pela dedicação, simpatia, disponibilidade e apoio, foram essenciais para conseguir desenvolver e concluir este trabalho.

À minha orientadora interna, a Professora Isabel da Silva Henriques, pela simpatia e disponibilidade.

À Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa por me ter recebido para a realização deste projeto. Agradeço a toda a equipa do SalivaTec, em especial à Karina Mendes, à Joana Magalhães e à Rafaela Lopes pela disponibilidade e companhia, pela partilha de conhecimentos e pelo apoio direto no laboratório sempre que precisei.

À Raquel Morais que esteve sempre disponível para me ajudar em tudo o que precisava. A companhia, simpatia e a motivação que me transmitiu foram muito importantes.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais que sempre me incentivaram a seguir os meus sonhos, e apoiaram nos momentos bons e principalmente nos menos bons. Foram a minha maior motivação e sem eles não seria possível seguir o percurso que segui.

Por fim, agradeço o financiamento do projeto Proteger+ (CENTRO-01-02B7-FEDER-070086), cofinanciado por:



Resumo

Introdução: Em dezembro de 2019 foi identificado na China um novo coronavírus, o SARS-CoV-2. Em março de 2020, a doença por este causada, a COVID-19, foi declarada uma pandemia. A COVID-19 manifesta-se de diversas formas nos pacientes. Já estão identificados vários fatores de risco para a COVID-19, no entanto esses fatores não explicam todos os casos graves da doença. A resposta imunitária do hospedeiro ao SARS-CoV-2 é decisiva na gravidade da COVID-19. Diversos fatores genéticos, nomeadamente polimorfismos em genes importantes para a resposta imunitária (como os genes *TLR*), já estão associados ao aumento da suscetibilidade em infeções virais.

Materiais e Métodos: Foram recolhidas, a pacientes da Clínica Dentária Universitária da Universidade Católica Portuguesa e da JS Clínica Médica (Viseu), amostras de saliva e, simultaneamente, foi aplicado um questionário para recolha de dados clínicos e sociodemográficos dos participantes. As amostras foram processadas e foi feita a sua caracterização molecular pela determinação da carga viral, sequenciação e identificação de polimorfismos genéticos nos genes *TLR*, e quantificação de IgG.

Resultados: A recolha de dados clínicos e sociodemográficos permitiu fazer a caracterização da população em estudo, sendo que os indivíduos foram divididos segundo o sexo (feminino ou masculino), a idade (entre 18 e 39 anos, entre 40 e 59 anos, ou mais de 60 anos), e pela existência ou não de diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2. Dores musculares, cansaço, dor de cabeça, tosse e perda de olfato, foram os sintomas mais frequentes nos participantes com diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2. Foram identificados 7 polimorfismos no gene *TLR3* e 3 polimorfismos no gene *TLR7*, sendo que alguns deles já foram associados a infeções virais.

Conclusão: Devido à complexidade da COVID-19, é de grande importância identificar fatores genéticos que mais diferenciam os doentes. Sabendo o papel que os TLRs desempenham no processo de infeção, é importante identificar polimorfismos associados à suscetibilidade ou à resistência para melhor gerir os recursos disponíveis nesta e em futuras doenças.

Palavras-chave: COVID-19, SARS-CoV-2, TLR, saliva, resposta imunitária

Abstract

Introduction: In December 2019, a new coronavirus, SARS-CoV-2, was identified in China. In March 2020, the disease it caused, COVID-19, was declared a pandemic. COVID-19 manifests itself in different ways in patients. Several risk factors for COVID-19 have already been identified, however these factors do not explain all severe cases of the disease. The host's immune response to SARS-CoV-2 is decisive in the severity of COVID-19. Several genetic factors, including polymorphisms in genes important for the immune response (such as *TLR* genes), are already associated with increased susceptibility to viral infections.

Materials and Methods: Saliva samples were collected from patients at the Clínica Dentária Universitária of the Universidade Católica Portuguesa and at JS Clínica Médica (Viseu) and, simultaneously, a questionnaire was applied to collect clinical and sociodemographic data from the participants. The samples were processed and their molecular characterization was performed by determining the viral load, sequencing and identifying genetic polymorphisms in *TLR* genes, and quantifying IgG.

Results: The collection of clinical and sociodemographic data allowed for the characterization of the study population, and the individuals were divided according to sex (female or male), age (between 18 and 39 years, between 40 and 59 years, or over 60 years), and by the existence or not of a previous diagnosis of SARS-CoV-2 infection. Muscle pain, tiredness, headache, cough and loss of smell were the most frequent symptoms in participants with a previous diagnosis of SARS-CoV-2 infection. 7 polymorphisms in the *TLR3* gene and 3 polymorphisms in the *TLR7* gene have been identified, some of which have already been associated with viral infections.

Conclusion: Due to the complexity of COVID-19, it is of great importance to identify genetic factors that most differentiate patients. Knowing the role that TLRs play in the infection process, it is important to identify polymorphisms associated with susceptibility or resistance to better manage available resources in this and future diseases.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, TLR, saliva, immune response

Índice

Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xi
Abreviaturas	xiii
1. Introdução	1
1.1. Infecção por SARS-CoV-2 e a COVID-19.....	1
1.1.1. Estrutura do SARS-CoV-2	2
1.1.2. Entrada no hospedeiro	3
1.1.3. Resposta imunitária	4
1.1.4. Suscetibilidade à COVID-19	7
1.2. A saliva	8
1.3. Objetivo	10
2. Materiais e Métodos	11
2.1. Colheita de amostras biológicas e caracterização da população	11
2.2. Caracterização molecular das amostras	12
2.2.1. Extração de RNA	12
2.2.2. Determinação da carga viral	13
2.2.3. Métodos de extração de DNA	13
2.2.4. Identificação de polimorfismos genéticos	14
2.2.5. Quantificação de IgG anti-nucleocápside	16
3. Resultados	17
3.1. Caracterização da população	17
3.2. Determinação da carga viral	21
3.3. Extração de DNA	21

3.4. Identificação de polimorfismos genéticos	22
3.5. Quantificação de IgG anti-nucleocápside	29
4. Discussão	33
4.1. Fatores de risco	34
4.2. Polimorfismos	35
4.3. Resposta do sistema imunitário	38
Conclusão	41
Bibliografia	43
Anexos	46
Anexo 1: Consentimento Informado	46
Anexo 2: Questionário para recolha de dados do participante	49
Anexo 3: Protocolo para colheita de amostras biológicas	52
Anexo 4: Protocolo de extração de DNA com tampão STE	54
Anexo 5: Protocolo de extração de DNA com E.Z.N.A.® Forensic DNA Kit (Omega Bio-tek, Inc)	55
Anexo 6: Protocolo de extração de DNA com NZY Tissue gDNA Isolation kit (NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes)	56
Anexo 7: Protocolo de quantificação de IgG anti-nucleocápside com EDI™ COVID-19 Nucleocapsid IgG Quantitative ELISA Kit (Epitope Diagnostics, Inc.)	57

Lista de figuras

Figura 1 – Representação esquemática do SARS-CoV-2 mostrando as 4 proteínas estruturais (adaptado de (2))	3
Figura 2 – Representação esquemática da entrada do SARS-CoV-2 nas células do hospedeiro e do início da resposta imunitária (adaptado de (5))	5
Figura 3 – Tratamento das amostras de saliva com Tampão QE para extração de RNA	12
Figura 4 – Tratamento das amostras de saliva com Tampão QE para extração de DNA	13
Figura 5 – Programa de amplificação do fragmento do gene <i>TLR3</i>	15
Figura 6 – Programa de amplificação dos fragmentos do gene <i>TLR7</i>	15
Figura 7 – Frequência de comorbilidades nos participantes sem diagnóstico prévio de infecção por SARS-CoV-2, distribuídos por faixa etária	18
Figura 8 – Frequência de comorbilidades nos participantes com diagnóstico prévio de infecção por SARS-CoV-2, distribuídos por faixa etária	18
Figura 9 – Frequência dos sintomas apresentados pelos participantes com idade entre os 18 e os 39 anos. A – Participantes do sexo masculino; B – Participantes do sexo feminino	19
Figura 10 – Frequência dos sintomas apresentados pelos participantes com idade entre os 40 e os 59 anos. A – Participantes do sexo masculino; B – Participantes do sexo feminino	20
Figura 11 – Frequência dos sintomas apresentados pelos participantes com idade superior a 60 anos. A – Participantes do sexo masculino; B – Participantes do sexo feminino	20
Figura 12 – Gel de agarose para visualização do produto de PCR com os <i>primers</i> para <i>TLR3</i> . 1 – Ladder I (NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes); 2 – Controlo negativo; 3 – Controlo positivo; 4 a 18 – Amostras de participantes ...	23
Figura 13 – Alinhamento de sequências de <i>TLR3</i> evidenciando o polimorfismo rs5743312 em participantes homocigótico (TT) e heterocigótico (CT)	24
Figura 14 – Alinhamento de sequências de <i>TLR3</i> evidenciando o polimorfismo rs1879026 em participantes homocigótico (TT) e heterocigótico (GT)	25

Figura 15 – Alinhamento de sequências de <i>TLR3</i> evidenciando o polimorfismo rs111611328 em participante heterozigótico (GC)	25
Figura 16 – Alinhamento de sequências de <i>TLR3</i> evidenciando os polimorfismos rs5743313 e rs5743314, respetivamente, em participantes homozigótico (TT e CC, respetivamente) e heterozigótico (CT e GC, respetivamente)	26
Figura 17 – Alinhamento de sequências de <i>TLR3</i> evidenciando o polimorfismo rs5743315 em participante heterozigótico (CA)	26
Figura 18 – Alinhamento de sequências de <i>TLR3</i> evidenciando o polimorfismo rs78726532 em participante heterozigótico (AG)	27
Figura 19 – Gel de agarose para visualização do produto de PCR com os primers para <i>TLR7</i> (forward: 5'-TGACCTAAGTGGAAATTGCC-3' e reverse: 5'-GCCGGTTGTTGGAGAAGTCC-3'). 1 – Ladder V (NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes); 2 – Controlo negativo; 3 – Controlo positivo; 4 a 20 – Amostras de participantes	27
Figura 20 – Alinhamento de sequências de <i>TLR7</i> evidenciando o polimorfismo rs179008 em participantes homozigótico (TT) e heterozigótico (AT)	28
Figura 21 – Alinhamento de sequências de <i>TLR7</i> evidenciando o polimorfismo rs5743780 em participantes homozigótico (AA) e heterozigótico (GA)	29
Figura 22 – Alinhamento de sequências de <i>TLR7</i> evidenciando o polimorfismo rs5743781 em participantes homozigótico (TT) e heterozigótico (CT)	29
Figura 23 – Percentagem de participantes com resultado positivo para IgG anti-nucleocápside nos participantes com diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2, por sexo e faixa etária	30
Figura 24 – Percentagem de resultados positivo e negativo para IgG anti-nucleocápside nos participantes com diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2 em função do tempo decorrido entre a infeção por SARS-CoV-2 e a colheita de amostra biológica	32
Figura 25 – Percentagem de participantes com resultado positivo para IgG anti-nucleocápside nos participantes sem diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2, por sexo e faixa etária	32

Lista de tabelas

Tabela 1 - Procedimento para colheita de saliva	11
Tabela 2 - <i>Primers</i> TLR	14
Tabela 3 - Número de participantes por sexo, faixa etária e presença ou ausência de diagnóstico prévio de infecção por SARS-CoV-2	17
Tabela 4 - Resultado da quantificação de DNA extraído com os vários métodos de extração na mesma amostra de saliva armazenada a diferentes temperaturas	22
Tabela 5 – Número de participantes com os polimorfismos identificados no fragmento de <i>TLR3</i> , por género e faixa etária	23
Tabela 6 - Resultados da quantificação de IgG anti-nucleocápside, indicando o número de pacientes sem ou com anticorpos para o vírus SARS-CoV-2	30

Abreviaturas

ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HLA	Human Leukocyte Antigens
IFN	Interferão
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IRF3	Interferon regulatory factor 3
LDH	Lactate dehydrogenase
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
MHC	Major Histocompatibility Complex
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3
ORF	Open Reading Frame
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
STE	Sodium Chloride-Tris-EDTA

TAE	Tris-Acetato-EDTA
TLR	Toll-Like Receptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α

1. Introdução

1.1. Infecção por SARS-CoV-2 e a COVID-19

Em dezembro de 2019, surgiam em Wuhan, na China, vários casos inexplicáveis de pneumonia (1, 2). A recolha e estudo de várias amostras, permitiu a identificação de um novo vírus da família *Coronaviridae*, o SARS-CoV-2 (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave - 2) assim denominado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (1, 2). A 11 de fevereiro de 2020, após relatos de vários casos de infecção por SARS-CoV-2 um pouco por todo o mundo, a Organização Mundial da Saúde atribuiu um nome à doença por este causada, doença de coronavírus 2019 (COVID-19) (1, 3 - 5). A 11 de março de 2020, também pela Organização Mundial de Saúde, a COVID-19 viria a ser declarada uma pandemia (1, 3, 6).

A transmissão do SARS-CoV-2 dá-se por meio direto entre indivíduos, quando um individuo saudável inala gotículas respiratórias libertadas por uma pessoa infetada ao tossir, espirrar ou falar, sendo que estas gotículas permanecem no ar por tempo limitado; ou por meio indireto, pelo contacto com objetos ou superfícies contaminadas e seguinte contacto com as mucosas dos olhos, nariz ou boca. (1, 2, 7, 8).

O período de incubação do SARS-CoV-2 varia entre 2 a 14 dias e, no final desse período, a COVID-19 pode manifestar-se de diversas formas (1, 9 - 12). Esta doença pode comprometer vários sistemas do organismo humano, como o sistema respiratório, o sistema cardiovascular, o sistema gastrointestinal, o sistema neurológico e o sistema músculo-esquelético (7, 10). Os sintomas mais comuns apresentados pelos doentes incluem febre, dor de cabeça, tosse, dor de garganta, falta de ar e cansaço (1, 9). Alguns doentes desenvolvem ainda alterações ou mesmo perda do olfato (anosmia) e paladar (ageusia) (13).

Alguns pacientes infetados por SARS-CoV-2 são assintomáticos, isto é, apresentam resultado positivo em RT-PCR para SARS-CoV-2 mas não apresentam nenhum dos sintomas identificados para COVID-19 (3). Estes doentes são muito importantes nas cadeias de transmissão da doença, pois apesar de não apresentarem

sintomas, transmitem o SARS-CoV-2 a outros indivíduos e têm um longo período de eliminação viral (3).

A maioria dos pacientes desenvolve sintomas ligeiros, mas alguns pacientes ficam gravemente doentes, podem apresentar dificuldades respiratórias graves que evoluem para pneumonia com necessidade de internamento em unidade de cuidados intensivos, e, em casos mais extremos, falência de vários órgãos (6, 9, 14). Independentemente da gravidade da doença, alguns pacientes continuam a apresentar sintomas distintos, como cansaço, dores musculares, e distúrbios intestinais, mesmo passados vários meses da infeção por SARS-CoV-2 (11).

Os doentes assintomáticos, aqueles com sintomas ligeiros como febre, tosse, dor de garganta, cansaço, dores musculares, dores de cabeça, perda de olfato e paladar, e diarreia, e aqueles com sintomas moderados, que para além dos anteriores incluem dificuldade em respirar, representam 80% das manifestações clínicas de COVID-19 (10). Apenas 15% dos doentes desenvolve sintomas severos com necessidade de internamento e 5% dos casos são de pacientes em estado crítico com síndrome do desconforto respiratório agudo, lesões no miocárdio, nos rins e no fígado, coagulação intravascular disseminada e falência de vários órgãos (10).

1.1.1. Estrutura do SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de cadeia simples de sentido positivo (1, 2). O SARS-CoV-2 pertence à subfamília *Coronavirinae*, género β , por ter capacidade de infetar humanos e pelas semelhanças do seu genoma com os coronavírus SARS-CoV e MERS-CoV já identificados (1, 2, 9).

O seu genoma é composto por 12 grelhas de leitura (ORFs) (1). De 5' para 3', nos primeiros dois terços do genoma são codificadas a RNA polimerase e proteínas não estruturais, nas duas primeiras ORFs (ORF 1a e ORF 1b) (1). No restante encontram-se codificadas as proteínas estruturais (1). O SARS-CoV-2 é constituído por quatro proteínas estruturais (Figura 1), a proteína spike (S), a proteína de envelope (E), a proteína de membrana (M), e a proteína de nucleocápside (N) (1, 2, 4).

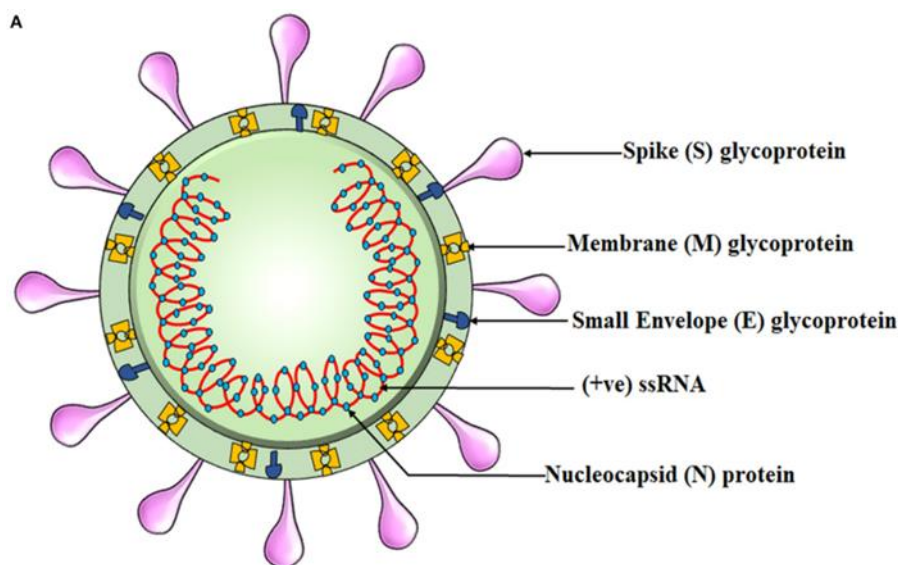


Figura 1 – Representação esquemática do SARS-CoV-2 mostrando as 4 proteínas estruturais (adaptado de (1))

A glicoproteína spike é uma proteína transmembranar constituída por duas subunidades distintas, a subunidade S1 que se liga aos recetores celulares, e a subunidade S2 que é necessária para a fusão da membrana viral com a membrana das células do hospedeiro (1, 2 e 15). É a proteína spike que interage com os recetores das células epiteliais do hospedeiro, mediando a entrada do vírus nas células do hospedeiro (1, 2 e 15).

A proteína de nucleocápside é importante na transcrição e montagem do vírus, pois forma complexos com o RNA viral e interage com a proteína da membrana (2).

1.1.2. Entrada no hospedeiro

A entrada do SARS-CoV-2 no hospedeiro dá-se pelos tratos nasofaríngeo e orofaríngeo, e este entra nas células do hospedeiro pela interação da proteína spike com a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), um recetor presente nas células epiteliais do hospedeiro (2, 9, 15). A ACE2 é um recetor do sistema renina-angiotensina, um importante sistema de regulação da pressão sanguínea e da homeostase do fluido eletrolítico (9, 16). Este recetor regula negativamente a ativação do sistema, atuando como defesa em várias doenças como hipertensão, diabetes e doenças cardiovasculares (9, 16). Ao utilizar a ACE2 para entrar nas células, o SARS-CoV-2 diminui a sua atividade de defesa (9, 16). A lesão do miocárdio, um sintoma apresentado em casos

críticos de COVID-19 e associado a um mau prognóstico, deve-se à presença da ACE2 nas células do miocárdio e à elevada libertação de citocinas após a infeção por SARS-CoV-2 (10).

Aquando do reconhecimento da proteína spike pela enzima conversora de angiotensina 2, ocorre a fusão da membrana do SARS-CoV-2 com a membrana das células do hospedeiro e, já dentro das células do hospedeiro, o genoma viral é libertado (1, 9). Inicia-se a tradução das ORF 1a e ORF 1b, formando-se duas grandes poliproteínas que são clivadas para criar a RNA polimerase viral e proteínas importantes para a montagem do vírus, e ocorre a replicação e transcrição do RNA viral (1, 9). São também traduzidas as proteínas estruturais do SARS-CoV-2 e as restantes proteínas não estruturais (1, 9). O RNA viral de cadeia simples combina-se com a proteína de nucleocápside e as vesículas com partículas virais fundem-se com a membrana das células, libertando o vírus no ambiente circundante (1, 9). Deste modo, o vírus fica disponível para iniciar um novo ciclo de replicação em novas células, incluindo células do trato respiratório inferior, ou outros órgãos que expressam ACE2, como os rins, o coração e o trato gastrointestinal, e é libertado também em gotículas respiratórias que podem infetar outras pessoas (1, 9).

1.1.3. Resposta imunitária

Dentro das células do hospedeiro, os recetores de reconhecimento de agentes patogénicos são os primeiros a identificar o vírus, nomeadamente os recetores Toll-Like (TLR) 3, 7, 8 e 9 que reconhecem o RNA viral desencadeando a resposta por interferão tipo I (IRF3) (Figura 2) (1, 6, 11). O interferão atua como mensageiro secundário e estimula as células vizinhas (1). É desencadeada a transcrição do gene *NLRP3*, que vai desencadear a libertação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-18) e a morte celular, que resulta na libertação da enzima lactato desidrogenase (LDH) (11). Assim, a extensão da ativação de *NLRP3* e os níveis de LDH relacionam-se com a gravidade da COVID-19 (11). O SARS-CoV-2 tem a capacidade de inibir ou retardar as respostas por interferão tipo I, o que permite a replicação e indução de danos nos tecidos por parte do vírus, culminando numa resposta imunológica mais forte associada à severidade da COVID-19 (11). Para além disto, a ativação dos TLRs também ativa a via do NF- κ B (10). Com o

aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias e de IFN, são trazidos para o local monócitos e linfócitos T (10).

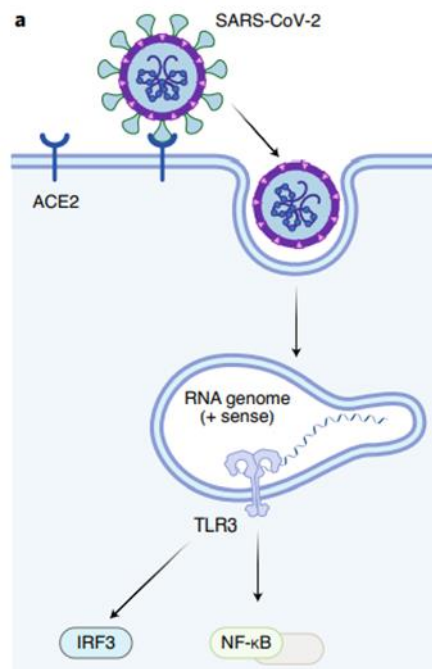


Figura 2 – Representação esquemática da entrada do SARS-CoV-2 nas células do hospedeiro e do início da resposta imunitária (adaptado de (11))

No local da infecção, as células apresentadoras de antígenos apresentam os antígenos virais às células T CD8⁺ e T CD4⁺ pelos MHC de classe I e MHC de classe II, respectivamente (10). As células T reconhecem antígenos virais apresentados pelo MHC de classe I, promovendo a atividade citotóxica das células T CD8⁺ e a liberação de citocinas que atuam como um mecanismo de defesa (1). As células T citotóxicas eliminam as células infectadas com SARS-CoV-2, e a estimulação de células T auxiliares, juntamente com outras células imunes adaptativas, como macrófagos, pode levar a uma resposta inflamatória agravada (1, 9). Neste caso, a produção excessiva de citocinas, nomeadamente TNF- α e IL-6, pode provocar danos nos órgãos do hospedeiro, principalmente nos pulmões (1, 9). Normalmente, com a eliminação do vírus a resposta imunitária vai diminuindo, pelo que esta reação exagerada do sistema imunitário é principalmente observada em doentes graves com COVID-19 que apresentam níveis plasmáticos mais elevados de citocinas (2, 9, 10).

A maior parte das células T efetoras sofre apoptose após a eliminação do SARS-CoV-2, e são geradas várias células de memória prontas para uma reinfeção (1).

As células B reconhecem diretamente proteínas virais, ou são ativadas pela interação com células T CD4+ e produzem anticorpos específicos para SARS-CoV-2 (1, 10). A resposta humoral ao SARS-CoV-2, envolve a produção de anticorpos IgG e IgM, importantes na neutralização do vírus (1, 15). Os níveis de IgM têm um aumento acentuado logo após a infecção, mas começam a diminuir rapidamente (17). Já os níveis de IgG são baixos ao início, aumentam ao longo de 3 semanas e são detetados por um período de tempo mais longo, pelo menos 3 meses (1, 2, 4, 15). Inicialmente, as células B provocam uma resposta contra a proteína de nucleocápside e a resposta contra a proteína spike acontece após 4 a 8 dias após a infecção, mas os níveis de IgG anti-spike e IgG anti-nucleocápside são semelhantes e estáveis durante 3 meses (1, 15). Os anticorpos anti-spike podem bloquear a ligação da proteína spike do SARS-CoV-2 ao recetor ACE2 e assim impedir a entrada do vírus nas células do hospedeiro (2).

Há doentes com COVID-19 confirmados por resultado positivo em RT-PCR para SARS-CoV-2 que não produzem ou não têm níveis detetáveis de IgM e IgG (4, 17). Doentes que apresentaram sintomas ligeiros tendem a apresentar níveis de IgG mais elevados do que pacientes que foram assintomáticos, e tanto IgG como IgM são detetáveis durante mais tempo em pacientes com sintomas ligeiros quando comparados a pacientes assintomáticos (3). Em doentes com COVID-19 hospitalizados, ao longo do tempo começam a ser detetados anticorpos para várias proteínas não estruturais do SARS-CoV-2, e não apenas anticorpos anti-spike e anti-nucleocápside (5).

Foram observadas diferenças na proporção de neutrófilos para linfócitos entre um grupo de pacientes que produziu anticorpos IgM e IgG, e um grupo de pacientes que não produziu IgM e IgG, sendo que o nível da proporção foi menor no grupo de pacientes que produziram IgM e IgG (4). Esta proporção encontra-se positivamente correlacionada com a idade avançada e o grau de obesidade, e é um indicador de inflamação de baixo grau e de um mau prognóstico em pacientes infetados por SARS-CoV-2 (11).

Foi identificado um aumento de autoanticorpos em pacientes com COVID-19 hospitalizados com formas graves da doença, sendo que alguns são produzidos após a infecção por SARS-CoV-2 (5). Os autoanticorpos são comuns em doenças autoimunes e são associados a erupções cutâneas, trombose e vasculite (5). Nos doentes hospitalizados por apresentarem manifestações graves da COVID-19, são comuns os anticorpos contra

citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e recetores (nomeadamente o ACE2) (5). Os anticorpos anti-citocinas impedem as respostas imunes protetoras e desempenham um papel patogénico na infeção por SARS-CoV-2 (5). Um número crescente de pacientes apresenta sintomas persistentes após a infeção por SARS-CoV-2, possivelmente devido a danos causados nos tecidos pela resposta imunitária à infeção, que na fase aguda inclui a inflamação exagerada do tecido (5).

1.1.4. Suscetibilidade à COVID-19

Indivíduos com mais de 60 anos e com outras comorbilidades, como diabetes mellitus, doenças respiratórias (nomeadamente asma), hipertensão, e doenças cardiovasculares, são considerados mais suscetíveis a desenvolver uma forma grave da doença (1, 6, 9 - 12, 16). Mas estas condições não explicam todos os casos graves e mortalidade da COVID-19 (10), e por isso é importante estudar outros fatores que influenciem a suscetibilidade a esta doença, nomeadamente fatores genéticos.

Os dados disponíveis relativamente à taxa de mortalidade e gravidade de sintomas em vários países, indicam que os pacientes do sexo masculino são mais suscetíveis de desenvolver formas graves de COVID-19 quando comparados a pacientes do sexo feminino (9, 16). Esta maior suscetibilidade pode estar relacionada com vários motivos, entre eles, o facto de muitos genes de resposta imune estarem localizados no cromossoma X (9, 16). As mulheres têm 2 cromossomas X, enquanto os homens só têm 1, e apesar do silenciamento aleatório de um cromossoma X nas mulheres, alguns genes escapam a esse silenciamento (9, 16). Nestes casos, há expressão bialélica e as mulheres acabam por ter um nível de expressão mais elevado desses genes (9, 16). Os TLR7 e 8, responsáveis pelo reconhecimento intracelular do RNA viral e pela ativação da imunidade inata, são codificados no cromossoma X (1, 9, 11). Se estes genes escaparem ao silenciamento, as pacientes do sexo feminino vão apresentar expressão dos dois alelos, e uma expressão aumentada do recetor pode fornecer uma maior proteção contra a infeção por SARS-CoV-2 (1, 9, 11). Para além disso, as pacientes do sexo feminino desenvolvem respostas mais fortes por interferão tipo I, após reconhecimento pelo TLR7 (11).

Os genes *MHC* (Complexo Maior de Histocompatibilidade) humanos codificam os antígenos leucocitários humanos (HLA) que reconhecem e apresentam antígenos, e são os genes mais polimórficos de todo o genoma (10). Assim, existe uma grande

variedade de alelos HLA entre os pacientes, que pode resultar em diferenças na resposta imune dos indivíduos, sendo uns mais suscetíveis ou mais resistentes a desenvolver sintomas graves da COVID-19 do que outros (10).

Alterações em genes que codificam citocinas e em genes que codificam receptores humanos importantes no processo de infecção por SARS-CoV-2, também podem estar relacionadas com uma maior suscetibilidade de alguns pacientes desenvolverem formas graves da COVID-19 (10). O reconhecimento do SARS-CoV-2 pelos receptores presentes nas células do hospedeiro, ativa várias células imunes e leva à libertação de várias citocinas, nomeadamente a citocina pró-inflamatória IL-6 (10). Esta citocina é essencial na resposta imunitária por promover a proliferação de células T e a diferenciação de células B, mas níveis muito elevados estão associados a um mau prognóstico da COVID-19 (10). Algumas variantes no gene *IL6* alteram a sua expressão e estão associadas a níveis elevados de IL-6 no plasma (10). Variantes no gene *ACE2*, que codifica o recetor ACE2 responsável pela entrada do SARS-CoV-2 nas células do hospedeiro, estão associadas à elevada expressão de ACE2 (10). A elevada expressão de ACE2 sugere que os indivíduos são mais suscetíveis à COVID-19 (10).

Já foram identificados polimorfismos genéticos no gene *TLR7*, em pacientes que desenvolveram formas graves de COVID-19, podendo estes estar associados à severidade da doença (12). Variantes genéticas no genes *TLR 3* e *TLR7* podem alterar a expressão de genes do interferão e de citocinas pró-inflamatórias, e assim conduzir a uma resposta imune desregulada observada em pacientes com sintomas graves de COVID-19 (6).

1.2. A saliva

A saliva é um fluido biológico de cor clara, constituída por 99% de água com componentes orgânicos e inorgânicos, e pH ligeiramente ácido (18, 19). Nos componentes orgânicos incluem-se a ureia e o ácido úrico, a glicose, diversos lípidos como colesterol, ácidos gordos, triglicerídeos e glicolípidos, aminoácidos, proteínas e hormonas esteróides (18). Já nos componentes inorgânicos incluem-se diversos iões: Ca^{2+} , K^+ , HCO_3^- , H_2PO_4^- , Na^+ , Cl^- , I^- , Mg^{2+} e F^- (18, 19).

Cerca de 90% do volume salivar total é secretado por 3 glândulas salivares principais presentes na cavidade oral, as glândulas parótida, submandibular e sublingual,

e o restante volume é proveniente das glândulas salivares *minor* localizadas na mucosa oral (18, 19). As secreções dessas glândulas variam consoante a dieta, a idade, o sexo, estados de doença e medicação dos pacientes, e ainda por influência do ritmo circadiano (18). Pressupõe-se que as alterações verificadas na saliva sejam indicativas do estado de saúde do paciente, e por isso esta pode ser utilizada como fluido biológico no diagnóstico de algumas doenças (18, 19). Alguns marcadores tumorais, como os anticorpos anti-p53, são detetados na saliva e podem servir como meio de diagnóstico precoce para vários tipos de cancro, incluindo cancro oral, cancro do esófago, cancro do estômago e cancro do intestino grosso (18, 19).

O procedimento de colheita de saliva apresenta vantagens quando comparado com outros métodos de colheita de fluidos biológicos, por exemplo, a colheita de saliva sem estimulação permite que seja o próprio paciente a fazer a recolha, é um método de colheita simples e não invasivo, sendo por isso mais confortável (15, 18, 19). Este método é vantajoso na maioria das faixas etárias, mas em bebés e crianças pequenas, em pessoas com necessidades especiais, e em idosos, este procedimento pode ser desafiante e muito difícil. No caso dos bebés, crianças pequenas e pessoas com necessidades especiais, pela dificuldade em acumular saliva sem engolir ou mesmo pela dificuldade em cuspir (20). Já no caso dos idosos pode nem mesmo ser possível devido à xerostomia (boca seca), condição associada aos efeitos secundários de vários medicamentos (20).

Para além dos componentes da própria saliva, várias moléculas detetadas no soro também podem ser detetadas com precisão na saliva, como insulina, cortisol, estradiol, progesterona e testosterona (18). Assim, a saliva pode ser utilizada para determinar os níveis de progesterona para diagnóstico de distúrbios menstruais e infertilidade, os níveis de estradiol e testosterona para diagnóstico de tumores adrenais e testiculares (19). Também se verificou que em pacientes com rutura de aneurisma da aorta, baixos níveis de amilase salivar no pós-operatório, foram associados a um aumento na mortalidade (18).

É possível extrair DNA de amostras de saliva com qualidade, no entanto este processo tem algumas dificuldades associadas. A saliva contém vários compostos e enzimas que podem degradar ácidos nucleicos e também proteínas (20). Para além disso, a saliva possui uma grande quantidade de microrganismos, sendo que a concentração de

DNA da saliva pode ser afetada por incluir DNA microbiano e não apenas DNA humano (20). Ainda assim, a utilização da saliva como fluido biológico continua a ser muito vantajosa.

É possível isolar vários vírus a partir da saliva, incluindo os vírus da hepatite A, B e C (18, 19). O SARS-CoV-2 entra no hospedeiro pelos tratos nasofaríngeo e orofaríngeo e dissemina-se pelas gotículas de saliva de indivíduos infetados (2, 9, 15). Este fluido pode assim ser usado para detetar RNA viral. Finalmente, os níveis de anticorpos IgG e IgM estão correlacionados entre amostras de saliva e soro (15). Deste modo, a saliva é uma amostra biológica eficaz para testar a presença de RNA viral, como meio para detetar a produção de anticorpos e avaliar a resposta imunitária do paciente, e também identificar fatores genéticos de suscetibilidade à infeção por SARS-CoV-2 (15).

1.3. Objetivo

Os objetivos deste trabalho são identificar polimorfismos genéticos de *TLR3* e de *TLR7* que possam estar relacionados com a suscetibilidade ou a resistência à infeção por SARS-CoV-2, avaliar o desenvolvimento da resposta imunitária de indivíduos que já foram infetados por SARS-CoV-2, e relacionar a possível suscetibilidade ou resistência com o desenvolvimento da resposta imunitária. A identificação de fatores de risco para COVID-19, poderá contribuir para uma possível estratificação de indivíduos, melhorar a triagem de pacientes e possibilitar uma melhor gestão no atendimento presencial de pacientes nos serviços prestadores de cuidados médicos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Colheita de amostras biológicas e caracterização da população

Neste trabalho, foram usadas amostras de saliva recolhidas na Clínica Dentária Universitária da Universidade Católica Portuguesa e na JS Clínica Médica. O método de colheita é simples, rápido e não invasivo, e feito de acordo com um procedimento estabelecido previamente (21). Antes da colheita da amostra biológica, todos os participantes foram informados acerca dos objetivos do estudo e assinaram um termo de consentimento informado (Anexo 1), sendo a sua participação totalmente voluntária e não remunerada. Simultaneamente, foi aplicado um questionário a todos os participantes, para recolha de dados clínicos e sociodemográficos (Anexo 2) e atribuído um código à amostra, utilizado durante todo o seu processamento e análise. Todos os dados obtidos através do preenchimento do questionário foram tratados de forma confidencial e pseudoanonimizada, de acordo com as normas em vigor.

Durante a colheita de saliva foram respeitados todos os cuidados para prevenção e controlo de infeção por SARS-CoV-2. O protocolo seguido está de acordo com os procedimentos necessários para a colheita de amostras biológicas (Anexo 3), e o dador foi instruído acerca do procedimento para colheita de saliva (Tabela 1).

Tabela 1 – Procedimento para colheita de saliva

Procedimento para colheita de saliva		
Deixar a saliva acumular na boca sem forçar	Ir colocando a saliva no tubo de colheita até atingir a marca indicada Importante: Toda a espuma que se forme tem que ficar acima da marca	Fechar o tubo de colheita

O questionário aplicado a todos os participantes permitiu a recolha de dados gerais, para estabelecer grupos de acordo com a faixa etária e o género dos pacientes; permitiu recolher informação acerca da sua saúde, como a presença de patologias que podem estar associadas a um maior risco de desenvolver formas graves da COVID-19, como é o caso de doenças cardiovasculares, doenças respiratórias e diabetes mellitus; e continha ainda um grupo de questões para identificar dadores com diagnóstico prévio de COVID-19 e participantes já vacinados.

Para os doentes com diagnóstico prévio de COVID-19, o questionário incluía algumas questões para identificar sintomas da doença e a sua duração. Estas questões permitiram estabelecer a gravidade da doença e assim estratificar doentes assintomáticos (participantes com diagnóstico de COVID-19 mas que não apresentaram qualquer sintoma), doentes com sintomatologia ligeira e doentes com sintomatologia grave (com necessidade de internamento e em casos extremos recurso a ventilação mecânica).

2.2. Caracterização molecular das amostras

As amostras de saliva foram processadas num laboratório apropriado para o efeito, nomeadamente com câmara de biossegurança nível 2. Foi determinada a carga viral, usando RT-PCR; foram identificados polimorfismos nos genes *TLR3* e *TLR7*, recorrendo à amplificação por PCR e posterior sequenciação; e foi feita a quantificação de anticorpos IgG contra a proteína da nucleocápside do vírus por ELISA.

2.2.1. Extração de RNA

Para a extração de RNA, as amostras de saliva foram tratadas com o tampão de lise QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Lucigen) (Tampão QE) (Figura 1). Este tampão provoca a lise das células e coloca o RNA disponível na solução.



Figura 3 – Tratamento das amostras de saliva com Tampão QE para extração de RNA

2.2.2. Determinação da carga viral

Para determinação da carga viral, foi utilizado o kit comercial FOSUN (Shanghai Fosun Long March Medical Science CO., Ltd, Shanghai, China) e os testes foram realizados no formato *pool*. A saliva de 10 participantes foi misturada, o RNA viral foi extraído de acordo com o procedimento explicado anteriormente, e amplificado por RT-PCR (CFX96™ Real-Time System, BIO-RAD) de acordo com as indicações do fabricante. Um resultado negativo significa que todos os participantes incluídos na *pool* estão negativos para SARS-CoV-2, já um resultado positivo indica que pelo menos um dos participantes está positivo para SARS-CoV-2, pelo que o teste é repetido para todos individualmente, de forma a identificar o(s) participante(s) infetado(s).

2.2.3. Métodos de extração de DNA

Foram testados quatro métodos de extração de DNA em amostras de saliva. No primeiro, após uma pré-incubação da amostra com proteinase K, a extração de DNA é feita com tampão STE e precipitação em isopropanol; dois kits comerciais para extração de DNA, o E.Z.N.A.® Forensic DNA Kit (Omega Bio-tek, Inc) e o NZY Tissue gDNA Isolation kit (NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes); e ainda o tratamento das amostras com o tampão de lise QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Lucigen) (Figura 2). Com o NZY Tissue gDNA Isolation kit (NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes), foi ainda testada a extração de DNA de saliva diluída com PBS (1:4) seguindo o mesmo protocolo. Para além dos métodos de extração de DNA, foi também testado o método de armazenamento das amostras de saliva desde a sua colheita até ao momento de extração: o armazenamento a 4°C e o armazenamento a -20°C. Os protocolos usados para a extração de DNA estão descritos em Anexo (Anexos 4 a 6).

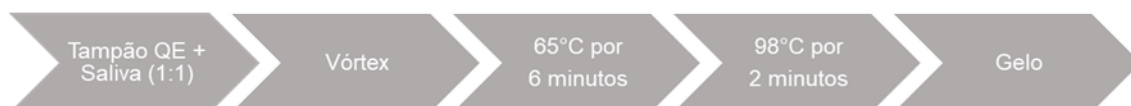


Figura 4 – Tratamento das amostras de saliva com Tampão QE para extração de DNA

2.2.4. Identificação de polimorfismos genéticos

Para identificação de polimorfismos genéticos, as amostras de saliva foram tratadas com QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Lucigen), seguindo as indicações do fabricante (Figura 2). De seguida, as amostras foram centrifugadas (8000 x g por 2 minutos) e o sobrenadante foi diluído 1:5 com água para biologia molecular (NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes). As reações de PCR convencional foram realizadas utilizando *primers* específicos para os genes alvo, que se encontram identificados na Tabela 2.

Tabela 2 – Primers TLR

Gene	Localização	Primers	Tamanho do fragmento
<i>TLR3</i>	Intrão 3	Forward: 5'-GCCGCTAAAAAGTGAAGAACTGG-3' Reverse: 5'-GGGCTCTTGACCATCGTACT-3'	436pb
<i>TLR7</i>	Exão 3	Forward: 5'-AATGTTGCAAAAGAGAGGCAG-3' Reverse: 5'-CGCACAAGGAAATGGGGCAT-3'	902pb
		Forward: 5'-TGACCTAAGTGGAAATTGCCC-3' Reverse: 5'-GCCGGTTGTTGGAGAAGTCC-3'	899pb

As reações foram preparadas utilizando 10µL Green MasterMix (NZYTaq II, NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes), 1µL de cada um dos *primers* (Forward e Reverse, com uma concentração de 2µM) e 8µL de amostra. As reações foram colocadas no termociclador (CFX Connect™ Real-Time System, BIO-RAD) e foram seguidos os programas de amplificação definidos para os fragmentos dos genes *TLR3* (Figura 3) e *TLR7* (Figura 4).

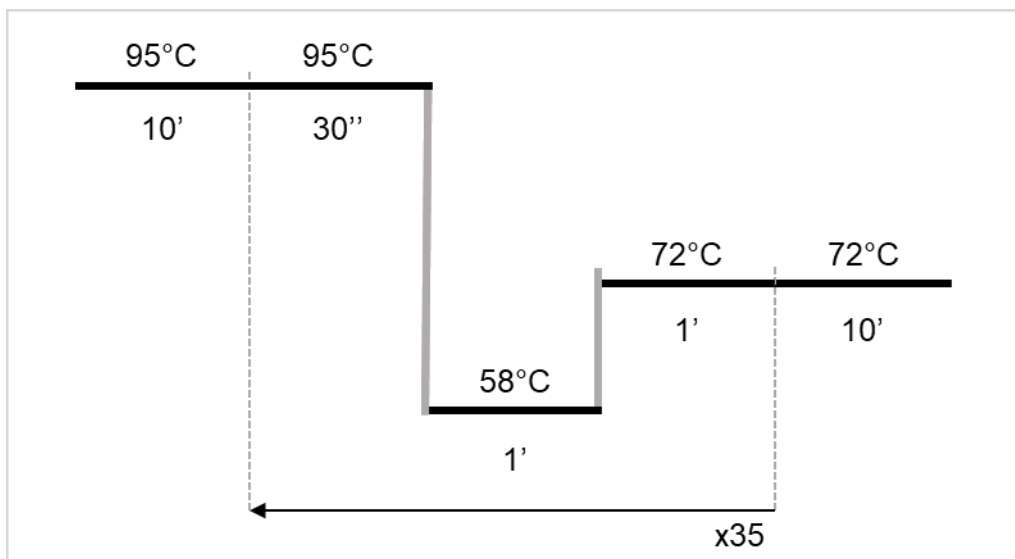


Figura 5 – Programa de amplificação do fragmento do gene *TLR3*

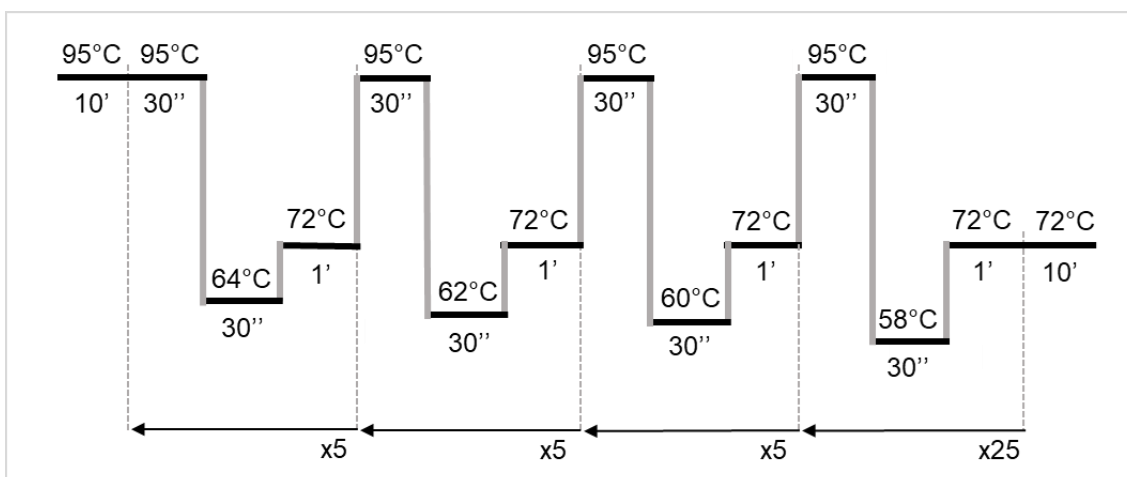


Figura 6 – Programa de amplificação dos fragmentos do gene *TLR7*

No final das reações de PCR, 10µL de cada reação foram carregados num gel de agarose a 1% para verificar se ocorreu amplificação do produto esperado. O gel de agarose foi preparado com 0,6g de agarose (GeneOn GmbH, Alemanha) em 60mL de TAE 1x, obtido pela diluição do stock 50x TAE Buffer (Omega Bio-tek, Norcross) com água destilada, e 2µL de GreenSafe Premium (NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes). Após a eletroforese a 80V (PowerPac 300, BIO-RAD) durante 40 minutos, o gel foi visualizado (ChemiDoc XRS+ System, BIO-RAD). Nos casos em que se verificou a amplificação, os restantes 10µL da reação foram enviados para sequenciação pelo método de Sanger. Os resultados da sequenciação foram analisados utilizando o software bioinformático Geneious Prime 2021.2.2 (<https://www.geneious.com>).

2.2.5. Quantificação de IgG anti-nucleocápside

O desenvolvimento da resposta imunitária do hospedeiro foi avaliada pela quantificação de IgG nas amostras. A quantificação de IgG foi feita recorrendo a um kit comercial de ELISA - EDI™ COVID-19 Nucleocapsid IgG Quantitative ELISA Kit (Epitope Diagnostics, Inc.).

Amostras de saliva com 1% Triton® X-100, EssentQ® (Scharlab,S.L.) previamente guardadas a -80°C foram descongeladas em gelo. Depois de descongeladas, as amostras foram centrifugadas a 10000 x *g* durante 10 minutos e o *pellet* foi descartado. Os ensaios foram realizados em duplicado utilizando 20µL de sobrenadante e seguindo as instruções do fabricante, de acordo com o protocolo em anexo (Anexo 7).

3. Resultados

3.1. Caracterização da população

A população em estudo consistiu num total de 194 participantes (Tabela 3). Estes foram divididos consoante o seu sexo, sendo 112 do sexo feminino e 82 do sexo masculino. Relativamente à idade foram estabelecidos três grupos, o primeiro grupo constituído por 82 participantes com idade entre os 18 e os 39 anos; o segundo grupo formado por 68 participantes com idade entre os 40 e os 59 anos; e o último grupo com 44 participantes com idade superior a 60 anos. Por último, os participantes foram classificados relativamente à existência de diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2, sendo que 28 mulheres e 27 homens já tinham tido um diagnóstico prévio de COVID-19, e os restantes 139 participantes (84 do sexo feminino e 55 do sexo masculino) nunca tinham sido diagnosticados com COVID-19.

Tabela 3 – Número de participantes por sexo, faixa etária e presença ou ausência de diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2

Idade	Participantes sexo feminino		Participantes sexo masculino	
	Sem diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2	Com diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2	Sem diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2	Com diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2
18 a 39 anos	34	13	24	11
40 a 59 anos	33	9	17	9
≥60 anos	17	6	14	7
TOTAL:	84	28	55	27
	112		82	

Dos 139 participantes sem diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2, 5 participantes são de nacionalidade brasileira, 1 é de nacionalidade italiana, e 2 são de

nacionalidade espanhola. Deste grupo de participantes, alguns apresentaram diagnóstico de outras comorbidades, como doenças cardiovasculares, doenças respiratórias, diabetes e hipertensão (Figura 5).

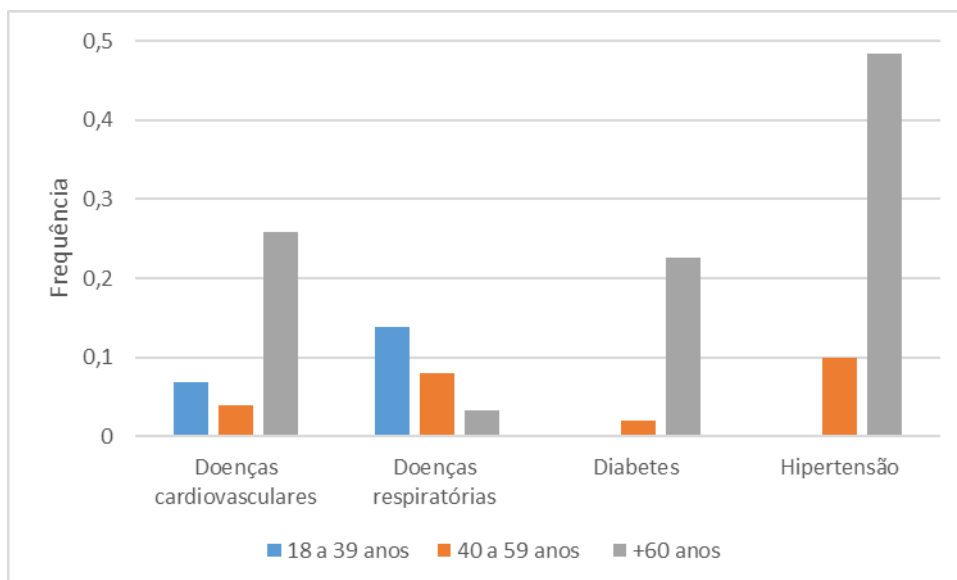


Figura 7 – Frequência de comorbidades nos participantes sem diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2, distribuídos por faixa etária

Alguns dos participantes com diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2 apresentavam comorbidades associadas, sendo estas mais frequentes nos indivíduos da última faixa etária (Figura 6).

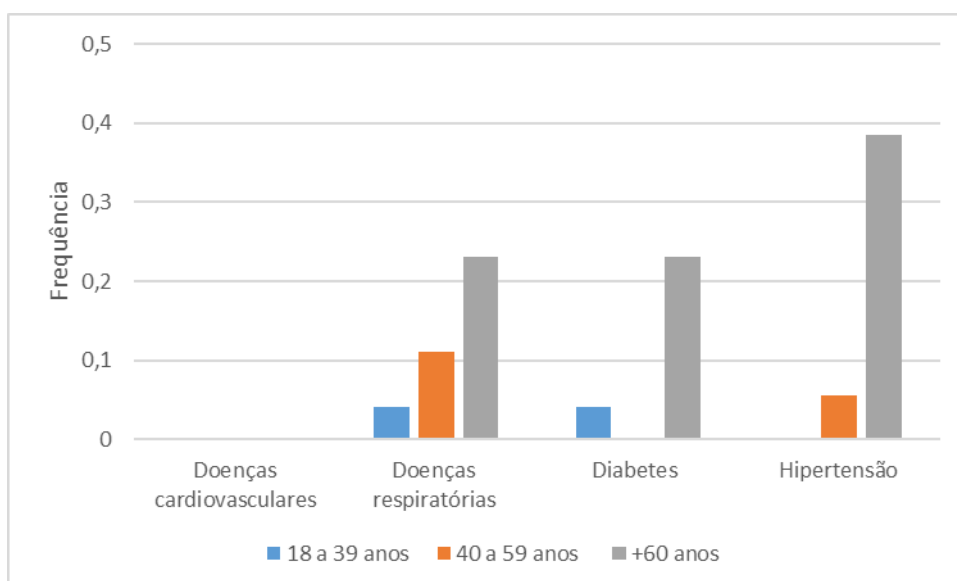


Figura 8 – Frequência de comorbidades nos participantes com diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2, distribuídos por faixa etária

Dos 24 participantes da faixa etária dos 18 aos 39 anos, 13 são do sexo feminino e 11 do sexo masculino e todos de nacionalidade portuguesa. Destes participantes, uma participante tem diagnóstico de diabetes tipo I, outra já foi vacinada contra a COVID-19 (após a infeção por SARS-CoV-2) e um participante tem diagnóstico de asma. Aquando da infeção por SARS-CoV-2, todos desenvolveram sintomas ligeiros a moderados à exceção de dois participantes sem comorbilidades associadas que foram assintomáticos (Figura 7). Nas participantes do sexo feminino, os sintomas mais comuns foram anosmia (perda de olfato), cansaço e dores musculares, enquanto nos participantes do sexo masculino foram dor de cabeça, cansaço e dores musculares.

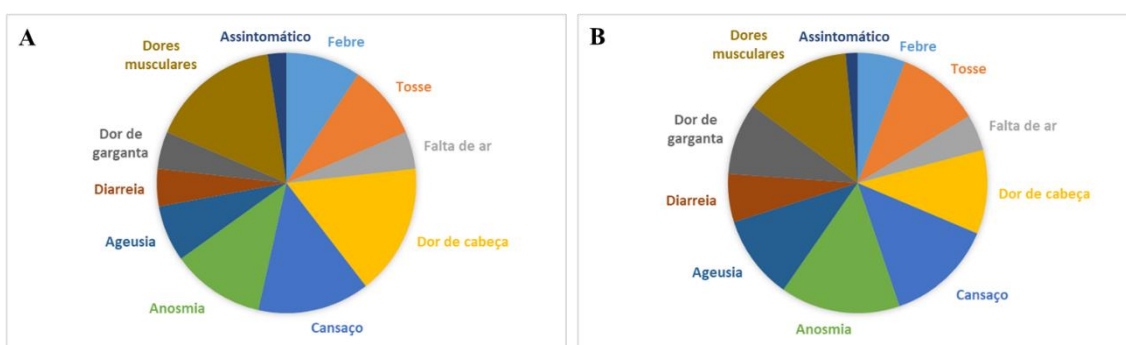


Figura 9 – Frequência dos sintomas apresentados pelos participantes com idade entre os 18 e os 39 anos. A – Participantes do sexo masculino; B – Participantes do sexo feminino

Já na faixa etária dos 40 aos 59 anos, das 9 mulheres e dos 9 homens todos de nacionalidade portuguesa, uma participante tem diagnóstico de doença respiratória e outra já foi vacinada contra a COVID-19 (após a infeção por SARS-CoV-2), um participante tem hipertensão e um outro tem diagnóstico de sinusite. Todos os participantes desenvolveram sintomas ligeiros a moderados, à exceção de uma participante assintomática e de um participante com hipertensão também assintomático (Figura 8). Nas participantes do sexo feminino, os sintomas mais comuns foram dores musculares e dor de cabeça, enquanto nos participantes do sexo masculino foi a tosse o sintoma mais comum.

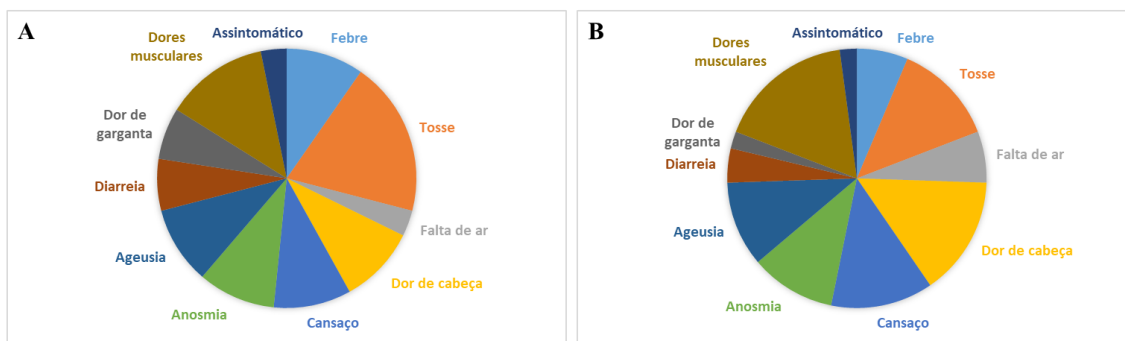


Figura 10 – Frequência dos sintomas apresentados pelos participantes com idade entre os 40 e os 59 anos. A – Participantes do sexo masculino; B – Participantes do sexo feminino

Por último, das 6 participantes do sexo feminino e dos 7 participantes do sexo masculino com mais de 60 anos, todos são nacionalidade portuguesa à exceção de uma participante de nacionalidade brasileira. Foram assintomáticos 3 pacientes: 2 participantes do sexo feminino, uma com hipertensão e outra com hipertensão e diabetes, e 1 participante do sexo masculino com hipertensão e enfisema pulmonar. Outros 3 participantes incluídos neste grupo, não tinham diagnóstico de outras comorbilidades e apresentaram sintomas ligeiros aquando da infeção por SARS-CoV-2. Houve ainda 3 participantes que desenvolveram sintomas graves necessitando de internamento em enfermaria: 2 participantes do sexo masculino, um com hipertensão, bronquite e asma, e outro com diabetes, e 1 participante do sexo feminino com asma e diabetes. Dos restantes participantes, 3 apresentam hipertensão e 1 apresenta asma, e todos desenvolveram sintomas ligeiros a moderados (Figura 9). Nas participantes do sexo feminino com mais de 60 anos, o sintoma mais comum foi o cansaço, enquanto nos participantes do sexo masculino foram as dores musculares.

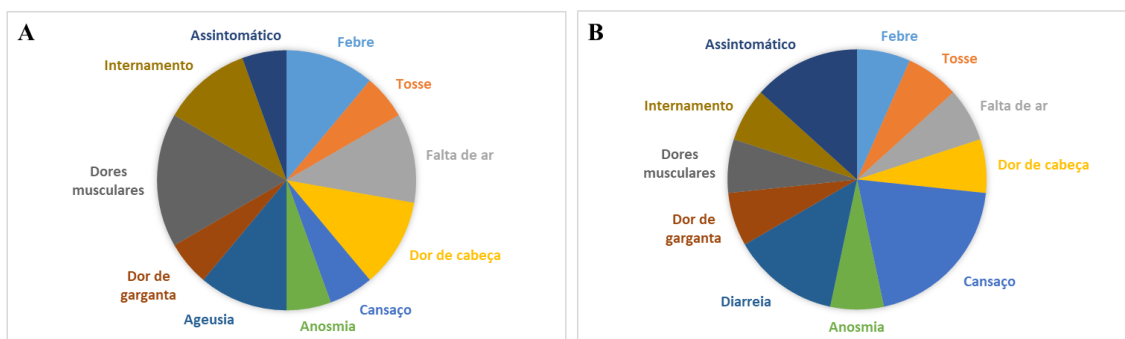


Figura 11 – Frequência dos sintomas apresentados pelos participantes com idade superior a 60 anos. A – Participantes do sexo masculino; B – Participantes do sexo feminino

3.2. Determinação da carga viral

A amplificação do RNA viral foi efetuada por RT-PCR em todas as amostras dos participantes que não tinham sido previamente diagnosticados com infecção por SARS-CoV-2, para detetar a presença ou ausência do vírus nas amostras. O resultado foi negativo para as 14 *pools* realizadas (13 *pools* com 10 amostras e 1 *pool* com 9 amostras), ou seja, nenhum dos 139 participantes estava infetado com SARS-CoV-2 no momento da colheita da amostra de saliva.

3.3 Extração de DNA

Com o método de extração de DNA com tampão STE, houve dificuldades em ressuspender o DNA extraído. As concentrações de DNA foram muito baixas, independentemente do método de armazenamento da amostra, embora na amostra armazenada a -20°C a concentração de DNA tenha sido superior à da amostra armazenada a 4°C, e o DNA extraído apresentava baixa qualidade, de acordo com o *ratio* das absorbâncias a 260/280 nm.

O DNA extraído da saliva com os kits comerciais apresentou melhor qualidade mas a concentração de DNA continuou a ser baixa. Com o E.Z.N.A.® Forensic DNA Kit (Omega Bio-tek, Inc), observou-se uma maior diferença na concentração de DNA extraído da amostra que tinha sido armazenada a -20°C em comparação com a amostra armazenada a 4°C, mas apesar da concentração ser superior, a qualidade foi ligeiramente inferior à da amostra armazenada a 4°C. Já com o NZY Tissue gDNA Isolation kit (NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes), não se verificaram grandes diferenças na concentração de DNA extraído e na sua qualidade entre as diferentes temperaturas de armazenamento. Com este kit, mas fazendo a diluição da saliva com PBS antes da extração, os resultados da quantificação melhoraram, especialmente na concentração de DNA.

Na tabela 4, encontram-se os melhores resultados obtidos em cada método de extração, sendo resultados representativos de várias extrações.

Tabela 4 – Resultado da quantificação de DNA extraído com os vários métodos de extração na mesma amostra de saliva armazenada a diferentes temperaturas

Método de extração de DNA	Armazenamento	Concentração (ng/μL)	A260/280
Tampão STE	4°C	6,628	0,93
	20°C	17,054	0,64
E.Z.N.A.® Forensic DNA Kit	4°C	5,393	1,67
	20°C	30,424	1,29
NZY Tissue gDNA Isolation kit	4°C	7,410	1,74
	20°C	6,122	1,63
Diluição com PBS NZY Tissue gDNA Isolation kit	4°C	14,743	1,74
	20°C	15,320	1,73

Com o tratamento da amostra com o tampão de lise QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Lucigen), obtemos uma mistura de todos os componentes da saliva onde o DNA se encontra disponível, sem ser purificado. Utilizando este tratamento foi possível amplificar DNA das amostras, e foi o método selecionado para posterior análise.

3.4. Identificação de polimorfismos genéticos

Após amplificação por PCR e eletroforese em gel de agarose, de acordo com os protocolos descritos acima na secção de métodos, as amostras nas quais se confirmou amplificação do fragmento do gene *TLR3*, foram sequenciadas pelo método de Sanger (Figura 10). As amostras onde não ocorreu amplificação do fragmento (ausência de banda com o tamanho correspondente, 436pb, ou sem intensidade suficiente) não foram sequenciadas (Figura 10, amostra 7).

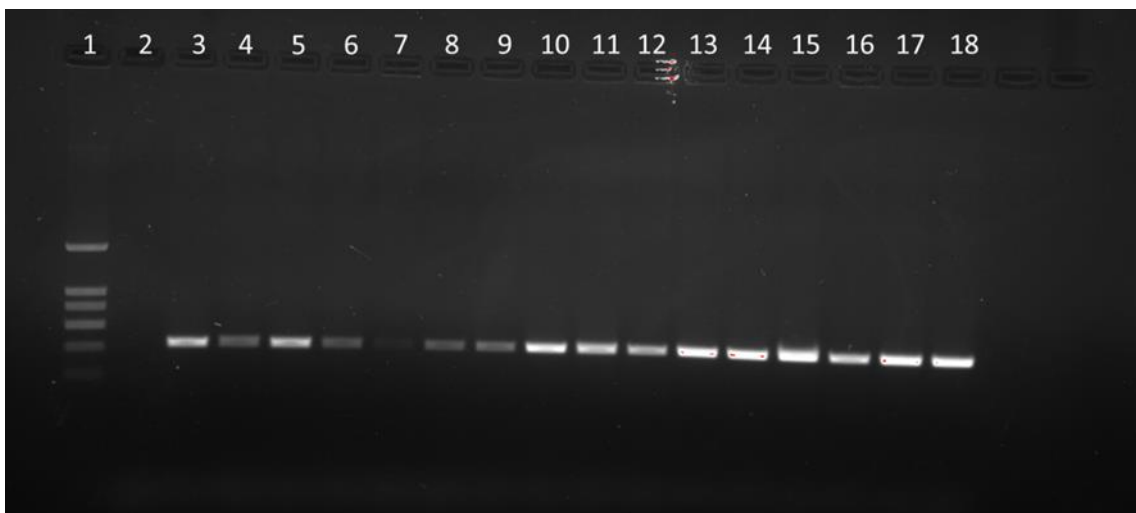


Figura 12 – Gel de agarose para visualização do produto de PCR com os *primers* para *TLR3*.
 1 – Ladder I (NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes); 2 – Controle negativo; 3 – Controle positivo; 4 a 18 – Amostras de participantes

Para os fragmentos de *TLR3* amplificados, as sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com a sequência de referência (NC_000004) obtida na base de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) para se identificarem os polimorfismos presentes. Foram identificados 7 polimorfismos no fragmento de *TLR3* sequenciado.

Tabela 5 – Número de participantes com os polimorfismos identificados no fragmento de *TLR3*, por género e faixa etária

	Sexo feminino			Sexo masculino			Número total de participantes
	18 a 39 anos	40 a 59 anos	≥60 anos	18 a 39 anos	40 a 59 anos	≥60 anos	
rs5743312	5	2	2	1	2	2	14
rs1879026	8	0	0	5	3	3	19
rs111611328	1	0	1	0	0	0	2
rs5743313	7	8	0	5	5	3	28
rs5743314	7	8	0	4	5	3	27
rs5743315	0	0	1	1	0	0	2
rs78726532	0	0	1	1	0	0	2

O polimorfismo rs5743312 foi identificado em 14 participantes, sendo que 2 participantes são homozigóticos para esta alteração e os restantes 12 participantes são heterozigóticos (Figura 11). Dos participantes com este polimorfismo, 3 nunca tinham sido diagnosticados com infecção por SARS-CoV-2, outros 3 participantes foram assintomáticos aquando da infecção, e os restantes 8 participantes apresentaram sintomas ligeiros a moderados.

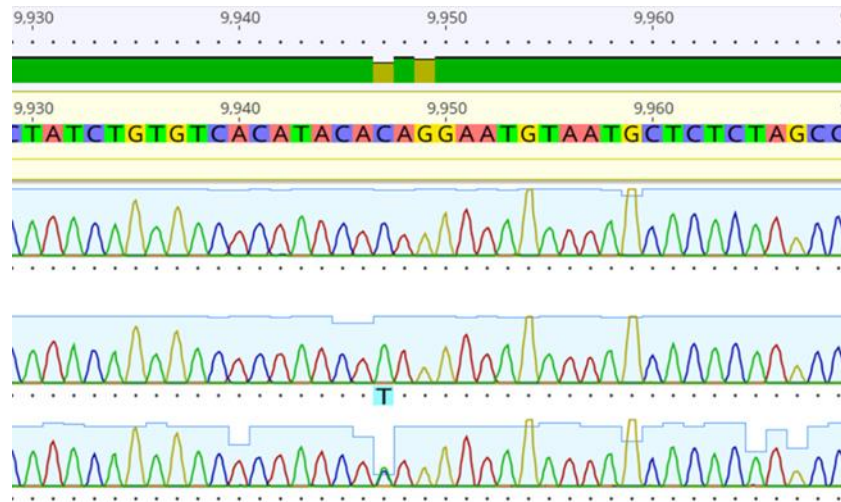


Figura 13 – Alinhamento de seqüências de *TLR3* evidenciando o polimorfismo rs5743312 em participantes homozigótico (TT) e heterozigótico (CT)

Em 19 participantes, foi identificado o polimorfismo rs1879026, sendo apenas um paciente homozigótico para esta alteração e os restantes 18 participantes heterozigóticos (Figura 12). Dos 19 participantes com este polimorfismo, 3 nunca tinham sido diagnosticados com infecção por SARS-CoV-2, 2 participantes não desenvolveram sintomas aquando da infecção por SARS-CoV-2, 13 desenvolveram sintomas ligeiros a moderados, e 1 participante desenvolveu sintomas graves necessitando de internamento em enfermaria.

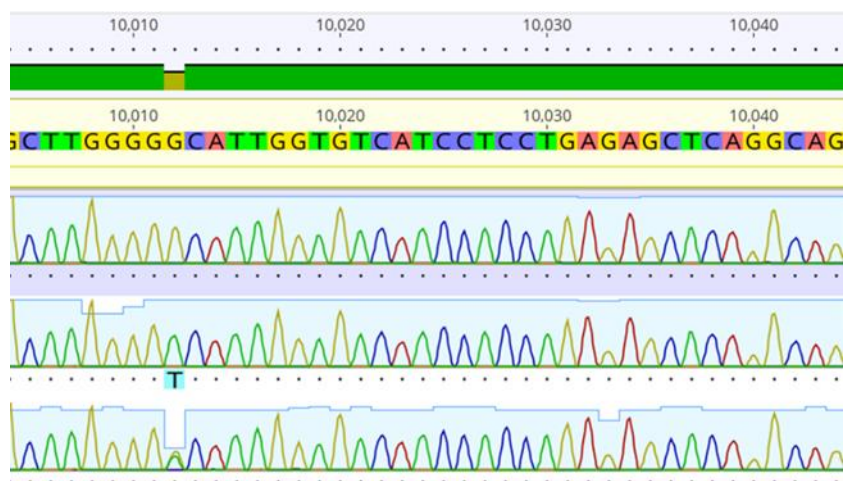


Figura 14 – Alinhamento de seqüências de *TLR3* evidenciando o polimorfismo rs1879026 em participantes homozigótico (TT) e heterozigótico (GT)

O polimorfismo rs111611328 foi identificado em apenas 2 participantes heterozigóticos (Figura 13).



Figura 15 – Alinhamento de seqüências de *TLR3* evidenciando o polimorfismo rs111611328 em participante heterozigótico (GC)

Os polimorfismos rs5743313 e rs5743314 foram os polimorfismos identificados em mais pacientes. O polimorfismo rs5743313 foi identificado em 28 participantes, sendo 26 heterozigóticos e apenas 2 participantes homozigóticos para esta alteração (Figura 14). Aquando da infecção por SARS-CoV-2, a maioria dos participantes (19 participantes) desenvolveu sintomas ligeiros a moderados e 3 participantes foram assintomáticos. Os restantes 6 participantes com este polimorfismo nunca tinham sido diagnosticados com COVID-19.

Já o polimorfismo rs5743314 foi identificado em 27 participantes, 2 homozigóticos e 25 heterozigóticos para esta alteração (Figura 14). Destes, 5 nunca foram diagnosticados com COVID-19, 3 foram assintomáticos aquando da infeção por SARS-CoV-2, e os restantes 19 apresentaram sintomas ligeiros a moderados.



Figura 16 – Alinhamento de seqüências de *TLR3* evidenciando os polimorfismos rs5743313 e rs5743314, respetivamente, em participantes homozigótico (TT e CC, respetivamente) e heterozigótico (CT e GC, respetivamente)

Os polimorfismos rs5743315 e rs78726532 foram identificados em 2 participantes, ambos heterozigóticos para estas alterações (Figuras 15 e 16). Os 2 participantes desenvolveram sintomas ligeiros a moderados aquando da infeção por SARS-CoV-2.

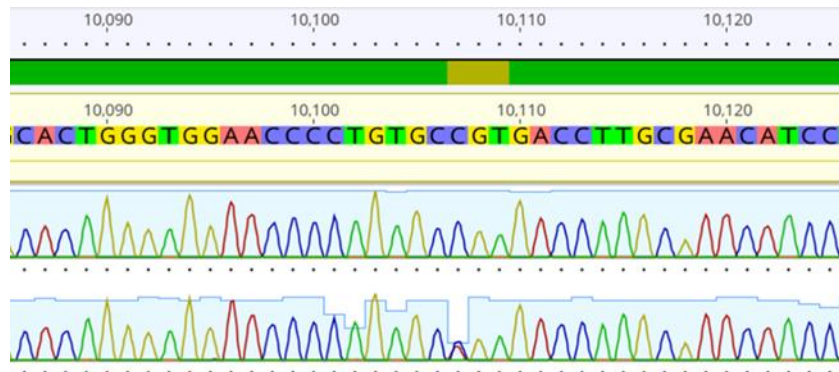


Figura 17 – Alinhamento de seqüências de *TLR3* evidenciando o polimorfismo rs5743315 em participante heterozigótico (CA)



Figura 18 – Alinhamento de seqüências de *TLR3* evidenciando o polimorfismo rs78726532 em participante heterozigótico (AG)

Para os fragmentos de *TLR7*, as amostras nas quais se confirmou amplificação (pela presença de bandas com os tamanhos correspondentes aos fragmentos, 902pb e 899pb) foram sequenciadas pelo método de Sanger (Figura 17). As amostras onde não ocorreu amplificação (ausência de bandas com os tamanhos correspondentes aos fragmentos no gel de agarose), não foram sequenciadas (Figura 17, amostra 5).

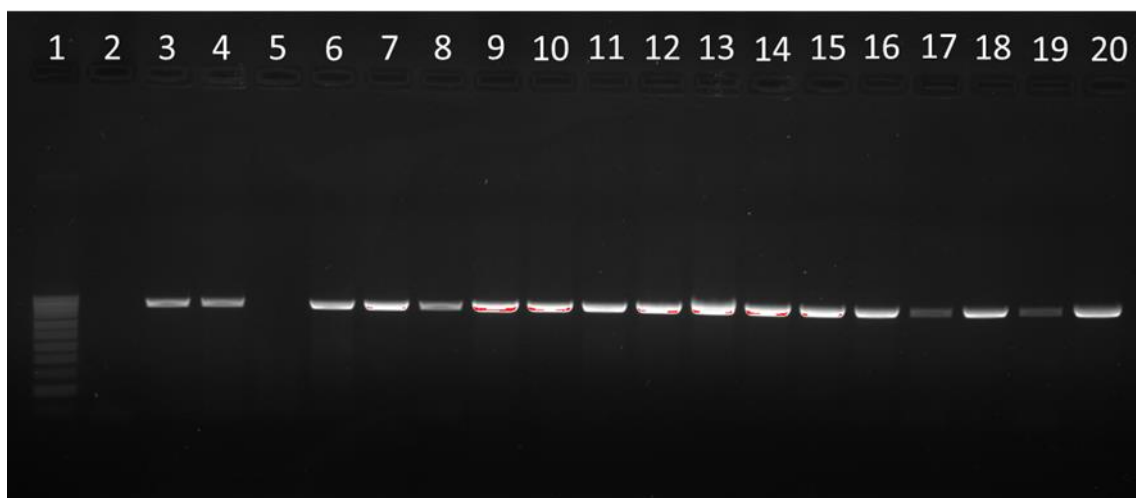


Figura 19 – Gel de agarose para visualização do produto de PCR com os *primers* para *TLR7* (forward: 5'-TGACCTAAGTGGAAATTGCC-3' e reverse: 5'-GCCGGTTGTTGGAGAAGTCC-3'). 1 – Ladder V (NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes); 2 – Controlo negativo; 3 – Controlo positivo; 4 a 20 – Amostras de participantes

Para os fragmentos de *TLR7* amplificados, as seqüências obtidas foram alinhadas e comparadas com a seqüência de referência de *TLR7* (NC_000023) obtida na base de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Foram identificados 3 polimorfismos nos fragmentos de *TLR7* sequenciados.

O polimorfismo rs179008 foi identificado em 15 participantes, sendo 4 do sexo masculino e 11 do sexo feminino, das quais apenas uma homozigótica (Figura 18). Destes 15 participantes, 4 participantes do sexo feminino nunca tinham sido diagnosticadas com infecção por SARS-CoV-2, e dos 11 pacientes com diagnóstico prévio de infecção por SARS-CoV-2, 1 participante homozigótico foi assintomático e 10 apresentaram sintomas ligeiros a moderados.

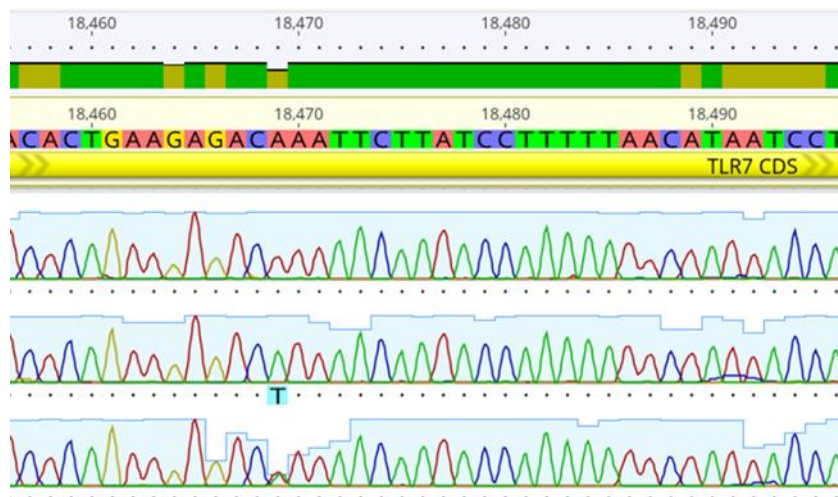


Figura 20 – Alinhamento de seqüências de *TLR7* evidenciando o polimorfismo rs179008 em participantes homozigótico (TT) e heterozigótico (AT)

Os polimorfismos rs5743780 e rs5743781 foram identificados em 3 participantes, 1 do sexo masculino e 2 participantes do sexo feminino, heterozigóticos para esta alteração (Figuras 19 e 20). Os 3 participantes tinham diagnóstico prévio de infecção por SARS-CoV-2, sendo que 2 participantes apresentaram sintomas ligeiros a moderados e o participante do sexo masculino desenvolveu sintomas graves necessitando de internamento em enfermaria.

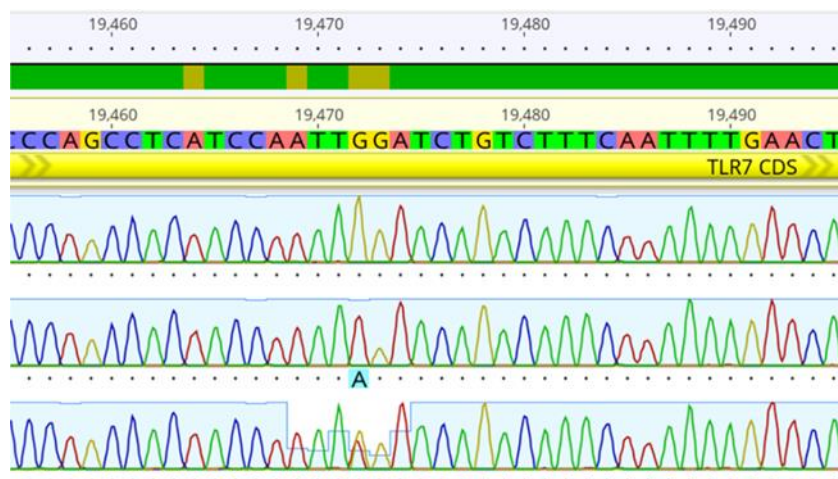


Figura 21 – Alinhamento de sequências de *TLR7* evidenciando o polimorfismo rs5743780 em participantes homozigótico (AA) e heterozigótico (GA)

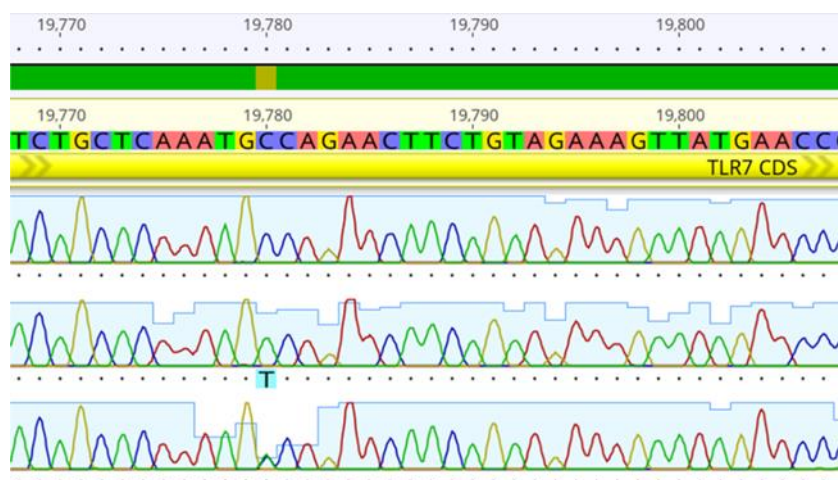


Figura 22 – Alinhamento de sequências de *TLR7* evidenciando o polimorfismo rs5743781 em participantes homozigótico (TT) e heterozigótico (CT)

3.5. Quantificação de IgG anti-nucleocápside

A quantificação de IgG anti-nucleocápside foi feita a todos os participantes (Tabela 8). Dos 55 pacientes com diagnóstico prévio de infecção por SARS-CoV-2, apenas 18 participantes tiveram um resultado positivo para IgG anti-nucleocápside. E dos 139 participantes que nunca tinham sido diagnosticados com COVID-19, 5 participantes tiveram um resultado positivo para IgG anti-nucleocápside.

Tabela 6 – Resultados da quantificação de IgG anti-nucleocápside, indicando o número de pacientes sem ou com anticorpos para o vírus SARS-CoV-2

	Com diagnóstico prévio de infecção por SARS-CoV-2	Sem diagnóstico prévio de infecção por SARS-CoV-2
Resultado negativo	37	134
Resultado positivo	18	5
TOTAL:	55	139

A frequência de resultados positivos para IgG anti-nucleocápside em participantes com diagnóstico prévio de infecção por SARS-CoV-2, foi mais elevada para os participantes do sexo masculino em comparação com as participantes do sexo feminino para as faixas etárias dos 18 aos 39 anos e dos 40 aos 59 anos. Já para a última faixa etária (participantes com mais de 60 anos), a frequência de resultados positivos foi mais elevada para os participantes do sexo feminino em comparação com os participantes do sexo masculino (Figura 21).

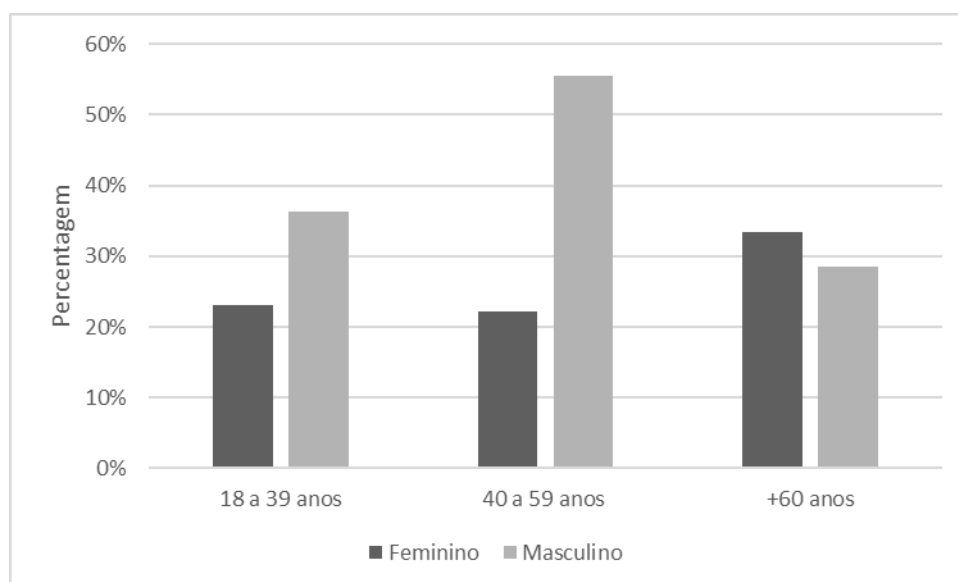


Figura 23 – Percentagem de participantes com resultado positivo para IgG anti-nucleocápside nos participantes com diagnóstico prévio de infecção por SARS-CoV-2, por sexo e faixa etária

Dos 7 participantes da primeira faixa etária (com idades entre os 18 e os 39 anos) com diagnóstico prévio de COVID-19 que tiveram um resultado positivo para IgG anti-nucleocápside, 6 participantes apresentaram sintomas ligeiros a moderados aquando da infeção por SARS-CoV-2 e 1 participante foi assintomático. Na faixa etária dos 40 aos 59 anos, apresentaram um resultado positivo apenas 7 pacientes, sendo que todos apresentaram sintomas ligeiros a moderados. Já na faixa etária dos participantes com mais de 60 anos, 4 participantes apresentaram resultado positivo para IgG anti-nucleocápside. Nas participantes do sexo feminino, tiveram um resultado positivo uma participante que tinha sido assintomática aquando da infeção por SARS-CoV-2 e uma participante que tinha necessitado de internamento em enfermaria por ter desenvolvido sintomas graves. No caso dos participantes do sexo masculino, foram positivos para IgG anti-nucleocápside 2 participantes que apresentaram sintomas ligeiros, sendo que um dos participantes tinha diagnóstico de asma. Os dois participantes do sexo masculino com mais de 60 anos que tinham necessitado de internamento em enfermaria por terem desenvolvido sintomas graves, tiveram um resultado negativo para IgG anti-nucleocápside.

O tempo decorrido entre a infeção por SARS-CoV-2 e a colheita de amostra biológica variou entre os vários participantes. Dos 55 participantes com diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2, 21 fizeram a recolha de saliva menos de 3 meses após o diagnóstico, 28 participantes fizeram a recolha mais de 3 meses mas menos de 6 meses após a infeção, e os restantes 6 participantes fizeram a recolha de saliva decorridos mais de 6 meses após a infeção (Figura 22).

No caso dos participantes que tinham estado infetados por SARS-CoV-2 há menos de 3 meses aquando da recolha de saliva, mais de 50% teve um resultado positivo para IgG anti-nucleocápside. A percentagem de participantes com diagnóstico prévio de COVID-19 mas com resultado negativo para IgG anti-nucleocápside, aumentou consideravelmente nos participantes que recolheram saliva mais de 3 meses mas menos de 6 meses decorridos após a infeção, sendo superior a 70%. Nos participantes que tinham estado infetados por SARS-CoV-2 há mais de 6 meses, nenhum apresentou resultado positivo para IgG anti-nucleocápside.

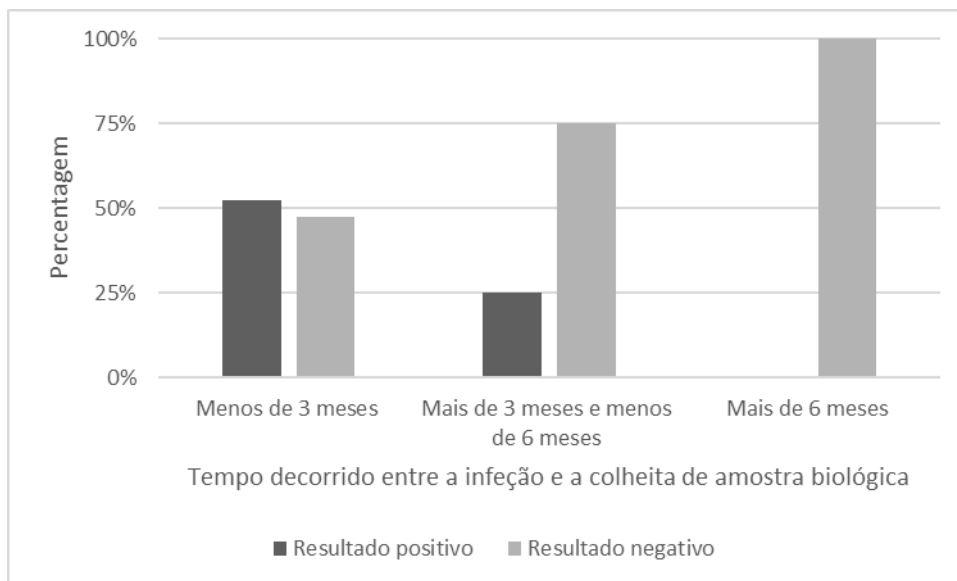


Figura 24 – Percentagem de resultados positivo e negativo para IgG anti-nucleocápside nos participantes com diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2 em função do tempo decorrido entre a infeção por SARS-CoV-2 e a colheita de amostra biológica

Dos participantes sem diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2, foram positivos para IgG anti-nucleocápside 5 participantes, 4 participantes do sexo feminino e 1 participante do sexo masculino. Todos estes sem comorbilidades associadas e apenas com idades compreendidas nas duas primeiras faixas etárias (Figura 23).

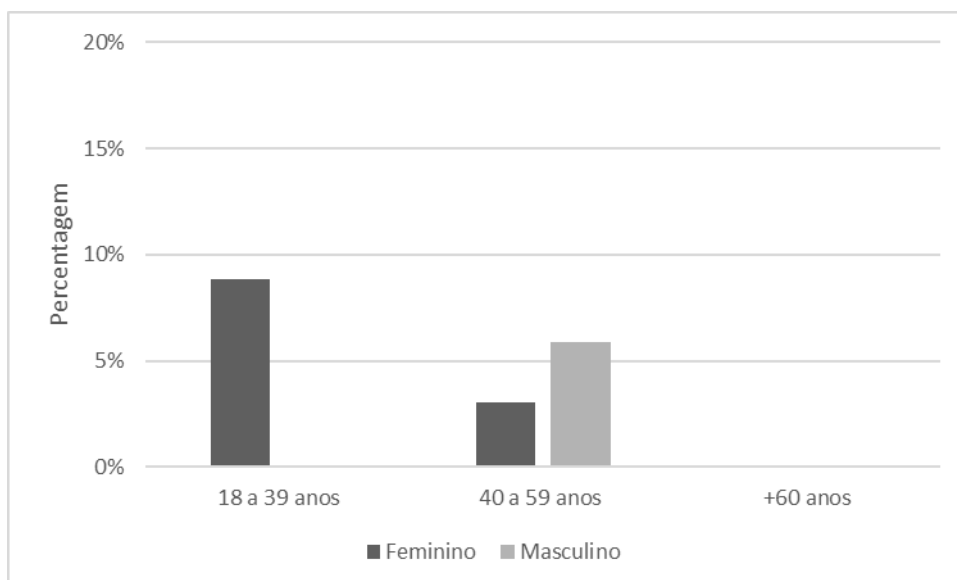


Figura 25 – Percentagem de participantes com resultado positivo para IgG anti-nucleocápside nos participantes sem diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2, por sexo e faixa etária

4. Discussão

O medo provocado pela pandemia da COVID-19 juntamente com as medidas de confinamento implementadas em todo o país, levaram a uma diminuição da procura de cuidados de saúde por parte da população em geral. Tradicionalmente, o acesso a cuidados de saúde implica um contacto direto entre profissionais de saúde e pacientes, contacto esse que pode aumentar o risco de infeção por SARS-CoV-2. De forma a contornar este problema, a Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa associou-se à JS Clínica Médica e à Altice Labs num projeto para fazer a triagem de pacientes com recurso a um assistente virtual. O Proteger+ (CENTRO-01-02B7-FEDER-070086) ofereceu aos participantes um rastreio gratuito utilizando a saliva, para identificar participantes infetados com SARS-CoV-2 que fossem assintomáticos e disponibilizar o seu acompanhamento por telemonitorização e teleconsulta. Deste modo, poderia diminuir o risco de contágio entre pacientes e profissionais de saúde, e consequentemente diminuir também a taxa de transmissão do vírus. Para além do rastreio, também foi feita a avaliação da resposta imunitária de participantes que já tinham sido previamente diagnosticados com COVID-19, e a caracterização da suscetibilidade dos participantes à infeção por SARS-CoV-2. Integrado neste projeto, o trabalho desenvolvido nesta tese incluiu a caracterização clínica e sociodemográfica de um grupo de pacientes da Clínica Dentária Universitária da Universidade Católica Portuguesa e da JS Clínica Médica (Viseu), bem como a deteção de carga viral para a identificação de possíveis participantes infetados por SARS-CoV-2. Foi também feita a quantificação de anticorpos, de forma a avaliar a resposta imunitária dos participantes com diagnóstico prévio de COVID-19, e identificar participantes que estiveram infetados por SARS-CoV-2 sem nunca terem sido diagnosticados. Foram ainda sequenciados fragmentos dos genes *TLR*, que estão associados à resposta imunitária, para identificar possíveis variantes genéticas que pudessem explicar uma maior suscetibilidade ou resistência à infeção por SARS-CoV-2.

4.1. Fatores de risco

Existe uma grande variabilidade nos sintomas apresentados pelos indivíduos infectados com SARS-CoV-2, sendo que alguns indivíduos nunca chegam a desenvolver sintomas (assintomáticos) e outros apresentam sintomas que vão desde sintomas ligeiros, moderados a graves, sendo que os últimos podem levar ao internamento dos doentes e em casos extremos à sua morte (9, 11, 14). Segundo a Organização Mundial da Saúde, os sintomas mais comuns apresentados pelos doentes com COVID-19 são febre, tosse, cansaço e perda de olfato e paladar (22). Já dor de garganta, dor de cabeça, dores musculares e diarreia são os sintomas menos comuns, e a falta de ar ou a dificuldade em respirar é considerada um sintoma grave (22). No caso da população em estudo, os sintomas mais comuns foram dores musculares, cansaço, dor de cabeça, tosse e perda de olfato, e os sintomas menos comuns foram diarreia, dor de garganta, febre e perda de paladar. A maioria dos participantes com diagnóstico prévio de infecção por SARS-CoV-2 (55%) apresentou sintomas ligeiros como tosse, dor de cabeça, cansaço, dores musculares e perda de olfato, entre outros menos comuns. Apenas 20% da população estudada desenvolveu sintomas moderados que incluíam, para além dos apresentados pelos participantes com sintomas ligeiros, falta de ar e dificuldade em respirar, mas sem necessidade de internamento, ao contrário dos 5% que desenvolveu sintomas mais graves necessitando de internamento em enfermaria. Considerando os 5 participantes sem diagnóstico prévio de infecção por SARS-CoV-2 mas com resultado positivo para IgG anti-nucleocápside, ou seja, estiveram infectados mas não desenvolveram sintomas aquando da infecção, 20% da população em estudo foi assintomática. Este valor é inferior aos valores mundiais, uma vez que cerca de um terço dos indivíduos infectados estão descritos como assintomáticos (3, 23).

A presença de outras comorbilidades, como doenças cardiovasculares, doenças respiratórias, diabetes mellitus e hipertensão, está associada a um maior risco dos pacientes desenvolverem uma forma grave da COVID-19 em comparação com indivíduos que não apresentem comorbilidades (1, 16). A idade é outro fator associado a uma maior suscetibilidade de desenvolver formas graves da doença, em que os indivíduos mais velhos têm mais probabilidade de apresentar sintomas graves, também por apresentarem maior prevalência de comorbilidades (1). Neste trabalho, os 3 participantes que necessitaram de internamento tinham mais de 60 anos e comorbilidades associadas,

como asma, diabetes mellitus, hipertensão e bronquite. Também apresentaram sintomas moderados, 2 participantes com mais de 60 anos e hipertensão, no entanto, 5 participantes com comorbilidades associadas desenvolveram apenas sintomas ligeiros. Destes, 2 com diagnóstico de diabetes mellitus e asma pertenciam à primeira faixa etária (18 a 39 anos), 1 participante com doenças respiratórias pertencia à segunda faixa etária (40 a 59 anos), e os restantes 2 participantes com mais de 60 anos apresentavam asma e hipertensão. Contrariamente ao esperado, 2 participantes com hipertensão, 1 participante com hipertensão e diabetes mellitus, e 1 participante com hipertensão e enfisema pulmonar, foram assintomáticos aquando da infeção por SARS-CoV-2. Globalmente, o número de pacientes em cada grupo não é suficiente para tirar conclusões robustas sobre a associação entre comorbilidades e gravidade dos sintomas apresentados neste estudo.

4.2. Polimorfismos

Para além destes fatores, os TLRs apresentam polimorfismos genéticos que podem ser associados a uma maior suscetibilidade a infeções virais, nomeadamente à infeção por SARS-CoV-2 (1, 24, 25). Nas amostras da população em estudo, foram identificados 7 polimorfismos no intrão 3 do *TLR3* e 3 polimorfismos no exão 3 do *TLR7*.

Alguns dos polimorfismos identificados no gene *TLR3*, já foram descritos como estando associados a infeções virais. O polimorfismo rs5743312 foi associado à proteção contra o desenvolvimento de uma infeção crónica pelo vírus da hepatite C (26). Na população em estudo, este polimorfismo foi identificado em 14 participantes, sendo que 2 participantes nunca tinham sido diagnosticados com COVID-19 e o resultado da quantificação de IgG anti-nucleocápside foi negativo, 3 participantes foram assintomáticos aquando da infeção por SARS-CoV-2, e outros 7 participantes desenvolveram sintomatologia ligeira. Apenas um participante com este polimorfismo apresentou sintomatologia moderada, e outro participante, com comorbilidades associadas, desenvolveu sintomatologia grave necessitando de internamento. Dos 2 participantes homocigóticos para esta alteração, um nunca tinha sido diagnosticado com infeção por SARS-CoV-2 e o outro foi assintomático aquando da infeção por SARS-CoV-2.

O polimorfismo rs1879026, identificado em 19 participantes da população em estudo, foi associado a uma maior suscetibilidade à infecção pelo vírus da hepatite B na população da Arábia Saudita (27). A maioria dos participantes (9 participantes) com este polimorfismo desenvolveu sintomas ligeiros aquando da infecção por SARS-CoV-2, 4 participantes apresentaram sintomas moderados, e 1 participante com comorbilidades associadas necessitou de internamento devido aos sintomas graves que desenvolveu. No entanto, 3 participantes foram assintomáticos e os restantes 2 participantes nunca tinham sido diagnosticados com COVID-19. O único participante homozigótico para esta alteração apresentou sintomas ligeiros.

Os polimorfismos rs5743313 e rs5743314 foram os mais frequentes na população em estudo, tendo sido identificados em 28 e 27 participantes, respetivamente. Estes dois polimorfismos, juntamente com o polimorfismo rs111611328 (identificado em apenas 2 participantes da população em estudo), foram descritos como estando associados à progressão da doença hepática relacionada com a infecção pelo vírus da hepatite C (28). O polimorfismo rs5743313 foi ainda relacionado à suscetibilidade ao vírus influenza A (29). Da população em estudo, nenhum dos participantes que necessitaram de internamento devido aos sintomas graves apresentados aquando da infecção por SARS-CoV-2 apresenta estes polimorfismos, e apenas 4 participantes com estes polimorfismos apresentaram sintomas moderados, sendo que 2 deles são homozigóticos para os polimorfismos rs5743313 e rs5743314.

O polimorfismo rs78726532 está associado à suscetibilidade à infecção pelo vírus da hepatite C (28). Na população em estudo, este polimorfismo foi identificado apenas em 2 participantes, sendo que 1 participante com mais de 60 anos e com comorbilidades associadas, apresentou sintomas moderados, e o outro participante apresentou sintomas ligeiros.

Apesar de todos os polimorfismos identificados serem variações num intrão do *TLR3*, estas podem ocorrer em zonas reguladoras do gene e resultar na maior ou menor expressão do mesmo, podendo afetar na mesma a resposta do hospedeiro (30).

No caso das alterações no gene *TLR7*, o polimorfismo rs179008 foi identificado em 15 participantes. Neste caso, ocorre a substituição do alelo A pelo alelo T, o que leva à substituição de uma glutamina por uma leucina (Gln11Leu). Esta mutação *missense* foi

associada a uma redução da atividade da proteína e, conseqüentemente, a um risco aumentado de infecção por citomegalovírus materno e a uma redução da capacidade de eliminação espontânea do vírus da hepatite C (25, 31). A glutamina é um aminoácido polar neutro, não carregado em condições fisiológicas, já a leucina é um aminoácido alifático não polar (32). Foi demonstrado que pacientes com o alelo T, após ativação do TLR7, libertam menos IFN α do que pacientes com o alelo A (33). Dos participantes da população em estudo com este polimorfismo, nenhum desenvolveu sintomas graves e apenas 3 desenvolveram sintomas moderados.

O polimorfismo rs5743780 resulta numa mutação sinónima, o alelo G é substituído pelo alelo A mantendo-se a leucina (Leu345=). No polimorfismo rs5743781, a substituição do alelo C pelo alelo T, leva à substituição de uma alanina por uma valina (Ala448Val) na proteína, provocando uma mutação *missense* já classificada como benigna (VCV000787154.2, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/>).

Um participante que à partida seria mais vulnerável à infecção por SARS-CoV-2, por ter mais de 60 anos e diagnóstico de hipertensão, foi assintomático aquando da infecção por SARS-CoV-2. Neste participante foi identificado o polimorfismo rs5743312 já referido anteriormente como estando associado a proteção na infecção pelo vírus da hepatite C (26). Outro participante com mais de 60 anos, com comorbilidades associadas (hipertensão e enfisema pulmonar) e que também foi assintomático aquando da infecção por SARS-CoV-2, apresenta dois polimorfismos referidos anteriormente como estando associados à progressão de doença hepática relacionada com a infecção pelo vírus da hepatite C, os polimorfismos rs5743313 e rs5743314 (28). Um grupo de 5 participantes que à partida seriam mais resistentes à infecção por SARS-CoV-2, por terem idades entre os 18 e os 39 anos e sem diagnóstico de outras comorbilidades, apresentaram sintomas moderados aquando da infecção. Destes, 2 apresentam o polimorfismo rs1879026, 1 participante apresenta os polimorfismos rs5743313 e rs5743314, outro participante apresenta o polimorfismo rs179008, e o último participante apresenta a combinação dos 4 polimorfismos apresentados pelos participantes referidos anteriormente, todos eles associados ao aumento da suscetibilidade a infeções virais (26 - 28, 31). Apesar destas observações, o pequeno número de participantes em cada grupo não permite tirar conclusões definitivas.

4.3. Resposta do sistema imunitário

Relativamente à quantificação de anticorpos, sabe-se que alguns doentes com resultado positivo em RT-PCR, o que confirma a infeção por SARS-CoV-2, são negativos ou apresentam níveis indetetáveis de IgG (1, 17). Em estudos anteriores, aproximadamente 25% dos pacientes com diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2 têm um resultado negativo aquando da quantificação de IgG (1). Neste estudo, apenas 32,7% dos participantes com diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2 tiveram um resultado positivo para IgG anti-nucleocápside, sendo que 61% tinham estado infetados há menos de 3 meses, e 39% tinham estado infetados há mais de 3 mas há menos de 6 meses. Todos os participantes em que já tinham decorrido mais de 6 meses entre a infeção por SARS-CoV-2 e a recolha de saliva, tiveram um resultado negativo na quantificação de IgG anti-nucleocápside. A diminuição da frequência de pacientes com diagnóstico prévio de infeção por SARS-CoV-2 e com resultado positivo na quantificação de IgG anti-nucleocápside, sugere que os níveis de IgG anti-nucleocápside vão diminuindo ao longo do tempo. Após a infeção por SARS-CoV-2 os níveis de IgG anti-nucleocápside aumentam, sendo que começam a diminuir decorridas 6 semanas da infeção (17).

Doentes que necessitaram de internamento aquando da infeção por SARS-CoV-2, doentes que apresentaram sintomas mais graves, e doentes que desenvolveram tosse e febre estão associados a níveis de anticorpos mais elevados (17). Dos participantes deste estudo que apresentaram sintomas moderados, febre, tosse, ou que necessitaram de internamento em enfermaria aquando da infeção por SARS-CoV-2, apenas 34,3% teve um resultado positivo na quantificação de IgG anti-nucleocápside, sendo que dos 3 participantes que necessitaram de internamento só um teve resultado positivo. Já as pacientes do sexo feminino, que geralmente não desenvolvem formas tão graves da doença, tendem a apresentar níveis mais baixos de anticorpos contra a proteína spike (17). Nas primeiras duas faixas etárias (18 aos 39 anos, e 40 aos 59 anos), verificou-se que a frequência de resultados positivos na quantificação de IgG anti-nucleocápside foi superior nos participantes do sexo masculino quando comparados às participantes do sexo feminino. Apesar disto, o baixo número de participantes associado à diferença temporal entre o diagnóstico de COVID-19 e a recolha de saliva, que foi diferente para todos os participantes, não permitem tirar conclusões.

Neste estudo foi possível cumprir parcialmente os objetivos. Não foi possível alcançar conclusões definitivas relativamente à associação dos polimorfismos identificados com uma maior suscetibilidade ou resistência à infecção por SARS-CoV-2, e também não foi possível concluir acerca do desenvolvimento da resposta imunitária dos participantes. Isto deveu-se principalmente ao baixo número de indivíduos em alguns grupos, uma vez que não incluía muitos participantes com diagnóstico prévio de COVID-19, nem muitos casos de participantes que tivessem desenvolvido sintomas graves da doença. Com o método de sequenciação utilizado (método de Sanger), apenas foi possível a identificação dos polimorfismos presentes em regiões dos genes *TLR3* e *TLR7*. A sequenciação do genoma completo, utilizando sistemas de *next generation sequencing* (NGS), permitiria a identificação de mais alterações podendo algumas delas já estar associadas a uma maior suscetibilidade à infecção por SARS-CoV-2.

Como trabalho futuro, seria importante incluir mais participantes com diagnóstico prévio de infecção que tenham apresentado sintomas graves da doença, sequenciar mais fragmentos dos genes *TLR*, ou optar por sequenciar todo o genoma e obter mais dados que poderão ser importantes na resposta do hospedeiro à infecção viral, e avaliar o desenvolvimento da resposta imunitária dos novos participantes, incluindo população vacinada.

Conclusão

A pandemia da COVID-19 fez-nos repensar a forma como vivemos e como nos relacionamos com os outros, tendo grande impacto a nível mundial. Apesar de já se saber que diversos fatores como a idade, o género, e a presença de outras comorbilidades estão associados a uma maior suscetibilidade dos indivíduos à infeção, esta doença é muito complexa e o seu impacto no paciente é ainda incerto. O desenvolvimento da doença está muito relacionado com a interação do SARS-CoV-2 com o sistema imune do hospedeiro, e a este nível são os fatores genéticos que podem diferenciar os doentes. Os TLR, ao fazerem o reconhecimento intracelular do vírus e desencadeando a resposta imune do hospedeiro, estão envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos da infeção por SARS-CoV-2.

Identificando polimorfismo genéticos nos genes de TLR, e associando-os a uma maior suscetibilidade ou, por outro lado, a uma maior resistência à infeção por SARS-CoV-2 ou por outros vírus, é possível estratificar indivíduos, identificar populações com maior risco, e assim prever zonas de possíveis focos de doença. Esta identificação é útil não só para a pandemia da COVID-19 mas também para futuras doenças, permitindo um maior controlo da sua propagação, e uma gestão mais eficiente dos recursos disponíveis.

Bibliografia

1. Shah, V.K., et al., Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons From the Past. *Frontiers in Immunology*, 2020. 11: 1949
2. Sun, B., et al., Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerging Microbes & Infections*, 2020. 9: 940-948
3. Lei, Q., Li, Y., Hou, H-Y., et al., Antibody dynamics to SARS-CoV-2 in asymptomatic COVID-19 Infections. *Allergy*, 2021. 76(2): 551-561
4. Rezaei, M., et al., Immune cell profiling and antibody responses in patients with COVID-19. *BMC Infectious Diseases*, 2021. 21: 646
5. Chang, S.E., et al., New-onset IgG autoantibodies in hospitalized patients with COVID-19. *Nature Communications*, 2021. 12: 5417
6. Karaderi, T., et al., Host Genetics at the Intersection of Autoimmunity and COVID-19: A Potential Key for Heterogeneous COVID-19 Severity. *Frontiers in Immunology*, 2020. 11: 3314
7. Lotfi, M., et al., COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities. *Clinica Chimica Acta*, 2020. 508: 254-66
8. Liu, Y., et al., Aerodynamic Characteristics and RNA Concentration of SARS-CoV-2 Aerosol in Wuhan Hospitals during COVID-19 Outbreak. *bioRxiv*, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.03.08.982637>
9. Agrawal, H., et al., An Assessment on Impact of COVID-19 Infection in a Gender Specific Manner. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2021. 17(1): 94-112
10. Fricke-Galindo, I., et al., Genetics Insight for COVID-19 Susceptibility and Severity: A Review. *Frontiers in Immunology*, 2021. 12: 1057
11. Brodin, P., Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity. *Nature Medicine*, 2021. 27: 28-33
12. Anastassopoulou, C., et al., Human genetic factors associated with susceptibility to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease severity. *Human Genomics*, 2020. 14: 40
13. Costa, K., et al., Olfactory and taste disorders in COVID-19: a systematic review. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 2020. 86(6): 781-792
14. Mathew, D., et al., Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*, 2020. 369(6508): eabc8511

15. Isho, B., et al., Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. *Science Immunology*, 2020. 5(52): eabe5511
16. Gemmati, D., et al., COVID-19 and Individual Genetic Susceptibility/Receptivity: Role of ACE1/ACE2 Genes, Immunity, Inflammation and Coagulation. Might the Double X-chromosome in Females Be Protective against SARS-CoV-2 Compared to the Single X-Chromosome in Males?. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. 21(10): 3474
17. Gudbjartsson, D.F., et al., Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *The New England Journal of Medicine*, 2020. 383: 1724-1734
18. Greabu, M., et al., Saliva - a diagnostic window to the body, both in health and in disease. *Journal of Medicine and Life*, 2009. 2(2): 124-132
19. Kaczor-Urbanowicz, K.E., et al., Saliva diagnostics – Current views and directions. *Experimental Biology and Medicine*, 2017. 242: 459-472
20. Nemoda, Z., et al., Assessing genetic polymorphisms using DNA extracted from cells present in saliva samples. *BMC Medical Research Methodology*, 2011. 11: 170
21. Rosa, N., et al., Protein Quality Assessment on Saliva Samples for Biobanking Purposes. *Biopreservation and Biobanking*, 2016. 14(4): 289-297
22. World Health Organization, Coronavirus disease (Covid-19). Available from: https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_3
23. Oran, D.P. and Topol, E.J., The Proportion of SARS-CoV-2 Infections That Are Asymptomatic: A Systematic Review. *Annals of Internal Medicine*, 2021. 174(5): 655-662
24. van der Made, C.I., et al., Presence of Genetic Variants Among Young Men With Severe COVID-19. *JAMA*, 2020. 324(7): 663-673
25. Lim, H.K., et al., TLR3 deficiency in herpes simplex encephalitis: High allelic heterogeneity and recurrence risk. *Neurology*, 2014. 83(21): 1888-1897
26. El-Bendary, M., et al., The association of single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor 3, Toll-like receptor 7 and Toll-like receptor 8 genes with the susceptibility to HCV infection. *British Journal of Biomedical Science*, 2018. 75(4): 175-181
27. Al-Qahtani, A., et al., Toll-Like Receptor 3 Polymorphism and Its Association With Hepatitis B Virus Infection in Saudi Arabian Patients. *Journal of Medical Virology*, 2012. 84: 1353-1359

28. Al-Anazi, M.R., Association of Toll-Like Receptor 3 Single-Nucleotide Polymorphisms and Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Immunology Research*, 2017. 2017
29. Clohisey, S. and Baillie, J.K., Host susceptibility to severe influenza A virus infection. *Critical Care*, 2019. 23: 303
30. Esposito, S., et al., Toll-like receptor 3 gene polymorphisms and severity of pandemic A/H1N1/2009 influenza in otherwise healthy children. *Virology Journal*, 2012. 9: 270
31. Mhandire, D.Z., et al., Genetic variation in toll like receptors 2, 7, 9 and interleukin-6 is associated with cytomegalovirus infection in late pregnancy. *BMC Medical Genetics*, 2020. 21: 113
32. Baynes, J.W. and Dominiczak, M.H., *Medical Biochemistry*. 4ed. Elsevier, 2014
33. Buschow, S.I., et al., TLR7 polymorphism, sex and chronic HBV infection influence plasmacytoid DC maturation by TLR7 ligands. *Antiviral Research*, 2018. 157: 27-37

Anexos

Anexo 1: Consentimento informado



CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Proteger+

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

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

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

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

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



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

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

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

Ao(à) participante são garantidos confidencialidade e anonimato.

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

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

ASSINATURA

Nome do profissional responsável pela recolha: _____

Contacto Institucional: _____

Data: __/__/____



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

ASSINATURA

(nome completo do participante)

Anexo 2: Questionário para recolha de dados do participante



Projeto Proteger +

Anexado ao presente documento pode encontrar:

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

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

Dados do paciente

Nome completo: _____

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

ID SalivaTec: _____ Naturalidade: _____

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

Email: _____

Sexo: Masculino Feminino

Questionário no âmbito do projeto Proteger +

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

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

Se sim, responder às seguintes questões:

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

5. Atualmente apresenta algum dos seguintes sintomas?

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

6. Já foi vacinado para a COVID-19?

Sim Não

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

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

Qual o fabricante? _____

7. Tem problemas cardíacos? Sim Não

Se sim, quais? _____

8. Tem doenças respiratórias? Sim Não

Se sim, quais? _____

9. Tem diabetes? Sim Não

Se sim, indique: Tipo I Tipo II Não sei

10. Tem hipertensão? Sim Não

Anexo 3: Protocolo para colheita de amostras biológicas

Material necessário

Equipamento de proteção individual (EPI's)

- Macacão de proteção individual
- Bata descartável
- Máscara FFP2
- Touca
- viseira
- Luvas primárias
- Luvas secundárias
- Botas tapa pés descartáveis

Material de higienização

- Borrifador com álcool a 70%
- Toalhetas desinfetantes
- Sacos de lixo adequados (risco biológico III)
- Papel absorvente

Material de colheita para amostras de saliva

- Tubo de colheita identificado
- Parafilme
- Contentor secundário (saco com fecho zip)

Material de transporte de amostras

- Caixa de transporte / contentor terciário
- Acumuladores de frio

Protocolo de utilização de EPI's em ambiente de colheita de amostras

Sequência de Vestir:

- 1° Máscara FFP2
- 2° Touca
- 3° Macacão de proteção individual
- 4° Luvas primárias
- 5° Bata descartável
- 6° Botas tapa pés descartáveis
- 7° viseira
- 8° Luvas secundárias

Sequência de Despir:

- Material a desinfetar com álcool:
- 1° viseira
- Material a colocar no saco de lixo risco biológico III:
- 2° Luvas secundárias
 - 3° Botas tapa pés descartáveis
 - 4° Bata descartável
 - 5° Toucas
 - 6° Luvas primárias
 - 7° Macacão de proteção individual
 - 8° Máscara FFP2

Procedimentos a adotar na colheita de saliva

1. Higienizar o local de colheita borrifando álcool a 70%. Limpar com papel absorvente;
2. O dador deve higienizar as mãos com toalhetas desinfetantes antes da colheita;
3. Instruir o dador acerca do procedimento de colheita;
4. Verificar a codificação da amostra no tubo;
5. Colocar as luvas secundárias e dar o tubo ao dador;
6. Após a colheita, colocar parafilme para vedar a tampa;
7. Desinfetar o tubo de colheita com toalhetas desinfetantes;
8. Colocar o tubo num saco de proteção / contentor secundário, devidamente codificado, e armazenar na caixa de transporte de amostras
9. Remover as luvas secundárias, descartar e borrifar álcool nas luvas primárias;
10. Colocar novas luvas secundárias entre colheitas.

Anexo 4: Protocolo de extração de DNA com tampão STE

1. Adicionar 50µL Proteinase K a 500µL de saliva;
2. Vórtex e incubar a 56°C durante 30 minutos;
3. Adicionar 500µL de tampão de extração;

Tampão de extração:

- 100µL tampão STE [10x] (G-Biosciences, Geno Technology Inc., USA)
 - 900µL água destilada
 - 10µL Triton® X-100, EssentQ® (Scharlab,S.L.)
4. Vórtex e incubar a 100°C durante 10 minutos;
 5. Centrifugar a 10°C durante 15 minutos a 16000 x g;
 6. Descartar o *pellet*;
 7. Precipitar com 1mL de isopropanol e guardar a -20°C durante 3 horas;
 8. Centrifugar a 10°C durante 10 minutos a 20800 x g;
 9. Descartar o sobrenadante;
 10. Lavar o precipitado com 1mL de etanol 70%;
 11. Centrifugar a 10°C durante 5 minutos a 20800 x g;
 12. Remover o etanol e deixar secar ao ar;
 13. Ressuspender em 20µL de água para biologia molecular (NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes).

Anexo 5: Protocolo de extração de DNA com E.Z.N.A.® Forensic DNA Kit (Omega Bio-tek, Inc)

1. Diluir 250µL de saliva com 1mL de PBS e vórtex;
2. Centrifugar durante 5 minutos a 2000 x g e descartar o sobrenadante;
3. Ressuspender o *pellet* em 180µL de PBS;
4. Adicionar 25µL de solução OB Protease;
5. Adicionar 200µL de tampão BL e vórtex durante 30 segundos;
6. Incubar a 60°C durante 15 minutos;
7. Centrifugar durante 1 minuto a 20800 x g;
8. Adicionar 200µL de etanol 100% e vórtex;
9. Transferir tudo para uma coluna HiBind® DNA colocada num tubo de colheita de 2mL e centrifugar durante 1 minuto a 20800 x g;
10. Descartar o tubo de colheita e colocar a coluna num novo tubo;
11. Adicionar 500µL de tampão HBC e centrifugar durante 1 minuto a 20800 x g;
12. Descartar o tubo de colheita e colocar a coluna num novo tubo;
13. Adicionar 700µL de tampão DNA Wash e centrifugar durante 1 minuto a 20800 x g;
14. Descartar o fluído do tubo de colheita;
15. Adicionar 700µL de tampão DNA Wash e centrifugar durante 1 minuto a 20800 x g;
16. Descartar o fluído do tubo de colheita;
17. Centrifugar durante 2 minuto a 20800 x g;
18. Descartar o tubo de colheita e colocar a coluna num tubo de microcentrífuga de 1,5mL;
19. Adicionar 100µL de água para biologia molecular (NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes) a 70°C e deixar 3 minutos à temperatura ambiente;
20. Centrifugar durante 1 minuto a 20800 x g;
21. Adicionar 100µL de água para biologia molecular (NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes) a 70°C e deixar 3 minutos à temperatura ambiente;
22. Centrifugar durante 1 minuto a 20800 x g.

Anexo 6: Protocolo de extração de DNA com NZY Tissue gDNA Isolation kit (NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes)

1. A 180 μ L de saliva, adicionar 180 μ L de buffer NT1 e 25 μ L de proteinase K;
2. Vórtex durante 30 segundos e incubar a 56°C durante 1 hora;
3. Vórtex durante 30 segundos, adicionar 200 μ L de buffer NL e vórtex durante 10 segundos;
4. Adicionar 210 μ L de etanol a 100% e vórtex;
5. Transferir tudo para uma coluna NZYSpin Tissue colocada num tubo de colheita de 2mL e centrifugar durante 1 minuto a 12000 x g;
6. Descartar o tubo de colheita e colocar a coluna num novo tubo;
7. Adicionar 500 μ L de buffer NW1 e centrifugar durante 1 minuto a 12000 x g;
8. Descartar o fluído do tubo de colheita;
9. Adicionar 600 μ L de buffer NW2 e centrifugar durante 1 minuto a 12000 x g;
10. Descartar o fluído do tubo de colheita e centrifugar novamente durante 1 minuto a 12000 x g;
11. Descartar o tubo de colheita e colocar a coluna num tubo de microcentrífuga de 1,5mL;
12. Adicionar 100 μ L de água para biologia molecular (NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes) a 70°C e deixar 1 minuto à temperatura ambiente;
13. Centrifugar durante 2 minutos a 12000 x g.

Anexo 7: Protocolo de quantificação de IgG anti-nucleocápside com EDI™ COVID-19 Nucleocapsid IgG Quantitative ELISA Kit (Epitope Diagnostics, Inc.)

1. Centrifugar a 4°C durante 10 minutos a 10000 x g, 100µL de saliva com 1% de Triton® X-100, EssentQ® (Scharlab,S.L.);
2. Descartar o *pellet*;
3. Adicionar, aos respetivos poços da placa, 20µL dos calibradores, dos controlos e das amostras;
4. Adicionar 100µL de diluente de amostra a todos os poços, agitar levemente a placa, cobrir com um selador de placa e papel de alumínio, e incubar à temperatura ambiente durante 30 minutos;
5. Remover o conteúdo de todos os poços;
6. Lavar todos os poços com 300µL de solução de lavagem e descartar, repetir a lavagem 5 vezes;
7. Adicionar 100µL de HRP labeled Anti-hIgG Tracer Antibody a todos os poços, agitar levemente a placa, cobrir com um selador de placa e papel de alumínio, e incubar à temperatura ambiente durante 30 minutos;
8. Remover o conteúdo de todos os poços;
9. Lavar todos os poços com 300µL de solução de lavagem e descartar, repetir a lavagem 5 vezes;
10. Adicionar 100µL de substrato a todos os poços; agitar levemente a placa, cobrir com um selador de placa e papel de alumínio, e incubar à temperatura ambiente durante 20 minutos;
11. Adicionar 100µL de solução stop a todos os poços e agitar levemente a placa;
12. Ler a absorvância a 450nm no espaço de 10 minutos.