ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE ABO E RISCO DE INFEÇÃO E SEVERIDADE DA COVID-19: ESTUDO EM PROFISSIONAIS DE SAÚDE DA ULSNE

Ana Amorim Silva

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e ao Instituto Politécnico da Guarda para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde – Ramo Biotecnologia

Orientado por:

Professora Doutora Carina de Fátima Rodrigues

Professora Doutora Josiana Adelaide Vaz

Bragança, 2023

Trabalho financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) e por fundos nacionais - Projetos de Investigação Científica e Desenvolvimento Tecnológico (IC&DT: Programa Testar com Ciência e Solidariedade), no âmbito do projeto "NORDTEST – Infeção por coronavírus SARS-CoV-2 no Nordeste de Portugal: desenvolvendo conhecimentos e ferramentas para uma melhor gestão da doença (NORTE-01-0145-FEDER-072562)". Este trabalho foi efetuado em colaboração Unidade Local de Saúde do Nordeste de Bragança (ULSNE) bem como, com o Centro de Investigação de Montanha (CIMO).

AGRADECIMENTOS

Embora uma tese seja um trabalho individual, pela sua finalidade académica, há fatores de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser destacados. Assim sendo, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Professora Doutora Carina de Fátima Rodrigues, minha orientadora, pela sua admirável capacidade de trabalho, organização, profissionalismo e rigor. Agradecer ainda a competência científica e acompanhamento do trabalho, pela disponibilidade e generosidade reveladas ao longo deste ano, bem como as críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante toda a orientação.

À Professora Doutora Josiana Adelaide Vaz, minha co-orientadora, agradeço profundamente o empenho, dedicação, apoio, disponibilidade, competência científica e conhecimentos transmitidos..

À minha colega Maria João Caldeira, que esteve sempre comigo no laboratório, pelo incansável apoio e motivação, pelas dicas e incansável ajuda, que sem ela este trabalho não teria sido possível.

Ainda, porque não há palavras que cheguem, um eterno obrigado aos meus pais, Amélia Amorim e Rui Miguel Silva, pela incansável ajuda, por todo o amor e apoio transmitido desde sempre.

Aos meus avós, pelo carinho, cuidado e motivação transmitida ao longo deste percurso, que de alguma forma, ajudaram também à realização desta tese.

Finalmente, mas não menos importante a todos os restantes amigos e familiares que estiveram presentes durante esta caminhada, por todo o apoio e confiança que me foi dado para que conseguisse acabar este percurso académico da melhor maneira.

DECLARAÇÕES

É autorizada a reprodução integral desta dissertação/tese apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete. Ao abrigo do artigo 8º do decreto-lei nº 388/70, declara-se que fazem parte integrante desta dissertação os seguintes trabalhos já publicados ou em publicação:

Poster em Congressos:

Mª João Caldeira; Tifany Pereira; Ana Amorim; Josiana Vaz; Mª José Montanha; Ângela Rodrigues; Viviane Gonçalves; Carina Rodrigues. Grupo ABO: predisposição para a infeção por SARS-CoV-2 e doença grave. Poster (2022-138) apresentado no 7º encontro de Jovens Investigadores, realizado em Bragança de 22 a 24 de novembro de 2022.

Ana Amorim; Mª João Caldeira; Tifany Pereira; Josiana Vaz; Carina Rodrigues. Alelos de grupo sanguíneo do Sistema ABO e suscetibilidade para a doença COVID-19: Revisão Sistemática. Poster (2023-81) apresentado no 1º Congresso da BiomedLab, realizado na Alfândega do Porto de 10 a 12 de março de 2023.

Resumos em livros de conferência:

Ana Amorim; Mª João Caldeira; Tifany Pereira; Josiana Vaz; Carina Rodrigues. Trends in Biomedical Laboratory Sciences, 2023, Volume 1, N. º1, Supplement, pag 1-98. I Congresso BiomedLab (Associação Portuguesa de Ciências Biomédicas Laboratoriais), Poster: 81. Alelos de grupo sanguíneo do Sistema ABO e suscetibilidade para a doença COVID-19: Revisão Sistemática.

RESUMO

Estudos epidemiológicos têm sido realizados com o propósito de compreender as diferentes suscetibilidades à infeção e manifestações da doença pelo novo coronavírus. A sintomatologia pode variar desde os assintomáticos até casos mais graves de pneumonia que podem resultar em morte. Estudos de associação entre os grupos sanguíneos do sistema ABO e o risco e severidade da COVID-19 têm vindo a corroborar o facto da presença do grupo sanguíneo O conferir menor suscetibilidade, enquanto a presença do grupo A confere maior suscetibilidade à infeção. Contudo, há estudos com resultados contraditórios onde a mesma associação não foi observada. Está estabelecido que determinados grupos do sistema ABO está associado a um maior risco para várias doenças infeciosas, incluindo hepatite B e dengue hemorrágico. Os mecanismos que podem explicar esta associação não estão totalmente esclarecidos, carecendo de investigação mais aprofundada. Com este trabalho pretendeu-se contribuir para elucidar esta possível associação entre o genótipo ABO e o risco de infeção e severidade da doença COVID-19 na população portuguesa, bem como, estabelecer frequências genótipicas do gene ABO. Foi selecionada, aleatoriamente, uma amostra de conveniência de profissionais de saúde da ULSNE. Para a análise molecular do gene ABO foram sequenciadas as regiões dos exões 6 e 7 do gene ABO, pelo método de *Sanger*.

Os resultados obtidos evidenciam a presença de polimorfismos que definem novas classes genotípicas, sendo o A101/O01 e A101/O02 os mais frequentes e A102/B101 e o O02/O03 os menos frequentes. Na análise dos resultados de associação do fenótipo e genótipo com a presença de infeção e a severidade da doença COVID-19, apontou para um risco de infeção para indivíduos do grupo O em relação ao grupo A (OR= 2.545: 1.216-5.327). A análise de regressão binária, incluindo outros preditores, revelou um resultado diferente, o risco de infeção maior para indivíduos do grupo A e menor para o grupo O (A vs não-A OR= 1.998: 1.007-3.965; O vs não-O OR= 0.366:0.177-0.759). Não foi observada associações entre o grupo sanguíneo e a severidade da doença.

Palavras-chave: coronavírus-19, SARS-CoV-2, suscetibilidade, grupo sanguíneo ABO, genética

ABSTRAT

Epidemiological studies have been carried out with the purpose of understanding the different susceptibilities to infection and manifestations of the disease by the new coronavirus. Symptoms can range from asymptomatic to more severe cases of pneumonia that can result in death. Studies of the association between the blood groups of the ABO system and the risk and severity of COVID-19 have corroborated the fact that the presence of blood group O confers lower susceptibility, while the presence of group A confers greater susceptibility to infection. However, there are studies with contradictory results where the same association was not observed. It is established that certain groups of the ABO system are associated with an increased risk for several infectious diseases, including hepatitis B and dengue hemorrhagic fever. The mechanisms that may explain this association are not fully understood and require further investigation. The aim of this work was to contribute to elucidate this possible association between the ABO genotype and the risk of infection and severity of COVID-19 disease in the Portuguese population, as well as to establish genotypic frequencies of the ABO gene. A convenience sample of ULSNE health professionals was randomly selected. For the molecular analysis of the ABO gene, the regions of exons 6 and 7 of the ABO gene were sequenced using the Sanger method.

The results show the presence of polymorphisms that define new genotypic classes, with A101/O01 and A101/O02 being the most frequent and A102/B101 and O02/O03 being the least frequent. In the analysis of the results of the association of phenotype and genotype with the presence of infection and the severity of the COVID-19 disease, it pointed to a risk of infection for individuals in group O compared to group A (OR= 2.545: 1.216-5.327). Binary regression analysis, including other predictors, revealed a different result, the risk of infection higher for individuals in group A and lower for group O (A vs non-A OR= 1.998: 1.007-3.965; O vs non-O OR= 0.366:0.177-0.759). No associations were observed between blood group and disease severity.

Key Words: coronavirus-19, SARS-CoV-2, susceptibility, ABO blood group, genetics

ÍNDICE

INTRODUÇÃO **1**

CAPÍTULO I – ENQUADRAMENTO TEÓRICO **5**

1.1. COVID-19: A PANDEMIA DO NOVO CORONAVÍRUS, SARS-COV-2: 6

1.3. TRANSMISSÃO E SINTOMATOLOGIA DA COVID-19 9

1.4. DIAGNÓSTICO 11

1.5. RESPOSTA IMUNITÁRIA DO HOSPEDEIRO 12

1.6. FATORES AMBIENTAIS E INDIVIDUAIS QUE CONDICIONAM O RISCO E A SEVERIDADE DA COVID-19 15

1.7. O SISTEMA ABO 16

1.8. Genética do Sistema ABO e Polimorfismos *17*

1.10. GRUPO ABO E RISCO DE INFEÇÃO POR SARS-COV-2: ESTUDOS PUBLICADOS 23

..... **27**

CAPÍTULO II – OBJETIVOS **27**

CAPÍTULO III – METODOLOGIA **29**

3.1. POPULAÇÃO ALVO E DESENHO DE ESTUDO 30

3.2. SELEÇÃO DA AMOSTRA 30

3.3. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS 30

3.4. SEQUENCIAÇÃO DE *SANGER* 31

3.4.1. Extração de DNA de amostras de sangue total por Extrasol *31*

3.4.2. PCR de Amplificação de material genético *32*

3.4.4. Eletroforese em gel de Agarose *33*

3.4.5. Limpeza do produto resultante da PCR de amplificação *33*

3.4.7. Purificação do produto resultante da PCR de sequenciação *34*

3.4.8 Sequenciador – SeqStudio Genetic Analyzer *34*

3.5. ANÁLISE DE HARDY-WEINBERG 34

ANÁLISE ESTATÍSTICA 35

CAPÍTULO IV – RESULTADOS **37**

4.1. CARATERIZAÇÃO DA AMOSTRA 38

4.2 RESULTADOS DE SEQUENCIAÇÃO: GENÓTIPOS SIMPLES E GENÓTIPO DE MÚLTIPLOS ALELOS ... 39

4.3. FREQUÊNCIA ALÉLICA DO GRUPO SANGUÍNEO DO SISTEMA ABO E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG 44

4.4. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS ABO E O RISCO E SEVERIDADE DA INFEÇÃO .. 46

CAPÍTULO V – DISCUSSÃO **51**

CAPÍTULO VI – CONCLUSÃO E PERPETIVAS FUTURAS **61**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... **LXIV**

ANEXOS ..... **LXXXV**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Fenótipos e Genótipos do Sistema de Grupo Sanguíneo ABO. 18

Tabela 2: Oligonucleótídeos utilizados na amplificação das regiões génicas de interesse. 32

Tabela 3: Características sociodemográficas da população em estudo. 38

Tabela 4: Frequências dos fenótipos e genótipos por género. 40

Tabela 5: Comparação com as frequências dos grupos ABO com dados publicados e em várias populações. 44

Tabela 6: Resultados para as frequências génicas e avaliação do equilíbrio de Hardy e Weinberg obtidos a partir do fenótipo. 45

Tabela 7: Frequências génicas obtidas a partir dos genótipos simples. Valores obtidos e esperados. 46

Tabela 8: Análise de associação entre a presença de infeção, severidade da COVID-19 e os grupos sanguíneos ABO. 47

Tabela 9: Análise da associação do grupo ABO com o risco de infeção por regressão binária. 49

Tabela 10: Análise da associação do grupo ABO com a severidade da COVID-19 por regressão binária. 50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação das proteínas estruturais e RNA do SARS-CoV-2. 7

Figura 2: Mecanismos de entrada viral do SARS-CoV-2. 9

Figura 3: Representação da Zoonose do SARS-COV-2. 9

Figura 4: Vias de transmissão de SARS-COV-2 de Humano para Humano. 10

Figura 5: Etapas da Imunidade Inata e Adaptativa. 13

Figura 6: Gene do ABO. 17

Figura 7: Variações nucleotídicas entre os alelos do Sistema de Grupo Sanguíneo ABO. 19

Figura 8: Genótipo O01 e posição dos nucleótidos nos exões 6 e 7 para sua determinação. 41

Figura 9: Genótipo A101 posição dos nucleótidos nos exões 6 e 7 para sua determinação. 42

Figura 10: Genótipo B101 e posição dos nucleótidos nos exões 6 e 7 para sua determinação. 43

Figura 11: Genótipo A101 e B101 (AB) e posição dos nucleótidos nos exões 6 e 7 para sua determinação. 43

ABREVIATURAS

Agência Europeia de Medicamentos	**EMA**
Coronavírus 2019	**COVID-19**
Coronavírus de Síndrome Respiratória Aguda Grave 2	**SARS-COV-2**
Domínio Recetor da Ligação	**RBD**
Fator Nuclear kappa B	**NF-kB**
Enzima Conversora de Angiotensina 1	**ACE1**
Enzima Conversora de Angiotensina 2	**ACE2**
Genome Wide Association Studies	**GWAS**
Hardy-Weinberg	**H-W**
Interferão	**IFN**
Interleucina	**IL**
Lectina de ligação a manose	**MBL**
Neutrophil extracellular traps	**NETs**
Organização Mundial de Saúde	**OMS**
Opening Reading Frames	**ORFs**
Pathogen-associated molecular patterns	**PAMPs**
Pattern Recognition Receptors	**PRRs**
Polymerase Chain Reaction	**PCR**
Toll Like Receptor	**TLR**
Células T Helper	**Th1**
Células T Helper Foliculares	**Tfh**
Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	**RT-PCR**
Single Nucleotide Polymorphism	**SNPs**

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A pandemia causada pela doença coronavírus-19 (COVID-19) teve um grande impacto a nível da Saúde Pública mundial, com milhões de casos fatais (Assefa et al., 2022). Esta doença é caracterizada por uma sintomatologia diversa, entre sintomas ligeiros, moderados e severos, que varia de indivíduo para indivíduo, e também pode manifestar-se de forma assintomática em alguns indivíduos (Goel et al., 2021). A idade, género, etnicidade, a genética e a presença de certas doenças, como por exemplo diabetes *melitos* tipo II e doenças cardiovasculares, estão normalmente associadas ao aumento do risco de infeção e severidade da doença (Velavan et al., 2021). A identificação de diferentes suscetibilidades é de grande importância na gestão da doença e priorização dos indivíduos mais vulneráveis.

Estudos genéticos, incluindo estudos de associação genética (GWAS) e análises funcionais, têm fornecido novas perspetivas sobre os genes do hospedeiro que desempenham um papel na suscetibilidade e gravidade da doença COVID-19 (Ellinghaus D. et al., 2020). Os genes que aparecem na maior parte das vezes associados, são genes que regulam a resposta imunitária e muitas vezes recetores que se expressam no tecido pulmonar. Um exemplo deste último é o gene ACE2 (enzima conversora de angiotensina 2), capaz de influenciar a capacidade de o vírus entrar nas células do trato respiratório (Hoffmann et al., 2020). Nos estudos GWAS, o *locus* do gene ABO aparece sucessivamente associado a um maior risco de infeção e severidade da COVID-19 (Ellinghaus D. et al., 2020), contudo, o mecanismo pelo qual ele pode influenciar o risco e gravidade da doença ainda não são consensuais. A maior parte dos estudos epidemiológicos corrobora o facto de o grupo sanguíneo A apresentar uma maior suscetibilidade à infeção, enquanto o grupo O confere uma menor suscestibilidade (Shibeeb & Khan, 2022). Apesar de vários estudos já comprovarem esta associação, outros revelaram resultados contraditórios, em que o grupo B, por exemplo, aparenta ser o grupo com uma maior suscetibilidade (Wang et al., 2021).

Ao longo das últimas décadas, a presença de um determinado grupo ABO vem sendo associado a risco de várias doenças (Abegaz, 2021), sendo que, durante a pandemia COVID-19 a pesquisa sobre esta associação aumentou em grande número.

O gene ABO localiza-se no cromossoma 9, e é o responsável pela codificação das glicotransferases que conferem aos indivíduos diferentes fenótipos ou grupos sanguíneos. O locus do gene ABO é composto por 7 exões, sendo que os exões 6 e 7 contêm o maior número de pares de bases responsáveis pela codificação das glicotransferases (Seltsam et al., 2003). Várias mutações pontuais foram descritas no gene ABO. Estas pode alterar a função dos aminoácidos e transformar a glicotransferase A em B. Uma deleção a nível do exão 6, na posição 261, leva a uma perda da atividade enzimática que é comum do grupo O (Carvalho et al., 2010).

Este estudo teve como objetivo investigar a possível associação entre o grupo sanguíneo ABO e a suscetibilidade à infeção e severidade da COVID-19, numa amostra de profissionais de saúde. Através da genotipagem por sequenciação dos exões 6 e 7, pretendeu-se identificar potenciais marcadores genéticos potencialmente relacionados a um maior risco de infeção ou sintomas mais graves da doença.

Ao contrário da maioria dos estudos que analisam a associação do grupo ABO ao nível fenotípico, a mais-valia deste estudo reside no facto de a associação ser analisada ao nível do genótipo. Ao examinar o genótipo, podemos inclusive inferir sobre os mecanismos genéticos subjacentes que influenciam a associação entre o grupo sanguíneo ABO e a suscetibilidade e gravidade da COVID-19.

Este trabalho foi realizado no Laboratório do Centro de Investigação de Montanha (CIMO), em colaboração com os profissionais de saúde da Unidade Local de Saúde do Nordeste (ULSNE) que nos permitiram, por consentimento informado, a utilização das suas amostras e dados pessoais para a concretização do estudo. Insere-se numa das atividades desenvolvidas do projeto NORDTESTE-COVID19 (NORTE-01-0145-FEDER-072562).

Esta dissertação é apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança (IPB) e ao Instituto Politécnico da Guarda (IPG), no âmbito da unidade curricular Projeto/Estágio/Dissertação, que corresponde ao segundo ano do Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde – Ramo de Biotecnologia.

CAPÍTULO I – ENQUADRAMENTO TEÓRICO

1.1. COVID-19: A pandemia do novo Coronavírus, SARS-COV-2:

A COVID-19 é uma doença infeciosa muito contagiosa causada pelo coronavírus de síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-COV-2), e foi declarada como pandemia, pela OMS, em março de 2020. Os primeiros casos reportados tiveram origem em Wuhan, cidade da província de Hubei na China, em 2019 e espalhando-se por todo o mundo (Rahman et al., 2021).

O SARS-COV-2 pertence à família dos *Coronaviridae*, sendo os responsáveis por infeções respiratórias em mamíferos, como, por exemplo, os morcegos, camelos e seres humanos, tratando-se de uma transmissão zoonótica (Sharma et al., 2021a). Nos primeiros casos de infeção vários doentes foram admitidos no hospital com pneumonia de etiologia desconhecida. Estes casos foram aumentando progressivamente, até que a 11 de março de 2020 a OMS declarou a presença deste novo vírus em 114 países (Ochani et al., 2021), chegando a afetar todo o mundo. A 31 de março de 2020 foram declarados 750 890 casos confirmados e 36 405 mortes (World Health Organization, 2020a), chegando a atingir no final de 2020 79.2 milhões de casos e mais de 1.7 milhões de mortes (World Health Organization, 2020b). Pela sua alta capacidade transmissão, falta de conhecimento da doença e pouca capacidade de diagnóstico, os casos de COVID-19 aumentaram muito rapidamente, sendo a sua taxa de mortalidade superior aos casos de gripe (Rahman et al., 2021).

Em Portugal, foram confirmados os primeiros 4 casos a 3 de março de 2020 (Direção Geral de Saúde, 2020a). O Estado de Emergência foi implementado a 18 de março de 2020, de acordo o Decreto do Presidente da República n.º 14-A/2020, com o intuito de mitigar a propagação e minimizar os casos de infeção, para uma diminuição dos internamentos e número de óbitos por COVID-19 (Assembleia da República Portuguesa, 2020). Já no final de 2020 estavam confirmados mais de 400 mil casos e por volta de 7 mil óbitos (Direção Geral de Saúde, 2020b).

1.2. Morfologia do Vírus e Mecanismos de Infeção

Os coronavírus são vírus envelopados, que podem apresentar uma forma circular, oval ou pleomórfica (Maniruzzaman et al., 2022). O vírus SARS-COV-2 faz parte da família dos coronavírus que podem ser subdivididos em quatro gerações, pertencendo este à geração beta (β), a única conhecida por causar infeções em humanos. São constituídos por RNA de cadeia simples de senso positivo (Shibeeb & Khan, 2022). Este distingue-se dos outros coronavírus por apresentar na sua superfície projeções espiculares claviformes, que se assemelham a uma coroa solar, origem do nome 'coronavírus' (Maniruzzaman et al., 2022).

Em geral o SARS-COV-2 apresenta quatro proteínas estruturais essenciais para a sua replicação, nomeadamente, *Spike* (S), Envelope (E), Matriz (M) e Nucleocapsideo (N) (Shibeeb & Khan, 2022), representadas na Figura 1.

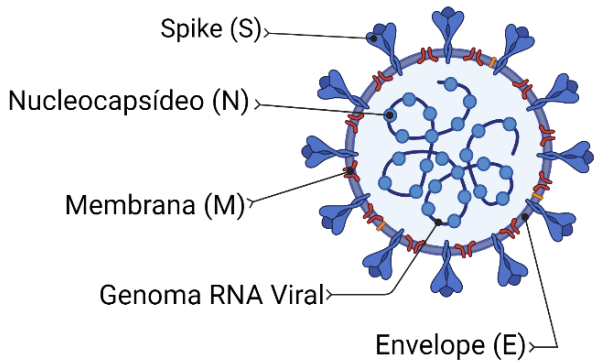


Figura 1: Representação das proteínas estruturais e RNA do SARS-CoV-2.

Adaptado de "SARS-CoV-2", por BioRender.com (2023). Retirado de https://app.biorender.com/biorender-templates

O RNA genómico do SARS-COV-2 tem aproximadamente 30 kb (*kilo bases*), sendo o maior RNA viral a ser identificado até ao momento (Borges, Suzukawa, et al., 2020). No seu genoma, para além das proteínas estruturais mencionadas em cima, este

também codifica, numa outra parte, 16 proteínas não estruturais (Zhou et al., 2022). Das proteínas não estruturais, fazem parte as *ORFs* que participam na transcrição e replicação do vírus (Borges, Suzukawa, et al., 2020).

Das proteínas estruturais, a proteína S consiste em 2 subunidades, S1 e S2. A S1 apresenta um RBD (domínio recetor da ligação), que é necessário para a ligação do vírus ao hospedeiro, mais concretamente ao recetor da ACE2. Já a S2 é necessária para a fusão do vírus com a membrana da célula hospedeira (Shibeeb & Khan, 2022). O SARS-CoV-2 entra nas células hospedeiras e quando a subunidade S1 se liga ao recetor, uma serina protease transmembranar-2 ativa o S1 e a clivagem de ACE2, atuando na subunidade S2 permitindo a sua fusão com a membrana celular (Mouffak et al., 2021). O SARS-COV-2 vai utilizar o recetor de ACE2, que conduz à *downregulation* dos recetores e ao aumento da produção de angiotensina-2 (AT2). Este aumento vai levar a um aumento da permeabilidade vascular pulmonar, podendo causar lesões pulmonares. Cerca de 83% dos recetores ACE2 são expressos na superfície das células epiteliais alveolares de tipo II, o que os torna reservatórios primários da invasão viral. Para além disso, o mau funcionamento de certos órgãos durante a infeção pode ser devido a uma grande distribuição destes recetores nos seus tecidos, incluindo coração, rim, endotélio, e intestino (Ochani et al., 2021). A proteína E, é a de menores dimensões e também está presente em menores quantidades no vírus, contudo, na célula hospedeira durante a replicação, esta proteína é abundantemente expressa e pode estar relacionada com a multiplicação e brotamento do vírus na célula (Borges, Suzukawa, et al., 2020). A proteína M é a mais abundante na superfície do vírus, e segundo autores pode ser a principal responsável pela sua forma estrutural (Maniruzzaman et al., 2022). Esta atua na multiplicação viral e determina o local de brotamento (Borges, Suzukawa, et al., 2020). A proteína N, juntamente com a proteína M estabiliza o nucleocapsideo. Esta proteína está envolvida na síntese e tradução do RNA viral, que favorece a sua replicação (Borges, Suzukawa, et al., 2020). Ao estar ligada ao RNA vai permitir que o vírus retenha as células hospedeiras e torna-las em "fábricas" virais (Maniruzzaman et al., 2022).

A clivagem proteica da proteína S pode aumentar a patogenicidade do vírus, e pequenas acumulações genéticas podem contribuir para uma diferenciação antigénica o que resulta em mutações no SARS-COV-2 (Long et al., 2022). Maior parte das mutações ocorrem a nível da proteína S, devido aos seus *spikes* que se adaptam para uma melhor atuação na ACE2 (Lorente-González et al., 2022).

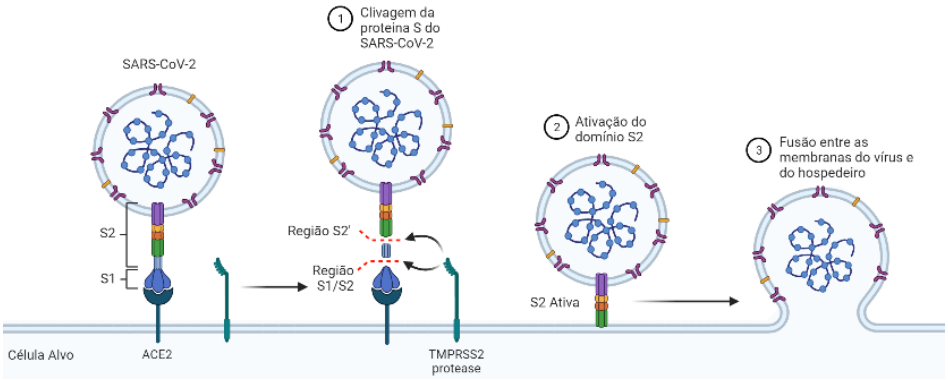


Figura 2: Mecanismos de entrada viral do SARS-CoV-2.

Adaptado de "*SARS-CoV-2 Receptor*", por BioRender.com (2023). Retirado de https://app.biorender.com/biorender-templates

1.3. Transmissão e Sintomatologia da COVID-19

A transmissão de SARS-COV-2 pode ser por duas vias, a via **animal-humano** e **humano-humano**. Foi determinado que a SARS-COV-2 proveio de uma recombinação viral entre os coronavírus dos Pangolim e dos Morcegos, que mais tarde foram transmitidos aos seres humanos (Sharma et al., 2021a).

Figura 3: Representação da Zoonose do SARS-COV-2.
(Elaborado através do *Microsoft Whiteboard*)

As transmissões de humano-humano podem ser por gotículas de aerossóis, como a tosse, espirros ou até falar. Esta transmissão pode ocorrer tanto em indivíduos sintomáticos como assintomáticos, ou até quando os indivíduos se encontram no período de incubação do vírus sem ainda apresentar sintomas (Borges, Andreia A. Suzukawa, et al., 2020; Míria Dantas Pereira et al., 2020). Os contágios a partir das superfícies contaminadas ocorrem pelo toque do indivíduo na superfície em questão e posteriormente o seu toque na boca ou olhos, já o contágio das partículas virais em suspensão ocorre por inalação (Borges, Andreia A. Suzukawa, et al., 2020).

Os meios hospitalares também podem ser considerados outra fonte de contágios, principalmente em pacientes submetidos a ventilação ou outros procedimentos que envolvam as vias aéreas (Míria Dantas Pereira et al., 2020; Sharma et al., 2021a).

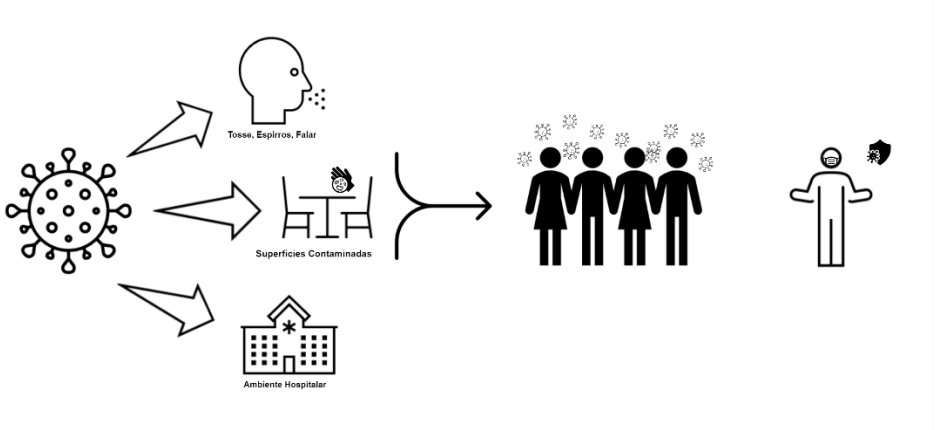


Figura 4: Vias de transmissão de SARS-COV-2 de Humano para Humano.
(Elaborado através do *Microsoft Whiteboard*)

Os indivíduos infetados por SARS-COV-2 podem apresentar sintomas muito variados, desde sintomas mais leves a mais graves, como podendo apresentar-se de forma assintomática ou levar à morte. Por norma os sintomas surgem entre 2 a 14 dias após a exposição ao vírus, sendo o período após contaminação até surgir sintomas designado como período de incubação (Míria Dantas Pereira et al., 2020).

Os sintomas mais frequentes são febre, tosse, dispneia, e os menos frequentemente a diarreia. Alterações no paladar e olfato também são sintomas mais documentados, que podem surgir durante os inícios da infeção. Para além destes sintomas mais comuns, há registos de sintomas mais "raros" como erupções cutâneas e urticária ou até manifestações neurológicas (desmaios, tonturas e AVC) (Ochani et al., 2021). Apesar de cerca de 80% dos indivíduos infetados serem assintomáticos, estes transmitem a doença (Shibeeb & Khan, 2022). As crianças são menos suscetíveis à infeção sintomática e menos propensas a estados graves (Ochani et al., 2021).

1.4. Diagnóstico

O diagnóstico do SARS-COV-2 tornou-se uma das medidas preventivas mais utilizadas para o controlo da pandemia, juntamente com o distanciamento social e isolamento, na presença ou ausência de sintomatologia associada à doença (Peeling et al., 2022). O diagnóstico precoce é um passo muito importante no controlo da propagação da doença (Sharma et al., 2021b), o que levou à grande necessidade de testagem em todo o mundo.

A testagem iniciou-se através do método de RT-PCR, considerada como o principal meio de diagnóstico da doença, que utiliza amostras do trato respiratório, como swabs nasofaríngeos, para detetar o material genético do vírus. Esta técnica oferece grande especificidade e precisão na deteção do RNA viral, mas como todas as técnicas laboratoriais, depende de vários fatores extrínsecos como, p. e. a colheita de amostra e armazenamento (Santos-Neto et al., 2021). A RT-PCR permite a avaliação da carga viral através do número de ciclos necessários ao equipamento para detetar o material genético, ou seja, quanto mais ciclos forem necessários menor é a carga viral e quanto menos ciclos necessários maior é a carga viral (Boaventura et al., 2020).

Os testes rápidos para a COVID-19 foram desenvolvidos, principalmente, por serem mais rápidos e financeiramente mais económicos do que a RT-PCR, o que era uma necessidade da população obter resultados mais rápidos e sem a utilização de qualquer

equipamento (Santos-Neto et al., 2021). Estes são menos sensíveis e menos fidedignos, pois, podem levar a falsos positivos (Zhang et al., 2022). Neste método são detetados os componentes virais do SARS-COV-2, como as proteínas S, M ou N (Yüce et al., 2021).

Os testes serológicos, são testes em que é avaliada a presença de anticorpos anti-SARS-COV-2. Este avalia a presença e a concentração de IgG e IgM no soro ou plasma do paciente de modo a perceber se está a ser capaz de combater uma infeção (Maia et al., 2022) o que torna este método uma ferramenta de rastreio e não de diagnóstico.

Para além destes três diagnósticos que são realizados em ambiente clínico, também foram desenvolvidos os autotestes para uso de um cidadão comum sem a necessidade de um profissional de saúde. Estes testes apresentam o mesmo princípio de um teste rápido de antigénio em que a pessoa pode utilizar, saliva ou swabs nasofaríngeos, obtendo um resultado rápido sem a necessidade de realizar viagens desnecessárias (Zhang et al., 2022).

Em Portugal os testes para diagnóstico disponíveis pelo SNS são os testes moleculares, como a RT-PCR; os testes de antigénio; os testes serológicos e os autotestes (Serviço Nacional de Saúde, 2022).

1.5. Resposta Imunitária do Hospedeiro

O organismo possuí vários mecanismos de defesa para com as infeções. Contudo, a resposta imunitária é complexa e envolve a interação de diversos componentes do sistema imunitário para o combate das infeções e proteção da saúde do organismo. Os principais mecanismos envolvidos na defesa podem ser a imunidade inata e a imunidade adaptativa, em que o primeiro oferece uma resposta rápida e não especifica e o segundo uma resposta lenta e específica (Netea et al., 2019).

Imunidade Inata

A imunidade inata é mediada por populações de células imunes inatas, como células mieloides, células natural killer (NK), células linfoides (mas também por células não

imunes em certas situações) e proteínas (Netea et al., 2019). De um modo geral a imunidade inata é a primeira linha de defesa por não requerer uma exposição prévia a substâncias estranhas para ser eficaz. Uma dessas respostas é a produção de anticorpos naturais em resposta a estímulos ambientais resultantes da presença de carboidratos semelhantes aos dos patógenos (Rocha et al., 2012; Uthaisangsook et al., 2002).

A imunidade inata antiviral possui vários componentes humorais, incluindo componentes do sistema complemento e do sistema de coagulação e fibrinólise, proteínas solúveis que reconhecem glicanos na superfície das células (por exemplo, lectina de ligação a manose [MBL]), *interferons* (IFN), quimiocinas e anticorpos naturalmente presentes (principalmente IgM, mas também IgA e IgG). Ela também possui diversos componentes celulares, como células *natural killer* (NK) e outras células linfoides inatas (ILCs) e células T gama delta, que geralmente limitam a propagação da infeção viral através de ações citotóxicas nas células-alvo, causando a morte das células infetadas.

Na imunidade inata as PAMPs (Padrões moleculares associados a patógenos) são reconhecidas pelos PRRs (Recetor de reconhecimento de padrões) do hospedeiro, como por exemplo os TLR (Recetores do tipo *Toll*) ou RIG-I, que levam a uma ativação da imunidade, sinalizando e induzindo a produção de citocinas antivirais. Os PRRs são capazes de reconhecer o que é próprio do não próprio, facilitando o reconhecimento das células infetadas. Os TLR conseguem reconhecer o patógeno fora da membrana e dentro, nos endossomas e lisossomas (X. Chen et al., 2018).

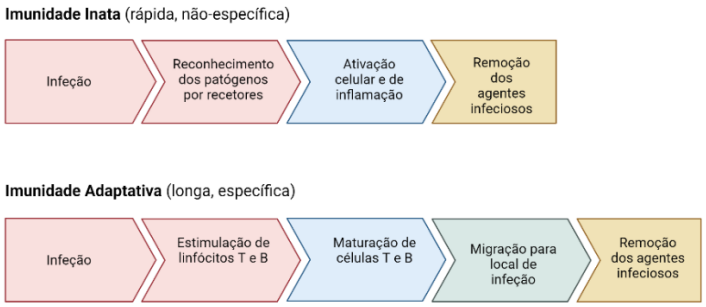


Figura 5: Etapas da Imunidade Inata e Adaptativa. Adaptado de "*Immunity*", por BioRender.com (2023). Retirado de https://app.biorender.com/biorender-templates

Imunidade Adaptativa

A imunidade adaptativa é ativada na falha da imunidade inata (Netea et al., 2019). É caracterizada pela capacidade de reconhecer e responder de forma seletiva a diferentes antigénios, produzindo anticorpos para a proteção do organismo contra as infeções, sendo que estes anticorpos são mantidos em "memória imunológica" (Bonilla & Oettgen, 2010). Esta pode ser mediada por linfócitos T, resposta celular, ou por linfócitos B, imunidade humoral.

Resposta humoral

Os linfócitos B são produzidos através de sinais das células T ou outras células, como por exemplo as dendríticas. Estes são produzidos e maturados na medula óssea até atingir a especificidade antigénica necessária para combater o corpo estranho (Bonilla & Oettgen, 2010). Os linfócitos B vão reconhecer os antigénios estranhos e produzir anticorpos de modo a ligarem-se, neutralizando-os. Após a ligação "marcam" as células infetadas para serem "destruídas" (L. Sun et al., 2020).

Resposta Celular

Os linfócitos T vão ser produzidos na medula óssea e maturados no timo (Bonilla & Oettgen, 2010). Estes linfócitos são conhecidos com CD4+ e CD8+, capazes de produzir citocinas e modular a resposta imunológica. Os CD4+ são responsáveis pela estimulação e regulação da resposta imunológica, enquanto que os CD8+ reconhecem as células infetadas e eliminam-nas (X. Chen et al., 2018).

Sistema ABO e Imunidade

O sistema de grupo sanguíneo ABO pode mediar a imunidade através de influencias ao nível das citocinas, E-selectinas e na adesão dos leucócitos às paredes vasculares, nas proteínas plasmáticas, na magnitude das respostas de células T ou outras características das respostas imunitárias (Berry et al., 2023).

Apesar da teoria de que o sistema ABO pode influenciar indiretamente a resposta imunitária adaptativa, sendo esta relação um pouco complexa, é importante relembrar que o sistema ABO não está diretamente envolvido na produção de anticorpos. Devido à sua imunogenicidade, os antígenos dos grupos sanguíneos induzem respostas imunitárias após transfusões incompatíveis, durante a gravidez ou após transplantes. Os antígenos dos grupos sanguíneos e seus anticorpos específicos são componentes importantes do sistema imunológico, mas não são fundamentais para o seu funcionamento como um todo (De Mattos & Moreira, 2004).

1.6. Fatores ambientais e individuais que condicionam o risco e a severidade da COVID-19

Para além das vias de transmissão descritas em cima que podem disseminar o vírus SARS-COV-2, há vários fatores de risco podem estar associados a uma maior severidade da doença COVID-19. Segundo vários estudos realizados, há uma predominância de casos mais graves na população de idades mais avançadas, pois o sistema imunológico encontra-se mais enfraquecido (Y. Chen et al., 2021); os homens também tem apresentado uma maior severidade; a presença de comorbidades como diabetes, doenças cardiovasculares, doenças pulmonares, cancro, obesidade, doenças renais e neuromusculares (Dessie & Zewotir, 2021; Li et al., 2021; Nogueira et al., 2020; Ouchetto & Drissi Bourhanbour, 2021).

A localização geográfica e socioeconómica também tem sido alvo de estudos para perceber a sua influencia na suscetibilidade da COVID-19. A exposição a ambientes poluídos também pode ser um fator de risco, uma vez que a exposição a ambientes contaminados leva a um aumento de citocinas inflamatórias levando a uma maior severidade da doença (Fattorini & Regoli, 2020). Em zonas mais empobrecidas e com menos recursos sanitários, áreas com maior concentração populacional que limitam o cumprimento de distanciamento social, também pode notar-se um aumento de casos da doença (Nascimento et al., 2022).

Contudo, o não cumprimento das normas de segurança aplicadas pelas autoridades de saúde também é um fator contribuinte para a contração de SARS-COV-2, que, em caso de existência de fatores de risco podem implicar uma maior severidade para o indivíduo infetado.

1.7. O Sistema ABO

O sangue é um componente que apresenta várias funções essenciais para a vida do ser humano, como o controlo de temperatura e viabilidade celular. Este é constituído por três principais elementos, os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas. A principal função dos eritrócitos é realizar as trocas gasosas entre tecidos, a dos leucócitos é o combate a infeções e eliminação de corpos estranhos, e a das plaquetas é a hemóstase (Filomena & Pimenta, 2012). Para além de todos estes componentes, e outras funções importantes que o sistema apresenta, há um mais especifico e bastante importante para a comunidade cientifica, o sistema de grupos sanguíneos, onde está presente o sistema ABO.

O sistema ABO é o único sistema em que os respetivos anticorpos estão presentes no soro dos indivíduos sem a necessidade de uma exposição prévia (Duran et al., 2007). Foi descoberto no início de 1900 por Karl Landsteiner. A sua descoberta favoreceu a segurança das transfusões sanguíneas, e foi reconhecida a sua utilidade noutros tipos de estudos, como por exemplo estudos populacionais e forenses (Romanos-Sirakis & Desai, 2022).

Karl Landsteiner descobriu que alguns eritrócitos de certos indivíduos aglutinavam na presença de plasma de outros indivíduos, e ao denotar este padrões dividiu o sistema em dois, A e B. Esta aglutinação deve-se à presença de antigénios na superfície dos eritrócitos, que quando em contacto com os anticorpos presentes no plasma ligam-se provocando danos severos nos indivíduos transfundidos. Com esta observação, Landsteiner classificou os antigénios como A e B. Dependendo de qual era o expresso na superfície dos eritrócitos, começou assim a divisão dos grupos sanguíneos em grupo A e grupo B. Mais tarde, observou-se casos de aglutinação mesmo na falta de antígenos A e

B, e este grupo foi classificado como O, ou zero, e assim se descobriu o sistema ABO (Dean L., 2005b).

A presença dos antigénios A, B ou H nos eritrócitos é determinada pela hereditariedade dos alelos A, B e O (Duran et al., 2007), através da codificação de uma enzima, a glicotransferase, responsável pela conversão do antigénio H nos grupos A e B (Seltsam et al., 2003).

1.8. Genética do Sistema ABO e Polimorfismos

Fenotipicamente o sistema ABO apresenta 4 fenótipos (A, B, AB e O) que se caracterizam pelos antigénios expressos na membrana dos eritrócitos, ou seja, o grupo A exprime antigénio A, o grupo B exprime antigénio B, o grupo O exprime antigénio H, e o grupo AB exprime antigénio A e antigénio B. O que diferencia estes grupos são as suas características bioquímicas, em que indivíduos do grupo A apresentam uma N-acetilgalactosamina, indivíduos do grupo B uma galactose, indivíduos do grupo AB apresentam ambas e os do grupo O não apresentam nenhum destes açucares na sua estrutura. Cada alelo do sistema ABO codifica o seu açúcar correspondente, os grupos A e B são codominantes enquanto o grupo O é recessivo (Fung et al., 2014).

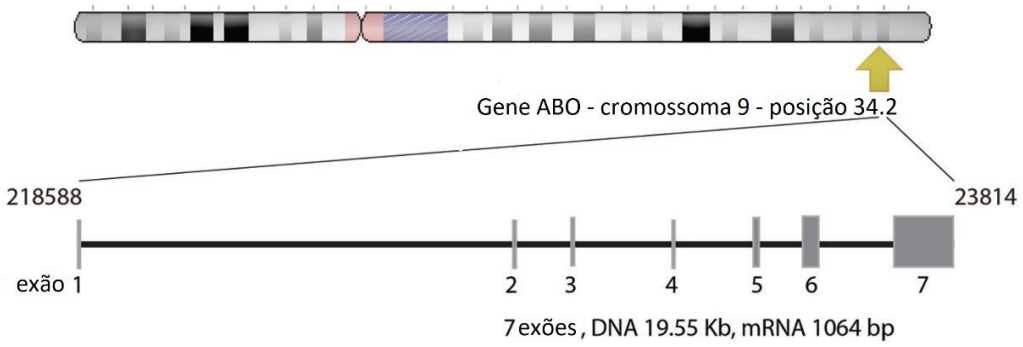


Figura 6: Gene do ABO. Adaptado de (Misevic, 2018)

O gene ABO está localizado no cromossoma 9 e apresenta sete exões. Os exões 6 e 7 do gene ABO são de particular importância, apresentam sequências de bases responsáveis pela codificação das glicosiltransferases envolvidas na expressão do antígeno do grupo sanguíneo ABO. Essas enzimas adicionam moléculas específicas de açúcar à superfície dos eritrócitos, definindo a presença dos antigénios do grupo sanguíneo A, B, AB ou O (Misevic, 2018).

Após a descoberta dos grupos sanguíneos, Bernstein, em 1924, definiu que um indivíduo recebia dois alelos, um de cada progenitor, propondo um modelo de 6 genótipos: AA; AO; BB; BO; AB e OO (Watkins, 2001) (Tabela 1). Estes alelos são codificados no locus do gene ABO do cromossoma 9, que contém na sua região 7 exões que constituem entre 18 a 20 kilobases (kb) da região. É nos exões 6 e 7 onde ocorre maior parte da codificação da glicotransferase, pelo menos 90% (Ana Carla Batissoco & Marcia Cristina Zago Novarett, 2003).

Tabela 1: Fenótipos e Genótipos do Sistema de Grupo Sanguíneo ABO (Dean L., 2005b).

Fenótipo	***Genótipo***	***Antigénios***	***Anticorpos***
A	AA AO	A	Anti-B
B	BB BO	B	Anti-A
O	OO	-	Anti-A e Anti-B
AB	AB	A e B	-

Substituições de nucleótidos nos exões podem levar a mudanças nos aminoácidos alterando atividades enzimáticas dos antigénios, ou seja, pode ocorrer variações genéticas, através de inserção, deleção ou substituições de nucleótidos que alteram a codificação do aminoácido resultando numa sequência de nucleótidos diferente (Goebel et al., 2013), caracterizando-se em polimorfismos.

Polimorfismos de nucleótido único, os SNPs são encontrados mais frequentemente no sistema ABO, caracterizam-se pela substituição de apenas um aminoácido que altera a codificação da glicotransferase (Daniels, 2005).

Por conveniência, a sequência da glicosiltransferase A é considerada como uma sequência de referência (NG_006669.1) e comparada com esta, a presença de certas variantes estabelecem os fenótipos B e O. Os exons 6 e 7 codificam a maior porção da proteína, incluindo o domínio catalítico das glicosiltransferases que medeiam a expressão dos antigénios A e B (Yamamoto et al., 1995). Foram identificadas mais de 300 variantes no gene ABO (Blumenfeld & Patnaik, 2004). A maioria das variantes do gene é caracterizada pela presença de um ou mais SNPs levando a mudanças de aminoácidos ou codões stop. Algumas variantes resultam de inserções de nucleótidos ou exclusões (INDELs) levando principalmente a uma mudança do quadro de leitura.

Atualmente já foram descritas diversas variações nos alelos, que para serem diferenciados recorre-se à analise dos exões 6 e 7, onde se encontram maior parte das alterações. *Yamamoto* (Yamamoto, 2021; Yamamoto et al., 1995) identificou as variações descritas e representadas na Figura 7.

Exon	6		7														
Nucleotide Position	261	297	467	526	646	657	681	703	771	796	802	803	829	871	930	1054	1060
A alleles																	
A101	G	A	C	C	T	C	G	G	C	C	G	G	G	G	G	C	C
A102	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A201	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	Δ
A301	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*
Ax01	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
B alleles																	
B101	*	G	*	G	*	T	*	A	*	A	*	C	*	*	A	*	*
B301	*	G	*	G	*	T	*	A	*	A	*	C	*	*	A	T	*
AB alleles																	
cis-AB01	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*
B(A)01	*	G	*	G	*	*	*	*	*	A	*	C	*	*	A	*	*
O alleles																	
O01	Δ	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
O02	Δ	G	*	*	A	*	A	*	T	*	*	*	A	*	*	*	*
O03	*	G	*	G	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*
Possible Amino Acid Change	Frameshift	No change	P156L	R176G	F216I	No change	No change	G235S	No change	L266M	G268R	G268A	V277M	D291N	No change	R352W	Frameshift

Figura 7: Variações nucleotídicas entre os alelos do Sistema de Grupo Sanguíneo ABO.

Adaptado de Yamamoto e colaboradores, (Yamamoto, 2021). A sequência do alelo A1 (A101) é utilizada como base de comparação entre os alelos.

Nesta imagem, é evidenciado o facto de o alelo A1 se distinguir de B (B101) pela presença sete variante: A297G, C526G, C657T, G703A, C796A, G803C e G930A, das quais apenas 4 são responsáveis pela substituição de aminoácidos. Os alelos A1v (A102) e A2 (A201) apresentam C467T, uma substituição que não altera a atividade da transferase. A diferença encontra-se numa deleção em A2 (A201), num dos três resíduos consecutivos de citosina, do nucleótido 1059 - 106, próximo ao terminal carboxilo. Em consequência disso, são adicionados à transferase A mais 21 aminoácidos, diminuindo entre 30 a 50 vezes a atividade da enzima que leva a um espetro limitado de substrato acetor. Os A que variam a sequência de nucleótidos em diferentes posições são A3 (A301) G871A e Ax (Ax01) T646A; O alelo B3 (B301) difere do alelo B1 (B101) por uma mutação C1054T;O alelo O1 (O01), é o primeiro alelo O descrito que difere do alelo A1 em apenas uma posição: deleção de uma guanina no nucleótido 261 do exão 6 (criação de um codão de stop com a produção de uma transferase de apenas 117 aminoácidos-enzimaticamente inativa).

O alelo O1v (O02) tem uma deleção de uma única base no nucleótido 261, e possui outras cinco substituições de nucleótidos, A297G, T646A, G681A, C771T e G829A. No alelo O2 (O03), a deleção na posição 261 é ausente e diferencia-se do alelo A1 por três substituições de nucleótidos, A297G, C526G e G802A (perda da atividade enzimática, a alteração do aminoácido glicina pela arginina, na posição 268, está localizada na região da glicosiltransferase envolvida com a atividade enzimática). A cis-AB é uma variante rara causada por uma mutação genética onde numa única glicotransferase está presente a atividade enzimática das glicotransferases A e B (Chun et al., 2019).

Frequências génicas e genotípicas em diferentes populações

As frequências génicas populacionais do sistema de grupo ABO variam entre raças e etnias (Alzahrani et al., 2018). A sua análise é fundamental para a compreensão de

questões relacionadas com as variações genéticas entre diferentes grupos populacionais, que podem levar a melhorias nas transfusões, transplantes ou até responder a questões evolutivas, e investigação genética (Sabir et al., 2021).

O grupo O é considerado o mais comum, seguido do grupo A, grupo B e grupo AB, com uma prevalência muito menor (Idrees et al., 2022), tanto na África, Europa e Ásia (Vuhahula et al., 2023). Contudo, estima-se que nas populações de ascendência asiática, como na China e no Japão, a frequência do grupo B tende a ser relativamente maior em comparação com as populações de ascendência europeia, enquanto as frequências de A e O são menores (Franchini & Liumbruno, 2013), apesar de estudos realizados na China apresentarem uma maior prevalência do grupo O em maior parte das províncias e prevalência do grupo B em certas províncias do norte da China (Legese et al., 2021; Y. Sun et al., 2022).

Entre as populações Americanas, os Blackfoot (indígenas norte-americanos), tem uma maior frequência do grupo A (Franchini & Liumbruno, 2013). Nos Estados Unidos o grupo sanguíneo A é o mais frequente enquanto o AB foi o menos frequente. Contudo, é de elevada importância mencionar que a distribuição do grupo O é maior na população asiática e hispânica residente, com maior incidência nestes últimos (Legese et al., 2021). No Brasil o grupo sanguíneo O e A são os mais comuns, com uma maior prevalência do primeiro (Rodrigues Neves et al., 2015).

Em Portugal, um estudo realizado com a informação disponível no banco de sangue determinou que o grupo A teve uma maior percentagem, seguido do grupo O, grupo B e grupo AB. Tanto o grupo B como o AB eram pouco frequentes, havendo uma maior população do grupo A e O (Duran et al., 2007).

As diferenças nas frequências dos grupos sanguíneos podem ser atribuídas à evolução e seleção natural ao longo do tempo, juntamente com a migração e miscigenação das populações (Y. Sun et al., 2022). Além disso, fatores genéticos e ambientais podem influenciar as frequências do grupo ABO em diferentes regiões.

Do mesmo modo que as frequências génicas, as frequências genotípicas também variam dependendo da etnia. Um estudo realizado na índia determinou o genótipo OO como o mais frequente, seguido de BO, AO, AB, BB e AA (Agrawal et al., 2014). Outro realizado na Arabia Saudita também de terminou uma distribuição semelhante, OO; BO; AO; AB; AA e BB, sendo o primeiro mais frequente e o último o menos (Alzahrani et al., 2018). Na população de Kuwait foi determinada a seguinte distribuição OO > AO > BO > AB > AA > BB (Al-Bustan et al., 2002).

As frequências genotípicas mais especificas ainda não são conhecidas, contudo os genótipos A101 e A102 são os mais comuns na população caucasiana, mas o A101 é menos comum do que o A102 nas populações Orientais. Na população da província Han da China e na Coreia a distribuição de A101 e A102 é idêntica. Os alelos O01 e O02 também são os mais comuns, com o O01 ser o mais frequente entre as populações da província Han e Coreia (Zhu et al., 2010).

1.9. Grupo ABO e risco para infeções

O sistema ABO já foi relacionado com várias doenças infeciosas e não infeciosas. Acredita-se que fatores ambientais e genéticos do indivíduo afetam a patogénese da doença (Abegaz, 2021). Há evidências de que o sistema ABO pode ser capaz de influenciar a predisposição dos indivíduos a certas patologias através da sua capacidade de modular o sistema hemostático e a resposta inflamatória (Franchini & Bonfanti, 2015). Em infeções por vírus, bactérias e parasitas, diversos estudos determinam que o grupo O está associado a uma maior incidência de infeções por *Yersinia pestis* (peste); *Paramoxyvirus* (papeira) (Ewald & Sumner, 2016); *Vibrio cholerae* (cólera) (Ewald & Sumner, 2016; Franchini & Bonfanti, 2015; Harris & La Rocque, 2016); *Helico. Pylori* (Ewald & Sumner, 2016; Franchini & Bonfanti, 2015); vírus da Hepatite C (Jing et al., 2020) *Norovirus*, *Escherichia coli* e maior proteção para *Plasmodium* (Franchini & Bonfanti, 2015). O grupo A, por sua vez, está associado a uma maior incidência de vírus da varicela-zoster e *Pseudomonas aeruginosa* (Chuang et al., 2023; Ewald & Sumner, 2016);

Existem ainda estudos em que se observa que o grupo B está associado a Gonorreia; Tuberculose; *Streptococcos pneumonia*; *Escherichia coli* e *Salmonella* (Ewald & Sumner, 2016) e ainda que, pelo contrário, apresenta baixo risco de vírus da Hepatite B (Jing et al., 2020).

Também se verificou que o grupo AB está associado a maior risco de vírus da varicela-zoster; *Salmonella* (Ewald & Sumner, 2016); vírus da Dengue (Murugananthan et al., 2018); *Mycobacterium tuberculosis* (H. Chen et al., 2021) e vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Noori et al., 2022).

Acredita-se que polimorfismos no sistema ABO afete a ligação entre os microrganismos e os hospedeiros, que leva então às diferenças entre a suscetibilidade da infeção nos indivíduos (Abegaz, 2021).

1.10. Grupo ABO e risco de infeção por SARS-COV-2: Estudos publicados

Desde o inicio da pandemia tem sido realizados estudos que tentam comprovar a relação entre o sistema de grupo sanguíneo ABO e o risco de infeção (Bullerdiek et al., 2022). Estudos realizados em diversas populações tem demonstrado que indivíduos do grupo O apresentam uma menor suscetibilidade face à infeção, enquanto indivíduos do grupo A são mais suscetíveis (Enguita-Germán et al., 2022; Khder Mustafa et al., 2023; KİRİŞCİ et al., 2021; Muñiz-Diaz et al., 2021; Zhao et al., 2020).

Apesar dos estudos realizados na Europa e Ásia apresentarem uma maior suscetibilidade para com o grupo A, estudos realizados nos Estados Unidos da América (EUA) apresentam outros resultados. Diversas meta-analises foram realizadas, onde analisaram estudos de vários países e, notaram que, nos EUA indivíduos do grupo B apresentavam um maior risco de infeção, que se torna incoerente com os resultados apresentados nos outros estudos onde o grupo A foi considerado o de maior risco (Goel et al., 2021; Wang et al., 2021) e no Irão, indivíduos do grupo AB foram os mais suscetíveis à infeção (Goel et al., 2021).

Quanto à severidade da doença, alguns estudos avaliaram a relação entre a sintomatologia e o grupo sanguíneo. Resultados de um estudo realizado em Bangladesh, evidenciaram que o grupo A está associado a mais internamentos nos cuidados intensivos e mortalidade (Halim et al., 2021). Um estudo realizado na India concluiu que indivíduos do grupo A+ e B+ tiveram uma doença mais severa, comparativamente aos outros grupos (Garg et al., 2021). Outro estudo realizado no Paquistão comprovou que indivíduos do grupo A e O apresentaram uma maior severidade da doença, apesar de o grupo A apresentar maiores taxas de mortalidade.

Na Europa um estudo realizado em Itália determinou um aumento da mortalidade em indivíduos do grupo não-O (Sardu et al., 2020). Outro estudo em Itália determinou um aumento dos internamentos nos cuidados intensivos em indivíduos do grupo AB (Greco et al., 2021). Um estudo em Espanha determinou um aumento da mortalidade e necessidade de ventilação mecânica nos indivíduos dos grupos A, B e AB (Tamayo-Velasco et al., 2021).

Já estudos de Itália, Áustria, Dinamarca e Paquistão não determinaram qualquer existência de associação entre o sistema ABO e a severidade da infeção de COVID-19 (Amoroso et al., 2021; Barnkob et al., 2020; Ishaq et al., 2021; Matzhold et al., 2021).

No geral todos os estudos apontaram para uma associação entre o sistema ABO e a infeção de SARS-COV-2, onde maior parte afirma que o grupo A é o grupo de maior risco, e até de severidade da doença para alguns autores, e que o grupo O oferece menor risco à infeção, e até uma sintomatologia mais ligeira em alguns estudos.

1.11. Mecanismos que explicam a possível associação entre o grupo ABO e risco de infeção por SARS-CoV-2

A razão de haver uma maior suscetibilidade para a infeção por SARS-CoV-2 nos indivíduos do grupo A e uma menor para os do grupo O ainda não é totalmente conhecida. Algumas explicações são avançadas por diferentes autores, algumas fundamentadas com

trabalhos de investigação *in vivo* e/ou *in vitro* que pretendem determinar a interação do agente patogénico com o sistema imunológico do hospedeiro.

Pensa-se que anticorpos naturais do sistema ABO tenham um papel importante na imunidade inata o que pode ser a explicação para uma menor suscetibilidade dos indivíduos do grupo O, que contém anticorpos anti-A e anti-B, durante a infeção (Wang et al., 2021). Acredita-se que polimorfismos no sistema ABO afete a ligação entre os microrganismos e os hospedeiros, o que pode explicar as diferenças na suscetibilidade à COVID-19. Outra característica interessante destes agentes patogénicos é de estes partilharem antigénios com o hospedeiro o que leva ao sistema imune a não o reconhecer como ameaça, sendo um dos mecanismos de defesa utilizados, que resulta numa vulnerabilidade imunitária (Abegaz, 2021).

Os anticorpos anti-A presentes no grupo O ligam-se aos antigénios A do envelope viral, ou ao *spike* viral, que leva a um bloqueio da infeção (Goel, et al., 2021). Os anticorpos do grupo O conferiam mais imunidade do que os produzidos pelo grupo B, possivelmente devido ao facto de os anti-A presentes no grupo O serem da classe IgG, enquanto os do grupo B de classe IgM (Shibeeb & Khan, 2022). Pensa-se que anticorpos anti-A, presentes no plasma dos indivíduos dos grupos sanguíneos O e B, e ausentes no grupo A, interferiram com a adesão do SARS-COV-2 às células alvo, pela inibição a sua ligação com a ACE2 o que o impede de entrar na célula (Enguita-Germán et al., 2022; Garg et al., 2021; Shibeeb & Khan, 2022; Wang et al., 2021).

Ainda sobre a ACE2, um estudo realizado por Luo et al., determinou que certos polimorfismos do sistema ABO (rs495828, rs8176740, rs8176746 e rs1268349) influenciam um haplótipo GATC, que leva ao comprometimento da regulação da atividade da ACE2, e é um haplótipo predominante nos indivíduos do grupo não-O (Goel et al., 2021; Luo et al., 2014).

Outro mecanismo descrito, está relacionado com o aumento da atividade da ACE1 nos indivíduos de grupo sanguíneo A, o que leva à predisposição de complicações

cardiovasculares, ou seja, uma maior severidade de COVID-19 (Goel, et al., 2021; Halim et al., 2021). Para além disso, também no grupo A, pelo facto de apresentar maiores quantidades do fator de Von Willebrand e do fator VIII, leva a um aumento do risco de AVC e sintomatologia severa de COVID-19 (Goel, et al., 2021; Halim et al., 2021;Shibeeb & Khan, 2022);

CAPÍTULO II – OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo é investigar a relação entre os genótipos do sistema ABO e a suscetibilidade à infeção pelo vírus SARS-CoV-2 e severidade da doença COVID-19, numa amostra de profissionais de saúde da unidade Local de Saúde do Nordeste (ULSNE), utilizando uma abordagem exploratória retrospetiva e correlacional.

Como objetivos específicos temos:

- Implementar o protocolo de sequenciação do gene ABO no laboratório de Biologia Molecular do CIMO, utilizando novos protocolos de limpeza do do produto de PCR e realizar a sequenciação génica dos exões 6 e 7 do gene ABO, a fim de determinar as frequências génicas e genotípicas na nossa população.

- Determinar se a distribuição dos alelos do gene ABO está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, e verificar se a população segue as expectativas teóricas de estabilidade genética.

-Analisar outros preditores que poderão contribuir para o risco de infeção e severidade da doença COVID-19.

CAPÍTULO III – METODOLOGIA

3.1. População alvo e Desenho de Estudo

Foi conduzido um estudo de natureza exploratória, retrospetiva e correlacional, utilizando uma amostra não probabilística composta por Profissionais de Saúde da Unidade Local de Saúde (ULSNE) de Bragança. A seleção da amostra baseou-se (coorte NORDTESTE COVID-19) em que a informação sobre o grupo ABO foi também requerida.

3.2. Seleção da amostra

Foram considerados elegíveis para este estudo todos os profissionais de saúde com atividade em meio hospitalar da ULSNE (n=427). Através de instrumentos de recolha de dados, foi obtida informação acerca de caraterísticas sociodemográfica e o registo das infeções que forma diagnosticadas entre o período de dezembro de 2020 a abril de 2022. Desta coorte foi selecionada aleatoriamente a nossa amostra, de qual fizeram parte 155 profissionais.

3.3. Procedimentos laboratoriais

O trabalho laboratorial consistiu em: colheita da amostra de sangue; extração de DNA das amostras; quantificação das amostras; PCR de amplificação de material genético; eletroforese em gel de agarose; limpeza do produto resultante da PCR de amplificação; PCR de sequenciação de material genético; purificação do produto resultante da PCR de sequenciação; sequenciação.

Os trabalhos práticos iniciaram-se a partir das amostras recolhidas para o estudo serológico e nas quais se realizou extração de DNA, seguindo-se a execução de PCR de amplificação de material genético.

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados do Centro de Investigação de Montanha (CIMO) e tem por base uma otimização do protocolo "*Generating high-quality data using the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*" da *AppliedBiosystems*.

3.4. Sequenciação de *Sanger*

A sequenciação de *Sanger* é um método de sequenciação de DNA desenvolvido por Frederick *Sanger* em 1975. Este método é baseado no uso de nucleótidos que não apresentam um grupo hidroxilo (-OH) na posição 3' do açúcar, o que vai impedir a adição de novos nucleótidos pela enzima DNA polimerase. O processo de sequenciação inicia com a amplificação do fragmento de DNA a ser sequenciado, por uma reação de PCR. Cada amostra é submetida a uma reação de sequenciação, de *Sanger* modificada, utilizando uma enzima de DNA polimerase, *primers* de DNA específicos para o fragmento de interesse e ddNTPs correspondentes às bases a serem sequenciadas.

Os fragmentos são submetidos a uma eletroforese capilar e separados com base no seu tamanho. Durante a eletroforese, os fragmentos de DNA passam por um capilar preenchido com um polímero viscoso. Quando uma corrente elétrica é aplicada ao capilar, os fragmentos de DNA migram para o ânodo. Conforme os fragmentos passam pelo detetor, sua fluorescência emitida é medida, permitindo a identificação e quantificação dos vários fragmentos de DNA presentes na amostra (Verma et al., 2017).

3.4.1. Extração de DNA de amostras de sangue total por Extrasol

O sangue foi colhido participantes por punção venosa, em EDTA, e o DNA foi extraído a partir de sangue *buffy coat* através de extração automática por tecnologia de esferas magnéticas (MagaBio plus General Genomic DNA Purification kit – II, BioFlux), utilizando equipamento de extração automática da Bioer (Bioer Technology).

Para tal é necessária a centrifugação das amostras de sangue total, a partir da qual é retirado 100µl de buffy coat que se coloca num eppendorf e adiciona-se 400µl de Extrazol. O eppendorf é armazenado no congelador para a preservar e dar continuidade ao processo laboratorial.

3.4.2. PCR de Amplificação de material genético

Para a amplificação dos fragmentos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) correspondentes aos exões 6 e 7 (7a e 7b) do gene ABO, foram utilizados os *primers* descritos na tabela 2.

Tabela 2: Oligonucleótídeos utilizados na amplificação das regiões génicas de interesse.

Exão	Cadeia	Nº de bases	Sequência dos oligos
6-F	Sense	20	TCGCATTTGCCTCTGGTTGG
6-R	*Antisense*	20	CTACCCTCTGGGAGGACAAG
7 A-F	*Sense*	20	CTGCTCTAAGCCTTCCAATG
7 A-R	*Antisense*	20	AGTAGAAATCGCCCTCGTCC
7 B-F	*Sense*	20	AAGGAAACAGAGTTTACCCG
7B-R	*Antisense*	20	GAGGTGGATTACCTGGTGTG

Em cada tubo (0,2 mL) para um volume de reação de 25 µl, adicionou-se 12.5 µl de *Master Mix*, mistura de reação contendo a enzima de DNA polimerase (*AmpliTaq Gold™ Master Mix*, fornecido pela Applied Biosystems™). De seguida adicionou-se 1 µl do *primer sense* e 1 µl do *primer antisense* correspondente a uma das regiões a serem amplificadas (conforme especificado na Tabela 2). Em seguida, adicionou-se 1 µl da amostra de DNA, perfazendo os 25 µl de reação com 9,5 µl de água ultrapura (*DNase/RNase free*). Após a preparação das *strips*, estas são colocadas no termociclador para assim iniciar a PCR. Os tubos com a mistura de reação foram colocados no termociclador e o protocolo de amplificação consistiu nos seguintes passos: incubação inicial: 10 minutos a 95ºC. 35 ciclos compostos por 30 segundos a 95ºC para desnaturação do DNA, 30 segundos a 60ºC *annealing* e 45 segundos a 72ºC para extensão do DNA seguido de um ciclo de extensão final: 7 minutos a 72ºC.

3.4.4. Eletroforese em gel de Agarose

Neste trabalho esta técnica foi utilizada para avaliar a qualidade das amostras resultantes da PCR de Amplificação, uma vez que os exões 6 e 7 vão apresentar tamanho e cargas moleculares diferentes. Para tal, foram utilizados 8 mg de agarose em pó e 80 ml de TSA homogeneizados no balão volumétrico. Este foi Tapado com prata, e colocados 5 min no microondas e, de seguida colocado 5 µl de brometo. A solução foi colocada na placa de corrida, previamente montada com os pentes necessários e deixa-se arrefecer. Quando solidificado o gel, retirar os pentes e colocar 1 µl de corante no primeiro poço e 5 µl de amostra nos restantes. Por a correr durante 30 min a 1:30 h.

3.4.5. Limpeza do produto resultante da PCR de amplificação

Para realizar a etapa de purificação utilizou-se o produto patenteado *ExoSAP-IT (*Applied Biosystems™*)*. Um volume de 4 µl de *ExoSAP-IT* foi adicionado a 10 µl do produto da PCR. A mistura foi colocada num termociclador e incubada por 30 minutos, seguindo o protocolo fornecido.

O *ExoSAP-IT* é utilizado para remover qualquer excesso de *primers* ou nucleotídeos que possam interferir na análise de sequenciação. Essa etapa de purificação garante resultados ótimos de sequenciamento, eliminando possíveis contaminantes (ThermoFisher Scientific, 2017).

3.4.6. PCR de sequenciação de material genético

Para a realização da PCR de sequenciação já são separados os exões em strips diferentes, ou seja, uma strip para *Foward* e uma strip para *Reverse* de cada um. Para 3µl de amostra adiciona-se: 3µl de H_2O; 2µl de *BigDye (*Applied Biosystems™); 1µl de *BigDye buffer (*Applied Biosystems™); e 1µl de *primer*.

3.4.7. Purificação do produto resultante da PCR de sequenciação

A purificação do produto trata-se de uma limpeza. Neste passo é utilizada uma solução de mistura (SAM) (Applied Biosystems™)e *Beads* do *BigDye*. Para 1µl de amostra adiciona-se: 45µl de SAM; e 10µl de *Beads (*Applied Biosystems™).

3.4.8 Sequenciador – SeqStudio Genetic Analyzer

O princípio do método utilizado pelo *SeqStudio Genetic Analyzer* é baseado na tecnologia de sequenciação de *Sanger* e análise de fragmentos por eletroforese capilar. Utiliza uma abordagem de "clique", onde as amostras são carregadas num cartucho que contém todos os reagentes necessários para a amplificação do DNA, a reação de sequenciação e a separação dos fragmentos por eletroforese capilar.

3.5. Análise de Hardy-Weinberg

Para determinar os alelos A, B e O recorre-se à utilização do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este equilíbrio supõe que numa dada população, de geração em geração, as frequências alélicas e genotípicas mantém-se inalteráveis se não houvesse fatores evolutivos envolvidos como acasalamento aleatório, mutações, migrações ou seleções naturais (Oliveira et al., 2021). Este equilíbrio é muito raro de ocorrer, uma vez que há sempre a existência de um dos fatores evolutivos (Thakur et al., 2023).

Assim, se dois alelos **A** e **a** se encontrarem numa grande população, respetivamente com a frequência p e q, qualquer que esta seja (e sendo **A** e **a** os únicos alelos para o locus em causa, p + q = 1), após uma geração com acasalamento ao acaso, os três genótipos **AA**, **Aa** e **aa** encontram-se em equilíbrio nas proporções relativas p2 (para o genótipo **AA**), 2pq (para o genótipo **Aa**) e q2 (para o genótipo **aa**).

A soma das frequências genotípicas correspondentes aos três únicos genótipos que concorrem para o locus em causa é igual a 1 (p2 + 2pq + q2= 1).

Esta avaliação foi realizada recorrendo a 2 ferramentas de bioestatística disponíveis online e que permitem os cálculos teóricos para inferir sobre a estabilidade genética e se a nossa amostra apresenta algum desvio: http://webpages.fc.ul.pt/~pjns/Soft/ABOestimatorhttps://www.had2know.org/academics/ hardy-weinberg-equilibrium-calculator-3-alleles.html

Análise Estatística

Para a análise estatística, foi utilizado o programa estatístico SPSS, *Statistical Package for Social Sciences* versão 23 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EUA). A estatística descritiva foram apresentadas como média e desvio padrão, e frequências foram expressas em percentagens. O teste qui-quadrado (ou teste exato de Fisher) para variáveis categóricas e o teste *t de Student* foram utilizados para comparar as diferenças significativas entre as duas médias. A razão de probabilidades ajustada e os intervalos de confiança foram estimados utilizando regressão logística binária para as variáveis "com infeção / "sem infeção" e " com sintomas" / "sem "sintomas". O nível de significância (valor *p*) foi definido para um valor de 0.05.

3.6. Considerações Éticas

Neste estudo incluído no projeto NORDTEST-COVID19 os investigadores responsáveis comprometem-se a assegurar o cumprimento das normas éticas aplicáveis, internacionalmente aceites, como sendo a Declaração de Helsínquia, a Convenção sobre os Direitos do Homem e a Biomedicina do Conselho da Europa e também as disposições legais e documentos-guia nacionais nesta matéria (Decreto Lei n.º 12/2005). A cada participante foi pedido o consentimento informado escrito. Foi assegurada a confidencialidade dos seus dados mediante a codificação das amostras sanguíneas. Serão tomadas em conta as diretrizes que constam no artigo 5º do Decreto-Lei n.º 12/2005. De acordo com o Decreto-Lei n.º 97/95. O trabalho foi aprovado pela Comissões de Ética para a Saúde da ULSNE que poderá pronunciar-

se sobre o protocolo de investigação científica e sobre qualquer outra questão que suscite dúvida no decorrer da investigação (ANEXO).

CAPÍTULO IV – RESULTADOS

4.1. Caraterização da amostra

A amostra utilizada para a genotipagem do grupo ABO neste estudo consistiu em DNA de participantes selecionados aleatoriamente, obtidas de uma coorte de profissionais de saúde da ULSNE de Bragança (NORDTEST COVID19), que foi estabelecida inicialmente para um estudo sorológico da COVID-19 entre 2021 e 2022. Dessa coorte foram incluídos 155 amostras de DNA submetidas à analise de sequenciação e genotipagem do grupo ABO. Dos 155 indivíduos, 123 (79,4%) eram do sexo feminino e 32 (20,6%) do sexo masculino. Com uma média de idades 47,7 ± 9,8 anos, sendo a faixa etária 40 a 49 anos de idade (n= 68; 43,9%) a mais representada na amostra. As características sociodemográficas dos participantes do estudo estão categorizadas na tabela 3.

Tabela 3: Características sociodemográficas da população em estudo.

Características	N	%
Sexo		
Feminino	123	79,35
Masculino	33	21,29
Faixa etária		
20-29	7	4,52
30-39	24	15,48
40-49	63	40,65
50-59	38	24,51
60-69	23	14,84
Grupo profissional		
Médicos	10	6,45
Enfermeiros	57	36,77
Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica	25	16,13
Técnicos Superiores	15	9,68
Assistentes Técnicos Administrativos	26	16,77
Assistentes Operacionais	22	14,19
Infeção por SARS-CoV-2		
Sem infeção	69	44,5
Com infeção	86	55,5
Número de infeções		
0	91	58,71
1	55	35,48
> 2	9	13,95
Sintomatologia à infeção		
Sem sintomas	22	25,58
Com sintomas	64	74,42

No que diz respeito à distribuição por carreira profissional, verificou-se que 10 (6,5%) são médicos, 57 (36,8%) são enfermeiros, que representam uma maior parte dos participantes, 25 (16,1%) são Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica, 15 (9,7%) são Técnicos Superiores, 26 (16,8%) são assistentes Técnicos Administrativos e 22 (14,2%) Assistentes Operacionais.

Quanto à infeção por SARS-CoV-2 verifica-se que dos profissionais de saúde em estudo 69 (44,5%) não foram infetados e 86 (55,5%) foram infetados. No que toca à manifestação de sintomas, 22 (25,6) não apresentaram sintomas durante a infeção e 64 (74,4%) apresentaram.

Quanto ao número de infeções 91 (58,7%) não foram infetados nenhuma vez, 55 (35,48%) foram infetados uma vez, 7 (4,5%) foram infetados duas vezes e 2 (1,3%) foram infetados quatro vezes. No que diz respeito à sintomatologia dos profissionais de saúde que testaram positivo pelo menos uma vez, 22 (15,58%) não apresentaram sintomas, 41 (48,2%) sintomas leves (dores musculares; dor de cabeça; tosse), 15 (17,7%) sintomas moderados (febre, tosse persistente, vómitos, dificuldade respiratória, perda do paladar e/ou olfato) 8 não definiram sintomas para dar o total de 86.

4.2 Resultados de Sequenciação: Genótipos simples e genótipo de múltiplos alelos

A análise dos exões 6 e 7 por sequenciação de *Sanger* permitiu identificar os genótipos simples (AA, AO, AB, BB, BO e OO) mas também identificar os subtipos já descritos na literatura. Na tabela 4 são apresentados os resultados das frequências obtidas para o fenótipo, genótipo simples e genótipos específicos, categorizados de acordo com a presença ou ausência de certos SNPs, dividindo-se em três categorias: Fenótipo, Genótipo Simples e Genótipo de múltiplos alelos. Ou seja, com os alelos do ABO conhecidos determinou-se os 4 fenótipos (A, B, AB e O), 6 genótipo simples (AA, AO, AB, BB, BO e OO) e 10 genótipos de múltiplos alelos, em que dentro da nossa população categorizaram-se 18.

Tabela 4: Frequências dos fenótipos e genótipos por género.

	Feminino N (f)	Masculino N (f)	Total N (f)
Fenótipo			
A	60 (0,488)	14 (0,438)	74 (0,477)
B	10 (0,081)	6 (0,188)	16 (0,103)
AB	5 (0,041)	2 (0,063)	7 (0,045)
O	48 (0,39)	10 (0,0313)	58 (0,374)
Total	**123 (1)**	**32 (1)**	**155 (1)**
Genótipo Simples			
AA	13 (0,106)	4 (0,125)	17 (0,11)
AB	5 (0,041)	2 (0,063)	7 (0,055)
AO	47 (0,382)	10 (0,313)	57 (0,368)
BB	2 (0,016)	0	2 (0,013)
BO	8 (0,065)	6 (0,188)	14 (0,09)
OO	48 (0,39)	10 (0,313)	58 (0,374)
Total	**123 (1)**	**32 (1)**	**155 (1)**
Genótipo Específico (≠ SNPs)			
A101	9 (0,073)	3 (0,094)	12 (0,077)
A101 e A102	4 (0,033)	1 (0,031)	5 (0,032)
A101 e O01	15 (0,122)	5 (0,156)	20 (0,129)
A101 e O02	20 (0,163)	2 (0,063)	22 (0,142)
A101 e O03	2 (0,016)	1 (0,031)	3 (0,019)
A102 e O01	2 (0,016)	0	2 (0,013)
A102 e O02	6 (0,049)	2 (0,063)	8 (0,052)
A201 e O02	2 (0,016)	0	2 (0,013)
A101 e B101	4 (0,033)	2 (0,063)	6 (0,039)
A102 e B101	1 (0,008)	0	1 (0,006)
B101	2 (0,016)	0	2 (0,013)
B101 e O01	4 (0,033)	4 (0,125)	8 (0,052)
B101 e O02	4 (0,033)	2 (0,063)	6 (0,039)
O01	21 (0,171)	3 (0,094)	24 (0,155)
O01 e O02	14 (0,114)	4 (0,125)	18 (0,116)
O01 e O03	2 (0,016)	0	2 (0,013)
O02	10 (0,081)	3 (0,094)	13 (0,084)
O02 e O03	1 (0,008)	0	1 (0,006)
Total	**123 (1)**	**32 (1)**	**155 (1)**

Nota: N- número de indivíduos; f – frequência (%).

As figuras 8 - 11 representam alguns exemplos das posições dos nucleótidos utilizados para determinar os genótipos das amostras. O genótipo utilizado como referência foi o O01, onde a única diferença que apresenta para o A101 é uma delação na posição 261.

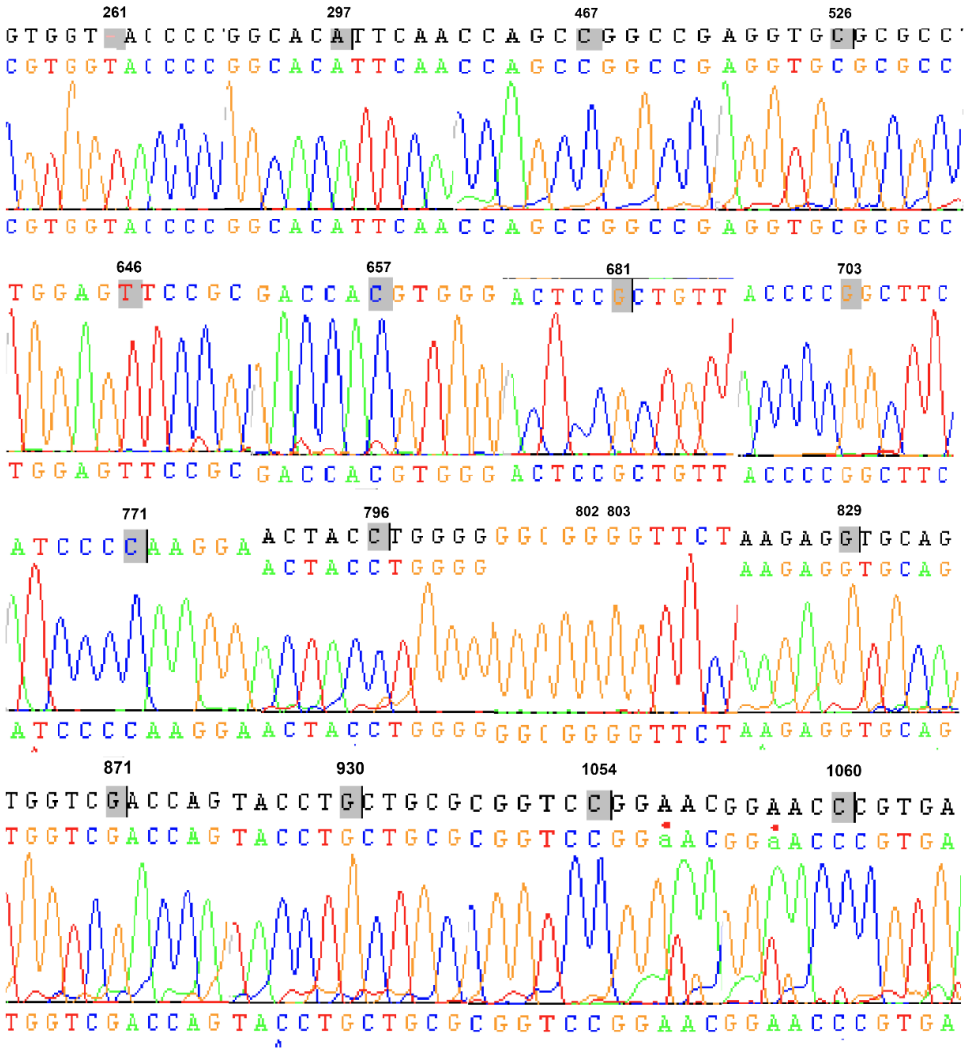


Figura 8: Genótipo O01 e posição dos nucleótidos nos exões 6 e 7 para sua determinação.

Foi utilizado como referência para os outros genótipos. As distinções podem se dar nas posições representadas na figura.

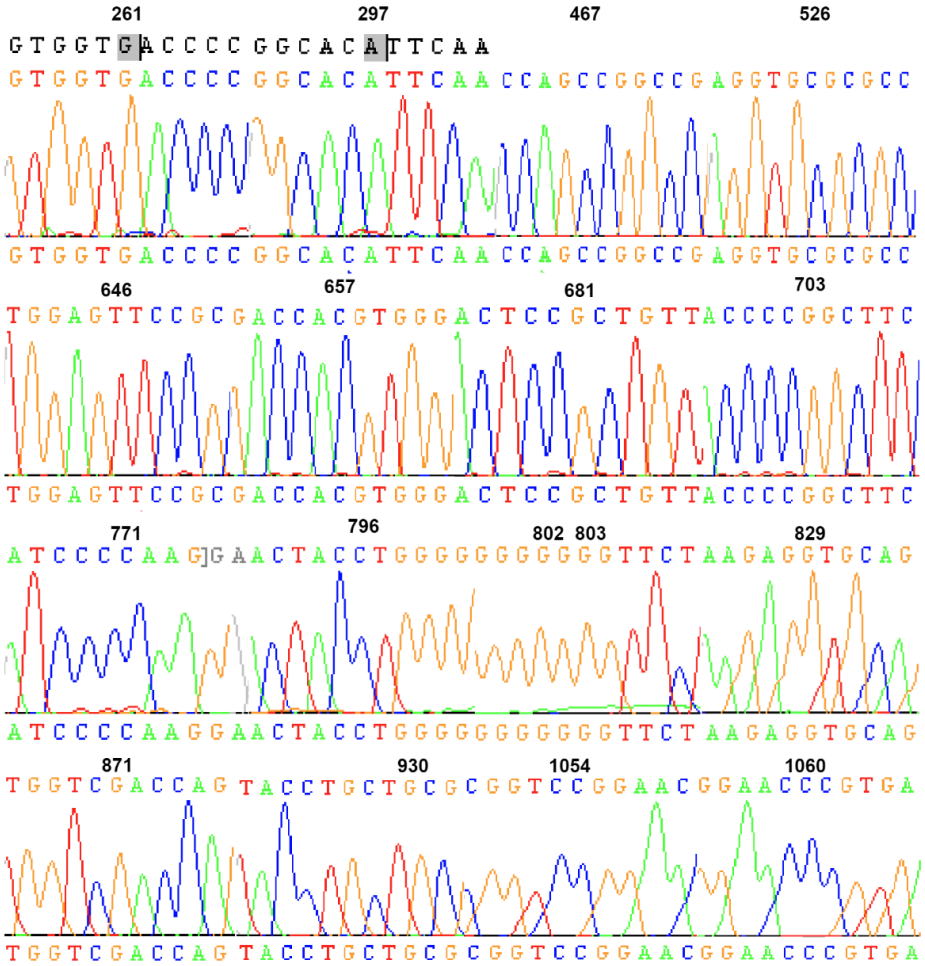


Figura 9: Genótipo A101 posição dos nucleótidos nos exões 6 e 7 para sua determinação.

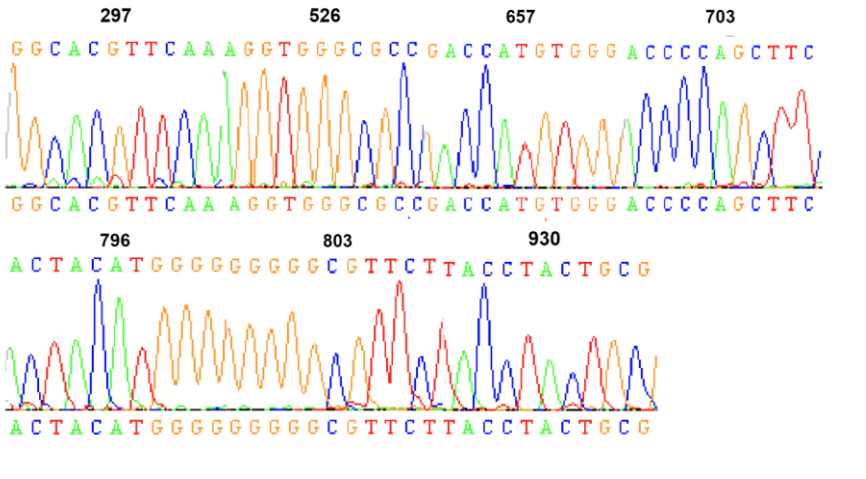


Figura 10: Genótipo B101 e posição dos nucleótidos nos exões 6 e 7 para sua determinação.

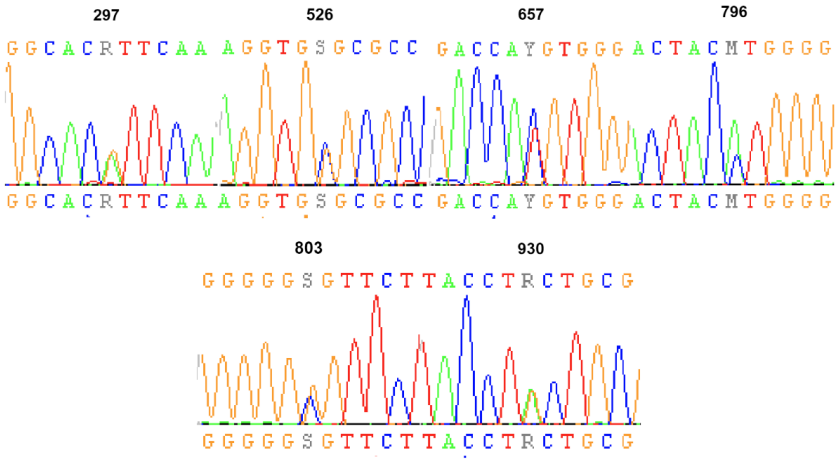


Figura 11: Genótipo A101 e B101 (AB) e posição dos nucleótidos nos exões 6 e 7 para sua determinação.

De acordo com os resultados obtidos na tabela 4, o fenótipo mais frequente foi o A, seguido do O, B e AB em ambos os géneros. Quanto aos genótipos simples no sexo feminino o mais frequente foi o AO, seguido do OO, AA, BO, AB e BB, enquanto que no masculino o AO e o OO estavam em igual número, seguido do BO, AA e AB (nenhum dos participantes apresentou o genótipo BB). Quanto aos genótipos mais específicos, dentro do A no sexo feminino o mais frequente foi o A101/O02 e no sexo masculino o A101/O01; dentro do B no sexo feminino os mais frequentes foram o B101/O01 e B101/O02, e no sexo masculino foi o B101/O01; já dentro do O, o O01 foi o mais

frequente no sexo feminino, e no sexo masculino foi o O01/O02. Em ambos os géneros os menos frequentes foram o A102/B101 e O02/O03.

4.3. Frequência alélica do grupo sanguíneo do sistema ABO e equilíbrio de Hardy-Weinberg

Com os resultados da genotipagem foram calculadas as frequências génicas e testado o equilíbrio de Hardy-Weinberg, com o objetivo de examinar se a distribuição genotípica da amostra está em conformidade com as expectativas teóricas. A obtenção das frequências génicas assumindo as frequências constantes desta na população foi calculada a partir das frequências fenotípicas e frequências genotípicas simples, através de duas ferramentas disponíveis online:

- Fenotípicas: http://webpages.fc.ul.pt/~pjns/Soft/ABOestimator

-Genotípicas: https://www.had2know.org/academics/hardy-weinberg-equilibrium-calculator-3-alleles.html

Como está apresentado na Tabela 5 o grupo sanguíneo ABO mais frequente na nossa amostra foi o grupo A. Comparativamente a outros estudos realizados noutras populações a variação das frequências não é muito significativa, contudo há uma maior similaridade com a população do norte de África. Portugal é um dos países onde o grupo A é o mais frequente (The American Red Cross, 2023).

Tabela 5: Comparação com as frequências dos grupos ABO com dados publicados e em várias populações.

Região	Grupo Sanguíneo ABO %				Referência
	A	B	O	AB	
Portugal	47.7	10.3	37.4	4.5	Nosso estudo
Portugal	44.6	7.7	42.7	3.4	(Duran et al., 2007)
Europa	40.2	13.0	40	5.1	(Chandler et al., 2020)
Asia	40.2	19.5	29.9	10.4	(Isik et al., 2020)
América do Norte	32.0	19.0	42.0	6.0	(Bloch et al., 2021)
Norte de África	49.1	24.1	33.3	3.1	(Yalaoui et al., 2020)

Na tabela 5 estão descritas as frequências génicas obtidas neste estudo e a comparação com frequências génicas de outras regiões. As frequências alélicas foram

obtidas, por inferência na calculadora de H-W, a partir do fenótipo A: 0.31, B: 0.07; O: 0.61 e a partir do genótipos foram de A: 0.32; B: 0.08 e O: 0.60, respetivamente (tabela 3 e 4).

Ao aplicar a primeira ferramenta para o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi possível obter os valores do logaritmo da verossimilhança, onde o valor de (H-W), o qui-quadrado ($\chi 2$) e o valor de probabilidade (*p*) são utilizados para avaliar se as frequências genotípicas observadas na população diferem significativamente das frequências esperadas. Na nossa avaliação (tabela 6), o valor relativamente pequeno de $\chi 2$ e o alto valor de probabilidade *p* sugerem que as frequências genotípicas observadas estão em concordância com as expectativas do equilíbrio de H-W, o que indica que a população está em equilíbrio genético.

Assim verifica-se que as frequências génicas dos grupos sanguíneos ABO não apresentaram desvios significativos do Equilíbrio H-W em ambos os sexos, nos casos de infeção e sem infeção, e nos casos com sintomas e sem sintomas. No entanto, no grupo de infetados verifica-se uma diminuição nas frequências dos alelos p[A] (0.40± 0.048) em comparação com os grupo de não infetados (0.25 ±0.04). Estas diferenças serão avaliadas mais à frente, uma vez que, na tabela 6 não está apresentada a estatística em relação à diferença entre grupos, mas sim quanto ao modelo teórico.

Tabela 6: Resultados para as frequências génicas e avaliação do equilíbrio de Hardy e Weinberg obtidos a partir do fenótipo.

	p[A]±dp	**q[B]± dp**	**r[O]± dp**	**H-W***	**χ^2**	**Valor de *p*****
Total	0.31 ± 0.029	0.07 ± 0.01	0.61 ±0.03	-169.76	0.036	0.850
Sexo						
Feminino	0.31±0.03	0.06±0.016	0.62 ± 0.03	-129.35	0.0074	0.9315
Masculino	0.29 ± 0.06	0.13±0.04	0.57 + 0.07	-38.89	0.2008	0.6541
Infeção						
Com infeção	0.25 ±0.04	0.07± 0.02	0.68 ± 0.04	-92.55	0.0014	0.9705
Sem infeção	0.40± 0.048	0.08±0.02	0.52±0.05	-73.48	0.1470	0.7014
Sintomas						
Com sintomas	0.24± 0.041	0.05±0.02	0.71± 0.043	-62.63	0.2348	0.6280
Sem sintomas	0.26±0.07	0.15± 0.06	0.59± 0.081	-27.85	0.0975	0.7549

* Valor de logaritmo de verosimilhança de Hardy-Weinberg; χ^2 valor de qui-quadrado, diferença entre o calor obtido e esperado; ** para um valor p de probabilidade (o valor p é maior que um nível de significância escolhido, não rejeitamos a hipótese nula: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Foi também utilizada a outra ferramenta de cálculo a partir dos genótipos (tabela 7). Nesta análise os resultados evidenciam um valor de qui-quadrado de 0.669 relativamente baixo, sugerindo que as frequências genotípicas observadas estão em concordância com as frequências de acordo equilíbrio H-W. No entanto, a interpretação também depende dos graus de liberdade e do valor de *p* associado, a que não tivemos acesso.

Tabela 7: Frequências génicas obtidas a partir dos genótipos simples. Valores obtidos e esperados.

Genótipos n (%)	**AA**	**AO**	**BB**	**BO**	**OO**	**AB**	***Valor de P***
Valor obtido	17 (11.0)	57 (36.8)	2 (1.3)	14 (9.0)	58 (37.4)	7 (4.5)	0.699
Valor Esperado	15.5 (9.9)	59.1 (38.1)	1 (0.7)	15.1 (9.7)	56.4 (36.4)	7.9 (5.1)	
Frequências Alélicas		***p*[A]**		***q*[B]**	p	***r*[O]**	
ne (f)		**98 (0.32)**		**25 (0.08)**		**187 (0.60)**	

ne: número esperado; f-frequência estimada: *P:* qui-quadrado (χ^2).

O teste compara as frequências observadas dos genótipos com as frequências esperadas sob o equilíbrio de H-W. Se as frequências observadas não diferirem significativamente das frequências esperadas, a população está em equilíbrio de H-W para esses genótipos.

4.4. Análise de associação entre os genótipos ABO e o risco e severidade da Infeção

A associação entre o sistema de grupo sanguíneo ABO e a presença de infeção e severidade da COVID-19 nesta amostra foi investigada a vários níveis. Tabelas cruzadas para medir a associação pela aplicação do teste Qui-quadrado, ou teste exato de Fisher (tabela 8). Além disso, realizou-se análises através de regressão logística binária para controlar possíveis fatores de confusão, como a idade e o sexo. Numa segunda fase, calculou-se a probabilidade de risco de infeção ou severidade da doença (presença/ausência de sintomas) através da regressão binária determinando a razão de probabilidades ("*odds ratio*"OR). Os resultados incluem os ORs estimados, bem como o risco associado a cada grupo sanguíneo e em relação à presença de severidade da COVID-

19 (tabelas 9 e 10). Em relação aos genótipos simples (AA, AO, BB, BO, OO e AB) e genótipos específicos, que foram determinados a partir da sequenciação, foram apenas utilizadas as tabelas de contingência, uma vez que quase todas classes genótipicas tinham um número muito reduzido de amostras.

Tabela 8: Análise de associação entre a presença de infeção, severidade da COVID-19 e os grupos sanguíneos ABO.

Variáveis	Sem Infeção	Com Infe*ção*	p^a	Sem sintomas	Com sintomas	p^a
Idade						
20-29	3 (42.9)	4 (57.1)		1 (25.0)	3 (75.0)	
30-39	10 (32.3)	21 (67.7)		8 (38.1)	13 (61.9)	
40-49	24 (38.1)	39 (62.9)	**0.03**	5 (12.8)	34 (87.2)	**0.081**
50-59	16 (48.5)	17 (51.5)		7 (41.2)	10 (58.8)	
60-69	16 (76.2)	5 (23.8)		1 (20.0)	4 (80.0)	
Sexo						
Masculino	12 (37.5))	20 (62.5)		4 (20.0)	16 (80.0)	
Feminino	57(36.8)	66 (76.7)	**0.244**	18 (27.3)	48 (72.7)	**0.369**
Fenótipo						
A	40 (54.1)	34 (45.9)		8 (23.5)	26 (76.5)	
B	7 (43.8)	9 (56.3)		4 (44.4)	5 (55.6)	
AB	4 (57.1)	3 (42.9)	**0.054**	2 (66.7)	1 (33.3)	**0.143**
O	18 (31.0)	40 (60.9)		22 (25.6)	32 (74.4)	
Genótipo						
AA	9 (52.9)	8 (47.1)		5 (19.2)	21 (80.8)	
AO	31 (54.4	26 (45.6)		0 (0.0)	0 (0.0)	
BB	2 (100)	0 (0.0)		4 (44.7)	5 (55.6)	
BO	5 (35.7)	9 (64.3)	**0.056**	8 (20.0)	32 (80.0)	**0.155**
OO	18 (44.5)	40 (69.0)		2 (66.7)	1 (33.3)	
AB	4 (57.1)	3 (42.9)		5 (19.2)	21 (80.8)	
Genótipo (SNPs)						
A101	7 (58.3)	5 (41.7)		2 (40.0)	3 (60.0)	
A101 e A102	2 (40.0)	3 (50.0)		1 (33,3)	2 (66.6)	
A101 e O01	3 (50.0)	3 (50.0)		2 (66.7)	1 (33.3)	
A101 e O02	10 (50.0)	10 (50.0)		3 (30.0)	7 (70)	
A101 e O03	14. (64.6)	8 (36.4)		2 (25.0)	6 (75.0)	
A102 e O01	1 (100)	2 (66.7)		0 (0.0)	2 (100)	
A102 e O02	1 (100)	0 (0.0)		0 (0.0)	2(100)	
A201 e O02	0 (0.0)	2 (100)		0 (0.0)	3 (100)	
A101 e B101	5 (62.5)	3 (37.5)		0 (0.0)	1 (100)	
A102 e B101	1 (50.0)	1 (50.0)	**0.292**	2 (40.0)	3 (60.0)	**0.838**
B101	2 (100)	0 (0.0)		2 (50.0)	2 (50.0)	
B101 e O01	3 (37.5)	5 (62.5)		5 (27.8)	13 (72.2)	
B101 e O02	2 (33.3)	4 (66.7)		2 (15.4)	11 (84.6)	
O01	6 (25.0)	18 (75.0)		0 (0.0)	1 (100)	
O01 e O02	5 (27.8)	13 (72.2)		1 (12.5)	7 (87.5)	
O01 e O03	1 (50.0)	1 (50.0)		2 (40.0)	3 (60.0)	
O02	5 (38.5)	8 (61.5)		1 (33,3)	2 (66.6)	
O02 e O03	1 (100)	0 (0.0)		2 (66.7)	1 (33.3)	

[a] Valor de teste exato de Fisher, para o nível de significância é inferior a 0.05

Na análise por grupos "sem infeção" e "com infeção" verifica-se diferença estatisticamente significativa de acordo com as faixas etárias (p=0.03; tabela 8). O grupo

de infetados parece estar mais representado à medida que avançamos da primeira faixa etária, 20-29 para as faixas etárias 30-39 e 40-49 com 67.7 % e 62.9% dos indivíduos no grupo de “infetados”, respetivamente. No entanto, o mesmo não se verifica nas duas faixas etárias seguintes (50-59 e 60-69) em que há uma inversão dessa tendência.

Não se verificou diferenças significativas entre género quer para o grupo de “infetados” e “não infetados”, e “com sintomas” e “sem sintomas” (p=0.244 e p=0.369).

Não houve diferenças relevantes entre os grupos sanguíneos (p=0.054), genótipos simples (p=0.056) e genótipos específicos (p=0.292), apesar de ser observada uma tendência para haver mais indivíduos do grupo O afetados e menos do grupo A, resultado que está em contradição com a maioria dos trabalhos publicados que estudam a associação do grupo sanguíneo ABO com o risco de infeção por SARS-CoV-2 e maior severidade doença COVID-19.

Para a avaliação da severidade da infeção, “com sintomas e “sem sintomas” não foram observadas diferenças significativas entre género, idade e os diferentes grupos sanguíneos, fenótipos e genótipos.

Na análise de regressão binária, foram aplicadas diferentes abordagens para analisar o fenótipo como preditor, ou a investigação da presença de um alelo específico (A vs. não-A; B vs. não-B; e O vs. não-O). Os resultados dessa análise estão apresentados nas tabelas 9 e 10. Calculou-se as OR para as variáveis dicotómicas "com infeção" e "sem infeção" e "com sintomas" e "sem sintomas", com foco nos grupos "presença de infeção" e "com sintomas", respetivamente, levando em conta o ajuste para as variáveis sexo e idade. Para a variável idade verifica-se a mesma tendência já observada na análise uni-variada. Na classe dos 60-69, de referência, verifica-se que as faixas etárias 30-39, apresentam um risco de cerca de 8 vezes superior de contrair COVID-19, OR: IC 95%: 7.680 (2.046-28.825), e a classe etária 40-49 um risco 5 vezes superior (5.223: 1.634-16.869, com valores de probabilidade de 0.003 e 0.005. O mesmo já não se verifica para a faixa etária 50-59 (3,168:0.897-11.182).

Tabela 9: Análise da associação do grupo ABO com o risco de infeção por regressão binária.

Variáveis	Com infeção / Sem infeção (n)	OR	(IC 95%)	Valor Estatístico[a]
Idade				
20-29	7	3,216	0..488-21.167	0.224
30-39	31	7.680	2.046-28.825	**0.003**
40-49	63	5.223	1.634-16.869	**0.005**
50-59	33	3,168	0.897-11.182	0.073
60-69	21	Ref.	--	--
Sexo (*M)	32	0.600	0.256-140	0.239
Fenótipo				
A	74	--	Ref.--	--
B	16	0.985	0.308-3.151	0.980
AB	7	0.681	0.136-3.415	**0.**641
O	58	2.545	1.216-5.327	**0.013**
A vs (n-A)	74 (81)	1.998	1.007-3.965	**0.048**
O vs. (n-O)	58 (97)	(-) 0.366	0.177-0.759	**0.007**
B vs(n-B)	16 (139)	1.225	0-411-3.85	0.690

OR: *odds ratio*; IC: Intervalo de Confiança. Valor estatístico *P*. Análise de regressão, ajustada para a idade. Ref: Categoria de referência. M* (sexo masculino: referencia).

Também não se observou uma maior associação de infeção com o sexo, nem para a variável dependente "com infeção" e " sem infeção", como para a severidade "com sintomas" e "sem sintomas". Para esta última, a análise incidiu em apenas 12 indivíduos do sexo masculino.

Em relação ao fenótipo, isto é grupos sanguíneos A, B, AB e O, para os resultados da análise de regressão para a variável "com infeção e sem infeção", considerou-se o grupo A como referência, apontando para um risco de infeção 2.5 vezes superior para o grupo de indivíduos do grupo O em relação ao grupo A (OR 2.545: 1.216-5.327). No entanto, na análise realizada entre o grupo A e todos os grupos "não-A" e o grupo O e todos os "não-O" os resultados são muito diferentes. A presença do alelo A em relação aos outros grupos parece conferir um risco maior, cerca de 2 vezes, de ser infetado (1,998: 1.007-3.965) e a presença do grupo O relaciona-se de forma inversa (OR 0.366:0.177-0.759).

Tabela 10: Análise da associação do grupo ABO com a severidade da COVID-19 por regressão binária.

	Com Sintomas/sem Sintomas (n)	OR	(IC 95%)	Valor Estatístico[a]
Idade				
20-29	7	0.606	0.023-1.574	0.763
30-39	31	0.715	0.580-8.750	0.793
40-49	63	2.535	0.216-29.697	0.459
50-59	33	0.505	0.380-5.679	0.500
60-69	21	Ref--	--	--
Sexo (*M)	20			0.233
Fenótipo				
A	34	Ref.--		--
B	9	0.173	0.09-3.255	0.980
AB	3	0.455	0.660-3.141	0.641
O	40	2.068	0.569-7.512	0.013
Fenótipo X vs (n-X)				
A vs (n-A)	84	1.307	0.404-4.131	0.648
O vs. (n-O)	84	2.688	0.461-15.679	0.272
B vr (n-B)	84	0,351	0.19-1,174	0.900

OR: *odds ratio*; IC: Intervalo de Confiança. Valor estatístico *P*. Análise de regressão, ajustada para a idade. Ref: Categoria de referência. M* (sexo masculino: referencia).

A análise de regressão binária para as variáveis 'com sintomas' e 'sem sintomas' não revelou qualquer associação significativa com as faixas etárias, sexo e genótipos do sistema ABO. No entanto, é de notar uma diferença estatisticamente significativa para o fenótipo O, com um risco de severidade 2 vezes maior (OR 2.688:0.569-7.512). Contudo, não se pode concluir que isto significa que, com base nos dados e no modelo utilizado, não se encontrem evidências estatisticamente significantes de que a presença ou ausência de sintomas esteja associada a diferentes faixas etárias, género ou genótipos do sistema ABO uma vez que a amostra é muito pequena.

CAPÍTULO V – DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo realizado na população portuguesa que permitiu determinar os genótipos com base num número tão elevado de polimorfismos específicos que originam diferentes alelos dentro do que designamos por "genótipo simples" (AA, AO, AB, BB, BO e OO).

As frequências fenotípicas, genotípicas e alélicas

As frequências fenotípicas obtidas a partir deste estudo foram comparadas com resultados de publicações e com dados recolhidos de bases de dados importantes (p.e. OMS), que fornecem dados sobre as frequências dos grupos sanguíneos ABO para vários países ou regiões, como trabalhos de autores nacionais, sobretudo estudos com amostras de dadores de sangue, e também na base de dados genéticos que compilam dados sobre variações genéticas, incluindo as frequências dos grupos sanguíneos ABO. O Banco de Dados de Frequência de Alelos (ALFRED) é um exemplo desse tipo de banco de dados.

O sistema ABO é determinado por três alelos principais: A, B e O. Cada pessoa herda dois alelos, um de cada progenitor, que determinam o seu grupo sanguíneo. O alelo O é recessivo, enquanto os alelos A e B são codominantes (Bullerdiek et al., 2022), o que significa que os indivíduos que possuem um alelo A e um alelo B expressam ambos os antígenos A e B nas seus eritrócitos. Assim se compreende que apesar de termos o grupo A mais representado na população na verdade o alelo O é o mais frequente (National Health Service, 2023).

Do nosso conhecimento, não existem muitos estudos que apresentem os resultados dos alelos caracterizados classificados com os SNPs presentes na região sequenciada, como foi possível neste trabalho. As diferentes combinações de alelos complicam muitas vezes as análises de associação génica. Contudo, muitas das discrepâncias que observam entre estudos e diferentes populações poderão ter como causa a diferente "estrutura alélica" que observamos na região do gene que engloba o exão 6 e 7. A identificação de alelos múltiplos leva à definição de genótipos diferentes pelo que vai ser necessário a análise de mais amostras da nossa população para estabelecer as suas frequências alélicas.

Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A análise do H-W é importante nos estudos de genética populacional, epidemiologia e pesquisas relacionadas à herança de características genéticas específicas, como o sistema ABO de grupos sanguíneos. A deteção de desvios significativos do equilíbrio de H-W pode indicar a presença de fatores evolutivos, como seleção natural, migração ou deriva genética, que podem estar a afetar a frequência dos alelos na população estudada (Oliveira et al., 2021). Neste estudo, os resultados indicam que a nossa amostra se encontra em equilíbrio e que a nossa amostragem foi aleatória. Nem sempre os estudos de associação, semelhantes a este, apresentam esta análise, o que dificulta muitas vezes a interpretação e a comparação de resultados.

As frequências alélicas do gene ABO inferidas a partir das duas ferramentas de cálculo foram muito semelhantes apesar de uma utilizar o fenótipo e a outra os dados do genótipo. Não se verificam também grandes desvios ao valor teórico esperado, nos grupos considerados, como o sexo, presença ou ausência de infeção e presença ou ausência de sintomas.

Comparação com frequências de outras populações

As frequências populacionais do sistema ABO variam de acordo com a região geográfica e etnia. De modo geral, a frequência do grupo sanguíneo O é maior em populações nativas das Américas e Europa Ocidental, a frequência dos grupos A é maior em populações da Europa Central e Oriental. No entanto, a frequência do grupo B é maior nas populações asiáticas Chinesas e Indianas e a frequência de AB é maior nas populações asiáticas Japonesas e Coreanas, apesar de ser o grupo mais raro, contudo há variações consideráveis dentro dessas regiões e entre diferentes populações (Dean L., 2005a). Em África o grupo O também apresenta ser o de maior distribuição em todo o continente (Apecu et al., 2016).

Curiosamente, Mourant et al. (1952), há muitos anos atrás identificou que o grupo A na população da Europa Ocidental (na qual faz parte Portugal) era o mais prevalente, seguido do O, B e AB. O que se fez notar também na região do Norte de África (Mourant

& Watkin, 1952). Em questões históricas e de antropologia evolutiva, sabe-se que a Península Ibérica e o Norte de África partilham um grande historial, uma vez dada a proximidade entre as duas regiões, o que facilita a migração (Moorjani et al., 2011).

Relação dos fenótipos do sistema ABO e COVID-19

Os resultados obtidos no nosso estudo podem ser influenciados por outros fatores, como a distribuição de grupos sanguíneos na população estudada, a forma como a infeção é transmitida e outras características específicas da amostra. Para uma interpretação completa e correta, é fundamental levar em consideração o tamanho da amostra, a qualidade dos dados e a adequação das variáveis de controlo na análise de regressão.

Contudo, nem todos os estudos de associação entre o sistema ABO e a doença da COVID-19 tem demonstrado que o grupo A é o grupo com maior suscetibilidade e severidade para a infeção, e o grupo O ser o protetor. Bhattacharjee et al., não encontrou nenhuma relação entre indivíduos com e sem anticorpos anti-A e a severidade ou mortalidade para SARS-CoV-2 (Bhattacharjee et al., 2022). Fernandez-Botran et al., e Pourali et al., também não encontraram qualquer associação entre os grupos ABO e a severidade ou mortalidade da doença, respetivamente (Fernandez-Botran, 2021; Pourali et al., 2020). Tal como Enguita-Germán et al., que também não encontrou qualquer relação entre a severidade e mortalidade da doença e os grupos sanguíneos ABO, apesar de constatarem um efeito protetor do grupo O e um maior risco do grupo A (Enguita-Germán et al., 2022). Wu et al., encontraram um menor risco para os indivíduos do grupo B (Wu et al., 2020). Ishaq et al., realizaram um estudo em que os casos mais severos da doença foram em indivíduos do grupo A e O, contudo houve uma maior prevalência de infeção nos indivíduos do grupo O e AB, porém afirmam que os resultados não foram significativos (Ishaq et al., 2021).

Associação do grupo sanguino ABO com a infeção e a severidade da doença nas faixa etárias

Os Profissionais de saúde mais jovens podem estar mais ativos no atendimento direto aos doentes, trabalhando em unidades de tratamento intensivo ou emergências,

onde a exposição ao vírus é maior (Bahls et al., 2022). Além disso, podem ser alocados em áreas de maior necessidade clínica, onde o risco de contato com pacientes infetados é maior (Shiloh et al., 2019).

Na utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs), os Profissionais de saúde mais jovens podem ser menos experientes ou menos treinados no seu uso adequado, o que pode aumentar o risco de infeção (Laxmidhar et al., 2023). Além disso, a sua escassez pode levar a uma maior exposição e consequentemente a um maior risco de infeção e severidade (Slocum et al., 2023).

Mecanismos de Infeção e ligação com o sistema de grupo sanguíneo ABO

Com a revisão da literatura dos últimos 30 anos, foi possível verificar que a associação entre o sistema sanguíneo ABO e certos mecanismos de infeção não são exclusivos do SARS-CoV-2, tendo já sido descrito ao longos destes anos evidências da associação com outros tipos de vírus, e até outras patologias e cancro. Com isto, e sendo de caracter importante entender o que leva a uma suscetibilidade para a infeção do hospedeiro, serão descritos alguns dos mecanismos de certos vírus e a possível interação com o sistema ABO.

Uma vez que os vírus apresentam uma notável capacidade de infetar as células do hospedeiro, sendo esta necessidade de origem primitiva, de modo a replicarem-se e a propagarem-se, o que leva muitas vezes à manifestação da doença. O processo de infeção viral envolve uma série de etapas, desde o reconhecimento e ligação específica à superfície das células até à liberação de novas partículas virais (Flores, 2017). A presença ou ausência de antigénios na membrana dos eritrócitos podem levar a alterações na sua função e morfologia, o que explica, ou tenta explicar, a associação do sistema de grupo sanguíneo ABO e a suscetibilidade para certas doenças. Alguns dos antigénios da membrana atuam como recetores, facilitando a adesão de microorganismos, o que contribuí para o desenvolvimento de doenças (Abegaz, 2021; Ewald & Sumner, 2016). Contudo, uma diferente expressão de antigénios na membrana, afeta a relação entre o

hospedeiro – agente infecioso, levando a diferentes suscetibilidades para a infeção (Franchini & Bonfanti, 2015).

No caso dos Norovírus, certos estudos indicam uma maior suscetibilidade do grupo O para a infeção. Estes ligam-se aos antigénios ABH expressos na superfície das células da região gástrica ou duodenal, principalmente nas vilosidades do intestino (Hutson et al., 2002). Apresentam afinidade para os antigénios H do tipo 1 e 3, principalmente quando presentes em maiores quantidades. Indivíduos do grupo B tem maiores dificuldades no desenvolvimento da infeção (Hennessy et al., 2003), uma vez que o antigénio B tem a capacidade de modificar os ligandos do vírus, pela presença da galactose, e assim impedir a sua ligação às células (Hutson et al., 2002). Contudo, um estudo realizado por Marionneau et al., não encontrou nenhuma associação entre as ligações dos norovírus e os grupos sanguíneos (Marionneau et al., 2002).

No caso do HIV acredita-se que o envelope do vírus pode ser glicolizado pela glicotransferase do grupo A, o que interfere na capacidade de infetar o hospedeiro do grupo B, por apresentar naturalmente anticorpos anti-A, ao contrario dos outros grupos que apresentam uma maior suscetibilidade, pela presença de anti-A e anti-B no grupo O, pela presença de anti-B no grupo A e não apresentar anticorpos no grupo AB (Davison et al., 2018; Ukaejiofo & Nubila, 2007).

O vírus do West Nile é mais suscetível nos indivíduos do grupo A, o que leva a querer que há uma maior concentração de moléculas de afinidade para o vírus nos eritrócitos dos indivíduos do grupo A do que do grupo O (Lanteri et al., 2014).

Os mecanismos de infeção do vírus da Hepatite C ainda continuam incertos, contudo uma das hipóteses é que o grupo sanguíneo condiciona a infeção através de recetores mediados por afinidade de ligação, uma vez que este vírus é constituído por glicoproteínas e pode facilitar a sua adesão à membrana eritrocitária (BEHAL et al., 2010).

Resposta Imunitária na COVID-19

Sendo o SARS-CoV-2 novo para o organismo era de esperar uma resposta imune adaptativa eficaz a partir da 2 ou 3 semana de contágio, para neutralizar os novos antigénios. Tendo em conta o tempo necessário para a resposta adaptativa, os indivíduos que apresentem uma sintomatologia mais leve ou até não apresentar sintomas pode ser devido à resposta inata, uma vez que sua ativação não depende do reconhecimento por anticorpos ou células T. Contudo, uma sintomatologia mais severa pode ser por uma falha na resposta imunitária inata (que é a de primeira linha) e/ou da resposta adaptativa que, quando é "exagerada" pode se tornar patogénica principalmente com a presença de comorbidades (Boechat et al., 2021).

Os anticorpos naturais, tal como os do sistema ABO são de classe IgM. As concentrações naturais de IgM podem influenciar a severidade da COVID-19. Estas diminuem significativamente com a idade, são encontradas em concentrações mais baixas em indivíduos do sexo masculino e indivíduos do grupo A (Boechat et al., 2021). Este efeito pode explicar o efeito protetor de indivíduos com anticorpos anti-A (grupo O e B) no entanto já foram descritos resultados contraditórios. O sistema complemento é crucial na resposta inata, contudo pode desencadear respostas pró-inflamatórias. Esta resposta pode ser benéfica no combate à infeção mas também pode ocorrer uma resposta inflamatória descontrolada, a chamada tempestade de citosinas que é comum na doença da COVID-19 (Aguiar et al., 2021). A MBL é uma proteína do sistema de complemento que age como um PRR e reconhece os resíduos de manose presentes na membrana dos microorganismos. No caso do SARS-CoV-2, pensa-se que a MBL reconhece os glicanos do vírus presentes no S1 e inibe a sua ligação com a ACE2 (Boechat et al., 2021).

Os IFNs constituem a primeira linha de defesa do organismo, fazendo parte da imunidade inata os do tipo I e III. Em muitos casos de infeção estes conseguem combater a infeção pela ativação da imunidade adaptativa celular (Sette & Crotty, 2021). Após a interação entre os derivados do vírus e os PRRs, há uma estimulação da produção de citocinas pró-inflamatórias e de IFNs dos tipos I e III. Através da via de sinalização, os interferões vão induzir a expressão de genes estimulados pelos IFN, que vão resultar em

duas vias de defesa: a via de resistência celular e a via de recrutamento pela produção de quimiocinas (Boechat et al., 2021). O SARS-CoV-2 induz uma baixa produção de IFN dos tipos I e III e induz uma maior produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, que leva a um maior risco de doença severa (Sette & Crotty, 2021). As IL-1 são citocinas importantes na mediação da inflamação que também fazem parte da resposta à infeção por SARS-CoV-2. É produzida principalmente por macrófagos mononucleares ativados e pode induzir a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e o TNF. Estas citocinas podem ter um efeito protetor quando produzidas em baixas quantidades, contudo altas quantidades podem ser prejudiciais. O SARS-CoV-2, ao ativar as IL-1, pode estimular a secreção de IL-6 e de TNF, que desencadeiam uma tempestade de citocinas com efeitos pulmonares e sistémicos graves (Boechat et al., 2021). Outro componente importante da resposta imune inata é a presença de neutrófilos, que também podem estar envolvidos na patogénese da COVID-19 (Schultze & Aschenbrenner, 2021). O SARS-CoV-2 induz a produção de quimiocinas que recrutam neutrófilos para o local da infeção, libertando NETs de DNA (como as histonas ou proteínas microbicidas) em resposta à ativação dos PPRs ou quimiocinas. Embora os NETs tenham atividade microbicida, a sua formação estimula muitos processos de doença, podendo desencadear uma cascata de reações inflamatórias que destroem os tecidos circundantes e resultar em danos permanentes nos órgãos pulmonares, cardiovasculares e renais (Boechat et al., 2021). Em resposta à infeção por SARS-CoV-2, a imunidade adaptativa celular estimula a produção de células T CD4+ e células T CD8+. As CD4+ encontram-se associadas à infeção primária estando associadas ao controlo da infeção. A produção de anticorpos anti-S (proteína S do SARS-CoV-2) depende das CD4+ especificas e, também com a produção de outras CD4+ especificas para proteínas estruturais do vírus. Estas células estão presentes nos pacientes em recuperação da doença, contudo a sua quantidade depende da expressão das proteínas estruturais do SARS-CoV-2, tendo como alvos principais as proteínas S, M e o Nucleocapsideo. Estas células controlam a infeção diferenciando-se em células Th1 e Tfh. As Th1 produzem IFNs e citocinas, enquanto que as Tfh ajudam as células B, fundamentais para o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes e de memória, fazendo parte da imunidade humoral. As CD4+ também ajudam as CD8+ que são cruciais para eliminação das células infetadas. A sua presença

em pacientes infetados por SARS-CoV-2 está associado a melhores resultados no desenvolvimento da doença. Estas também tem a capacidade de reconhecer as proteínas virais e são as que ficam em memória após a infeção. Tanto as CD4+ e CD8+ desempenham papéis complementares e importantes no combate da infeção por SARS-CoV-2 e, consequentemente na proteção contra a doença COVID-19 (Sette & Crotty, 2021).

A idade do hospedeiro também apresenta um papel importante no desenvolvimento da resposta imunitária e inflamação associada à COVID-19. O envelhecimento do sistema imunológico, conhecido como imunossenescência e inflamação crônica relacionada à idade (*inflammaging*), pode contribuir para a suscetibilidade e gravidade da infeção. A resposta imune inata pode ser comprometida em idades mais avançadas, resultando em maior risco de infeção grave e respostas inflamatórias desreguladas. Além disso, outras comorbidades, como doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade, também aumentam o risco de complicações graves da COVID-19 (Gil-Manso et al., 2022; Melenotte et al., 2020). Portanto, a compreensão dos mecanismos da resposta imune inata e sua relação com a gravidade da infeção pode ajudar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas e de prevenção, eficazes contra a doença COVID-19.

Gil Manso e seus colaboradores (2022) , demonstraram que o sistema de grupo sanguíneo ABO pode influenciar o desenvolvimento das células T de memória. No estudo indivíduos do grupo O conseguiriam eliminar o vírus mais rápido que os outros grupos. Os grupos não-O apresentaram níveis mais elevados de CD4+, IFN e TNF contra a proteína M. Também observaram uma correlação positiva da resposta humoral e celular nos indivíduos dos grupos não-O e não nos do grupo O. Com estes resultados os autores indicam que o grupo O pode não desenvolver uma boa resposta contra a proteína M. Por outro lado, indivíduos dos grupos não-O apresentaram níveis mais elevados TNF-α (relacionados às células T), e níveis significativamente menores de anti-Spike, após um longo período de tempo de infeção, em comparação com os indivíduos do grupo O. Assim, mesmo que a resposta de células T de memória tenha sido inicialmente maior nos

indivíduos não-O, a resposta imunológica pareceu diminuir ao longo do tempo (Gil-Manso et al., 2022).

Limitações do estudo

O estudo que se apresenta tem limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados.

Sob o ponto de vista da análise estatística, o estudo contou com número reduzido de participantes, o que pode comprometer a representatividade dos resultados e limitar a generalização de conclusões para a população em geral.

O processo de sequenciação génica é bastante moroso, o que pode ter impactado a obtenção de um maior número de amostras sequenciadas. Além disso foi necessário estabelecer protocolos com novas abordagens no tratamento do produto a sequenciar. Poucos dados sobre frequências genotípicas na nossa população para comparação: a falta de dados disponíveis sobre as frequências genotípicas na nossa população dificulta a comparação dos resultados do estudo com outras populações, limitando a capacidade de entender se os resultados são específicos para nossa região ou se são semelhantes a estudos em outros locais, o que pode restringir a interpretação e a relevância dos resultados obtidos.

O estabelecimento das frequências génicas mais específicas ficou condicionada pelo elevado número de combinações observadas, fazendo com que todas as análises ficassem condicionadas pela ausência de robustez estatística e por conseguinte a análise de associação.

CAPÍTULO VI – CONCLUSÃO E PERPETIVAS FUTURAS

Estudos sobre a suscetibilidade para as doenças virais continuam a ser de carácter importante, uma vez que pode ser uma ferramenta fundamental para a implementação de estratégias de prevenção e terapêutica. A sua relação com o sistema ABO ajuda neste aspeto, dado que a variação deste sistema entre as populações pode contribuir para as diferenças observadas em termos de infeção. O sistema ABO pode ser caracterizado pela presença ou ausência de antigénios A e/ou B na membrana dos eritrócitos, que se pode classificar em diversos fenótipos e genótipos, sendo as suas frequências variáveis entre as populações. De acordo com vários estudos, o sistema ABO já tem sido associado a outros vírus, como o norovírus, rotavírus ou HIV, contudo os mecanismos presentes nesta influência ainda carecem de mais compreensão. É de importância relembrar que só o sistema ABO em si não deve ser considerado como fator único para a associação, uma vez que existem outros fatores como a idade, sexo, imunidade e exposição, que devem ser tomados em consideração no que toca à resposta imune do hospedeiro.

O estudo do sistema de grupo sanguíneo ABO, não só a nível fenotípico mas sim a nível genotípico pode ser uma mais-valia para a avaliação do risco e severidade de certos indivíduos para a doença da COVID-19, uma vez que pode oferecer informações sobre como as variações genéticas interferem na suscetibilidade de infeção. A constante evolução do vírus e certas características bioquímicas a nível da variação dos SNP podem contribuir para o seu desenvolvimento ou proteção. No entanto, estudos de associação entre o sistema ABO e a COVID-19 não são consistentes, o que mais uma vez nos leva a não invalidar outros fatores que podem levar à manifestação da doença e até estarem relacionados com os mecanismos de infeção.

Neste estudo o grupo O apresentou um maior risco de infeção comparativamente aos outros grupos. Não houve qualquer significância entre a severidade da doença e o sistema de grupo sanguíneo ABO, o que já foi demonstrado em outros estudos de associação. O que nos leva a admitir que fatores como a idade,

comorbidades, exposição ou qualquer outro fator poderá estar a condicionar de uma forma mais relevante a severidade da doença.

A sequenciação de 155 amostras, para as regiões selecionadas, vem contribuir para ampliar o conhecimento da genética do sistema ABO na população portuguesa. o que poderá ter implicações não só para o esclarecimento da associação do ABO e o risco para a COVID-19, bem como também para a medicina transfusional. As informações obtidas através da sequenciação podem ajudar a identificar variações genéticas raras ou novas classes genotípicas que podem influenciar a expressão dos antigénios do sistema ABO nos eritrócitos. Isto é relevante para a seleção de dadores compatíveis e para evitar reações transfusionais adversas.

A realização de mais estudos, com uma amostra mais representativa, com acesso a mais informação sobre as condições clínicas dos participantes, é de extrema importância para uma compreensão mais profunda das frequências genotípicas numa população específica. Esses estudos também desempenham um papel fundamental na determinação da estrutura haplotípica, e na análise do impacto das variações genéticas na suscetibilidade a doenças, para além da COVID-19.

Uma amostragem mais abrangente, englobando diferentes regiões geográficas e grupos étnicos dentro do país, é fundamental para a identificação das frequências genotípicas, uma vez que a suscetibilidade de infeção pode variar dentro da população. Para além disso, estudos deste caracter podem ajudar na compreensão dos mecanismos de infeção envolvidos, tendo implicações importantes na saúde pública, orientando estratégias de prevenção, triagem e tratamento personalizado, e auxiliando na alocação eficiente de recursos de saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abegaz, S. B. (2021). Human ABO Blood Groups and Their Associations with Different Diseases. *BioMed Research International*, *2021*. https://doi.org/10.1155/2021/6629060

Agrawal, A., Tiwari, A. K., Mehta, N., Bhattacharya, P., Wankhede, R., Tulsiani, S., & Kamath, S. (2014). ABO and Rh (D) group distribution and gene frequency; the first multicentric study in India. *Asian Journal of Transfusion Science*, *8*(2), 121–125. https://doi.org/10.4103/0973-6247.137452

Aguiar, V. R. C., Augusto, D. G., Castelli, E. C., Hollenbach, J. A., Meyer, D., Nunes, K., & Petzl-Erler, M. L. (2021). An immunogenetic view of COVID-19. *Genetics and Molecular Biology*, *44*(1 suppl 1). https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2021-0036

Al-Bustan, S., El-Zawahri, M., Al-Azmi, D., & Al-Bashir, A.-A. (2002). Allele Frequencies and Molecular Genotyping of the ABO Blood Group System in a Kuwaiti Population. *International Journal of Hematology*, *75*(2), 147–153. https://doi.org/10.1007/BF02982019

Alzahrani, M. ;, Jawdat, D. ;, Alaskar, A. ;, Cereb, N. ;, & Hajeer, A. H. ; (2018). ABO and Rh blood group genotypes in a cohort of Saudi stem cell donors. *International Journal of Immunogenetics*, *45*(2), 63–64. https://doi.org/10.1111/iji.12354

Amoroso, A., Magistroni, P., Vespasiano, F., Bella, A., Bellino, S., Puoti, F., Alizzi, S., Vaisitti, T., Boros, S., Grossi, P. A., Trapani, S., Lombardini, L., Pezzotti, P., Deaglio, S., Brusaferro, S., & Cardillo, M. (2021). HLA and AB0 Polymorphisms May Influence SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 Severity. *Transplantation*, *105*(1), 193–200. https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003507

Ana Carla Batissoco, & Marcia Cristina Zago Novarett. (2003). Aspectos moleculares do Sistema Sanguíneo ABO. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, *25*(1), 47–58.

Apecu, R. O., Mulogo, E. M., Bagenda, F., & Byamungu, A. (2016). ABO and Rhesus (D) blood group distribution among blood donors in rural south western Uganda: a retrospective study. *BMC Research Notes*, *9*(1), 513. https://doi.org/10.1186/s13104-016-2299-5

Assefa, Y., Gilks, C. F., Reid, S., van de Pas, R., Gete, D. G., & Van Damme, W. (2022). Analysis of the COVID-19 pandemic: lessons towards a more effective response to public health emergencies. *Globalization and Health*, *18*(1), 10. https://doi.org/10.1186/s12992-022-00805-9

Assembleia da República Portuguesa. (2020). *Decreto do Presidente da República n.º 14-A/2020*. www.dre.pt

Bahls, M., Gaber, M. H., Jorstad, H. T., Mouine, N., Scherrenberg, M., & Marques-Sule, E. (2022). Impact of COVID-19 on young healthcare professionals. *European Journal of Preventive Cardiology*, *29*(9), e293–e294. https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwac113

Barnkob, M. B., Pottegård, A., Støvring, H., Haunstrup, T. M., Homburg, K., Larsen, R., Hansen, M. B., Titlestad, K., Aagaard, B., Møller, B. K., & Barington, T. (2020). Reduced prevalence of SARS-CoV-2 infection in ABO blood group O. *Blood Advances*, *4*(20), 4990–4993. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002657

BEHAL, R., JAIN, R., BEHAL, K. K., & DHOLE, T. N. (2010). Variation in the host ABO blood group may be associated with susceptibility to hepatitis C virus infection. *Epidemiology and Infection*, *138*(8), 1096–1099. https://doi.org/10.1017/S0950268809991117

Berry, A., Kapelus, D., Singh, P., Groome, M., & de Assis Rosa, D. (2023). ABO blood types, but not Secretor or Lewis blood types, influence strength of antibody response to Hepatitis B vaccine in Black South African children. *Vaccine*, *41*(24), 3617–3626. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.04.051

Bhattacharjee, S., Banerjee, M., & Pal, R. (2022). ABO blood groups and severe outcomes in COVID-19: A meta-analysis. *Postgraduate Medical Journal*, *98*(e2), e136–e137. https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-139248

Bloch, E. M., Patel, E. U., Marshall, C., Littlefield, K., Goel, R., Grossman, B. J., Winters, J. L., Shrestha, R., Burgess, I., Laeyendecker, O., Shoham, S., Sullivan, D., Gehrie, E. A., Redd, A. D., Quinn, T. C., Casadevall, A., Pekosz, A., & Tobian, A. A. R. (2021). ABO blood group and SARS-CoV-2 antibody response in a convalescent donor population. *Vox Sanguinis*, *116*(7), 766–773. https://doi.org/10.1111/vox.13070

Blumenfeld, O. O., & Patnaik, S. K. (2004). Allelic genes of blood group antigens: A source of human mutations and cSNPs documented in the Blood Group Antigen Gene Mutation Database. *Human Mutation*, *23*(1), 8–16. https://doi.org/10.1002/humu.10296

Boaventura, V., Cerqueira-Silva, T., Santos, L. A., Oliveira, M. S., Khouri, R., Barral, A., & Barral-Netto, M. (2020). Testes diagnósticos na COVID-19. In *Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais* (Vol. 8, pp. 1–24). EDUFBA. https://doi.org/10.9771/9786556300443.008

Boechat, J. L., Chora, I., Morais, A., & Delgado, L. (2021). The immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 immunopathology – Current perspectives. *Pulmonology*, *27*(5), 423–437. https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2021.03.008

Bonilla, F. A. ;, & Oettgen, H. C. ; (2010). Adaptive immunity. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*, 33–40. https://doi.org/doi:10.1016/j.jaci.2009.09.017

Borges, A. A., Andreia A. Suzukawa, Camila Zanluca, & Claudia N. Duarte dos Santos. (2020). SARS-CoV-2: origem, estrutura, morfogênese e transmissão. In *Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos,*

clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais (pp. 1–21). EDUFBA. https://doi.org/10.9771/9786556300443.002

Borges, A. A., Suzukawa, A. A., Zanluca, C., & Santos, C. N. D. (2020). SARS-CoV-2: origem, estrutura, morfogênese e transmissão. In *Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais*. EDUFBA. https://doi.org/10.9771/9786556300443.002

Bullerdiek, J., Reisinger, E., Rommel, B., & Dotzauer, A. (2022). ABO blood groups and the risk of SARS-CoV-2 infection. In *Protoplasma* (Vol. 259, Issue 6, pp. 1381–1395). Springer. https://doi.org/10.1007/s00709-022-01754-1

Carvalho, D. B., de Mattos, L. C., Souza-Neiras, W. C., Bonini-Domingos, C. R., Csimo, A. B., Storti-Melo, L. M., Cassiano, G. C., Couto, A. A. A., Cordeiro, A. J., Rossit, A. R. B., & Machado, R. L. D. (2010). Frequency of ABO blood group system polymorphisms in Plasmodium falciparum malaria patients and blood donors from the Brazilian Amazon region. *Genetics and Molecular Research*, *9*(3), 1443–1449. https://doi.org/10.4238/vol9-3gmr803

Chandler, T., Hiller, J., Peine, S., & Stargardt, T. (2020). Blood donation and donors: insights from a large German teaching hospital (2008–2017). *Vox Sanguinis*, *115*(1), 27–35. https://doi.org/10.1111/VOX.12853

Chen, H., Horita, N., Matsumoto, H., Namkoong, H., Hara, Y., Kobayashi, N., & Kaneko, T. (2021). ABO blood group as a risk factor for tuberculosis: A network meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, *104*, 701–707. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.01.057

Chen, X., Liu, S., Goraya, M. U., Maarouf, M., Huang, S., & Chen, J.-L. (2018). Host Immune Response to Influenza A Virus Infection. *Frontiers in Immunology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00320

Chen, Y., Klein, S. L., Garibaldi, B. T., Li, H., Wu, C., Osevala, N. M., Li, T., Margolick, J. B., Pawelec, G., & Leng, S. X. (2021). Aging in COVID-19: Vulnerability,

immunity and intervention. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 65). Elsevier Ireland Ltd. https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101205

Chuang, C. H., Janapatla, R. P., Wang, Y. H., Chang, H. J., Chen, C. L., & Chiu, C. H. (2023). Association between histo-blood group antigens and Pseudomonas aeruginosa-associated diarrheal diseases. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2022.12.008

Chun, S., Choi, S., Yu, H., B.S., & Cho, D. (2019). *Cis* -AB, the Blood Group of Many Faces, Is a Conundrum to the Novice Eye. *Annals of Laboratory Medicine*, *39*(2), 115–120. https://doi.org/10.3343/alm.2019.39.2.115

Daniels, G. (2005). The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transplant Immunology*, *14*(3-4 SPEC. ISS.), 143–153. https://doi.org/10.1016/j.trim.2005.03.003

Davison, G. M., Hendrickse, H. L., & Matsha, T. E. (2018). The relationship between immunogenic red blood cell antigens and Human Immunodeficiency Virus infection. *Transfusion and Apheresis Science*, *57*(1), 58–62. https://doi.org/10.1016/j.transci.2017.11.033

De Mattos, L. C., & Moreira, H. W. (2004). Genetic of the ABO blood system and its link with the immune system A genética do sistema ABO e sua relação com o sistema imune. In *Rev. bras. hematol. hemoter* (Vol. 26, Issue 1).

Dean L. (2005a). Blood group antigens are surface markers on the. In *Chapter 2, Blood group antigens are surface markers on the red blood cell membrane.*

Dean L. (2005b). The ABO blood group. In *Blood Groups and Red Cell Antigens*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).

Dessie, Z. G., & Zewotir, T. (2021). Mortality-related risk factors of COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 42 studies and 423,117 patients. *BMC Infectious Diseases*, *21*(1). https://doi.org/10.1186/s12879-021-06536-3

Direção Geral de Saúde. (2020a, March 3). *SARS-COV-2/ COVID-19: RELATÓRIO DE SITUAÇÃO-1*. Direção Geral de Saúde. https://covid19.min-saude.pt/wp-content/uploads/2022/03/01_DGS_boletim_20200303_pdf-283kb.pdf

Direção Geral de Saúde. (2020b, December 31). *SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA EM PORTUGAL DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM INTERNAMENTO*. Direção Geral de Saúde. https://covid19.min-saude.pt/wp-content/uploads/2022/03/304_DGS_boletim_20201231_pdf-291kb.pdf

Duran, J. A., Chabert, T., Rodrigues, F., & Pestana, D. (2007). *DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS SANGUÍNEOS NA POPULAÇÃO PORTUGUESA* (Vol. 29). http://www.ipst.pt/files/IPST/INFORMACAO_DOCUMENTACAO/AB0_29_2007_pag_5a17.pdf

Ellinghaus D., Degenhardt F., Bujanda L., Buti M., Albillos A., Invernizzi P., Fernández J., Prati D., Baselli G., Asselta R., Grimsrud MM., Milani C., Aziz F., Kässens J., May S., Wendorff M., Wienbrandt L., Uellendahl-Werth F., Zheng T., … Karlsen TH. (2020). Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *New England Journal of Medicine*, *383*(16), 1522–1534. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2020283

Enguita-Germán, M., Librero, J., Leache, L., Gutiérrez-Valencia, M., Tamayo, I., Jericó, C., Gorricho, J., & García-Erce, J. A. (2022). Role of the AB0 blood group in COVID-19 infection and complications: A population-based study. *Transfusion and Apheresis Science*. https://doi.org/10.1016/j.transci.2022.103357

Ewald, D. R., & Sumner, S. C. J. (2016). Blood type biochemistry and human disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, *8*(6), 517–535. https://doi.org/10.1002/wsbm.1355

Fattorini, D., & Regoli, F. (2020). Role of the chronic air pollution levels in the Covid-19 outbreak risk in Italy. In *Environmental Pollution* (Vol. 264). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114732

Fernandez-Botran, R. (2021). Lack of Association of the ABO Blood Group with COVID-19 risk and Severity in Hospitalized Patients in Louisville, KY. *Journal of Respiratory Infections*, *5*(1), 1–11. https://doi.org/10.18297/jri/vol5/iss1/1

Filomena, S., & Pimenta, R. (2012). *Desenvolvimento de um sistema à escala reduzida para determinação do tipo de sangue humano* [Universidade do Minho]. https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/23513/1/Sara%20Filomena%20Ribeiro%20Pimenta.pdf

Flores, E. F. (2017). Interações dos vírus com as células e com os hospedeiros. In *Patogenia das infecções víricas* (pp. 187–236). Universidade de São Paulo.

Franchini, M., & Bonfanti, C. (2015). Evolutionary aspects of ABO blood group in humans. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 444, pp. 66–71). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.02.016

Franchini, M., & Liumbruno, G. M. (2013). ABO blood group: Old dogma, new perspectives. In *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (Vol. 51, Issue 8, pp. 1545–1553). https://doi.org/10.1515/cclm-2013-0168

Fung, M. K., Grossman, B. J., Hillyer, C. D., & Westhoff, C. M. (2014). *Technical Manual* (18th ed.). aaBB.

Garg, I., Srivastava, S., Dogra, V., Bargotya, M., Bhattar, S., Gupta, U., Jain, S., Hussain, J., Hembrom, A. A., Ghosh, N., Kumar, V., Kumar, B., Varshney, R., & Ganju, L. (2021). Potential association of COVID-19 and ABO blood group: An Indian study. *Microbial Pathogenesis*, *158*. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105008

Gil-Manso, S., Miguens Blanco, I., Motyka, B., Halpin, A., López-Esteban, R., Pérez-Fernández, V. A., Carbonell, D., López-Fernández, L. A., West, L., Correa-Rocha, R., & Pion, M. (2022). ABO blood group is involved in the quality of the specific immune response anti-SARS-CoV-2. *Virulence*, *13*(1), 30–45. https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2019959

Goebel, M., Halm-Heinrich, I., Parkner, A., Rink, G., Heim, M. U., & Bugert, P. (2013). A novel ABO gene variant leads to discrepant results in forward/reverse and molecular blood grouping. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, *40*(6), 454–458. https://doi.org/10.1159/000356378

Goel, Ruchika, Bloch, Evan M., Pirenne, France, Al-Riyami, A. Z., Crowe, E., Dau, L., Land, K., Townsend, M., Jecko, T., Rahimi-Levene, N., Patidar, G., Josephson, C. D., Arora, S., Vermeulen, M., Vrielink, H., Montemayor, C., … Spitalnik, S. L. (2021). ABO blood group and COVID-19: a review on behalf of the ISBT COVID-19 Working Group. In *Vox Sanguinis* (Vol. 116, Issue 8, pp. 849–861). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1111/vox.13076

Greco, S., Bella, A., Bonsi, B., Fabbri, N., Califano, A., Morrone, S., Chessa, P., Pistolesi, C., Zuliani, G., De Motoli, F., Manfredini, R., De Giorgi, A., & Passaro, A. (2021). SARS-CoV-2 infection and H1N1 vaccination: does a relationship between the two factors really exist? A retrospective analysis of a territorial cohort in Ferrara, Italy. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *25*(6), 2795–2801. https://doi.org/10.26355/eurrev_202103_25441

Halim, M. R., Saha, S., Haque, I. U., Jesmin, S., Nishat, R. J., Islam, A. S. M. D. A., Roy, S., Haque, M. M. A., Islam, M. M., Hamid, T., Ahmed, K. N., Talukder, M. A. I., Ahmed, A., Hasan, E., Ananna, N., Mohsin, F. M., & Hawlader, M. D. H. (2021). ABO blood group and outcomes in patients with COVID-19 admitted in the intensive care unit (ICU): A retrospective study in a tertiary-level hospital in Bangladesh. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*, *14*, 2429–2436. https://doi.org/10.2147/JMDH.S330958

Harris, J. B., & La Rocque, R. C. (2016). Cholera and ABO blood group: Understanding an ancient association. In *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (Vol. 95, Issue 2, pp. 263–264). American Society of Tropical Medicine and Hygiene. https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0440

Hennessy, E. P., Green, A. D., Connor, M. P., Darby, R., & MacDonald, P. (2003). Norwalk Virus Infection and Disease Is Associated with ABO Histo–Blood Group Type. *The Journal of Infectious Diseases*, *188*(1), 176–177. https://doi.org/10.1086/375829

Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, *181*(2), 271-280.e8. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052

Hutson, A. M., Atmar, R. L., Graham, D. Y., & Estes, M. K. (2002). Norwalk Virus Infection and Disease Is Associated with ABO Histo–Blood Group Type. *The Journal of Infectious Diseases*, *185*(9), 1335–1337. https://doi.org/10.1086/339883

Idrees, M., Khan, M. I., & Malik, S. N. (2022). DISTRIBUTION OF DIFFERENT BLOOD GROUPS DATA FROM BLOOD BANK REGISTRY IN PESHAWAR, PAKISTAN. *Journal of Postgraduate Medical Institute*, *36*(4), 259–262. https://doi.org/10.54079/jpmi.36.4.3097

Ishaq, U., Malik, A., Malik, J., Mehmood, A., Qureshi, A., Laique, T., Zaidi, S. M. J., Javaid, M., & Rana, A. S. (2021). Association of ABO blood group with COVID-19 severity, acute phase reactants and mortality. *PLoS ONE*, *16*(12 December). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261432

Isik, S., Cevik, S., Turhan, A. H., Baygul, A., & Hanimoglu, H. (2020). Abo and rhesus blood groups and risk of myelomeningocele. *Turkish Neurosurgery*. https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.28913-19.2

Jing, W., Zhao, S., Liu, J., & Liu, M. (2020). ABO blood groups and hepatitis B virus infection: A systematic review and meta-analysis. In *BMJ Open* (Vol. 10, Issue 1). BMJ Publishing Group. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-034114

Khder Mustafa, S., Zrar Omar, S., Kamal Ahmad, K., & Basil Khudhur, L. (2023). The association of ABO blood group distribution and clinical characteristics in patients with SARS-CoV-2. *Journal of Infection in Developing Countries*, *17*(1), 18–22. https://doi.org/10.3855/jidc.17430

KİRİŞCİ, Ö., ÖZLÜK, S., TOPALCA, Ü. S., & DOĞRAMACI KÖPRÜLÜ, N. (2021). Relationship of ABO Blood Groups to SARS-COV-2 Infection Causing COVID-19 Disease. *Konuralp Tıp Dergisi*. https://doi.org/10.18521/ktd.824963

Lanteri, M. C., Lee, T.-H., Wen, L., Kaidarova, Z., Bravo, M. D., Kiely, N. E., Kamel, H. T., Tobler, L. H., Norris, P. J., & Busch, M. P. (2014). West Nile virus nucleic acid persistence in whole blood months after clearance in plasma: implication for transfusion and transplantation safety. *Transfusion*, *54*(12), 3232–3241. https://doi.org/10.1111/trf.12764

Laxmidhar, R., Desai, C., Patel, P., & Laxmidhar, F. (2023). Adverse Effects Faced by Healthcare Workers While Using Personal Protective Equipment During the COVID-19 Pandemic in Civil Hospital, Ahmedabad. *Cureus*. https://doi.org/10.7759/cureus.38485

Legese, B., Shiferaw, M., Tamir, W., & Tiruneh, T. (2021). Distribution of abo and rhesus blood group phenotypes among blood donors at bahir dar blood bank, amhara, northwest ethiopia: A retrospective cross-sectional study. *Journal of Blood Medicine*, *12*, 849–854. https://doi.org/10.2147/JBM.S329360

Li, J., Huang, D. Q., Zou, B., Yang, H., Hui, W. Z., Rui, F., Yee, N. T. S., Liu, C., Nerurkar, S. N., Kai, J. C. Y., Teng, M. L. P., Li, X., Zeng, H., Borghi, J. A., Henry, L., Cheung, R., & Nguyen, M. H. (2021). Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. *Journal of Medical Virology*, *93*(3), 1449–1458. https://doi.org/10.1002/jmv.26424

Long, B., Carius, B. M., Chavez, S., Liang, S. Y., Brady, W. J., Koyfman, A., & Gottlieb, M. (2022). Clinical update on COVID-19 for the emergency clinician: Presentation

and evaluation. In *American Journal of Emergency Medicine* (Vol. 54, pp. 46–57). W.B. Saunders. https://doi.org/10.1016/j.ajem.2022.01.028

Lorente-González, M., Suarez-Ortiz, M., & Landete, P. (2022). Evolution and Clinical Trend of SARS-CoV-2 Variants. In *Open Respiratory Archives* (Vol. 4, Issue 2). Elsevier Espana S.L.U. https://doi.org/10.1016/j.opresp.2022.100169

Luo, J.-Q., He, F.-Z., Luo, Z.-Y., Wen, J.-G., Wang, L.-Y., Sun, N.-L., Tang, G.-F., Li, Q., Guo, D., Liu, Z.-Q., Zhou, H.-H., Chen, X.-P., & Zhang, W. (2014). Rs495828 polymorphism of the ABO gene is a predictor of enalapril-induced cough in Chinese patients with essential hypertension. *Pharmacogenetics and Genomics*, *24*(6), 306–313. https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000050

Maia, R., Carvalho, V., Faria, B., Miranda, I., Catarino, S., Teixeira, S., Lima, R., Minas, G., & Ribeiro, J. (2022). Diagnosis Methods for COVID-19: A Systematic Review. In *Micromachines* (Vol. 13, Issue 8). MDPI. https://doi.org/10.3390/mi13081349

Maniruzzaman, M., Islam, M. M., Ali, M. H., Mukerjee, N., Maitra, S., Kamal, M. A., Ghosh, A., Castrosanto, M. A., Alexiou, A., Ashraf, G. M., Tagde, P., & Rahman, M. H. (2022). COVID-19 diagnostic methods in developing countries. In *Environmental Science and Pollution Research* (Vol. 29, Issue 34, pp. 51384–51397). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/s11356-022-21041-z

Marionneau, S., Ruvoën, N., Le Moullac–Vaidye, B., Clement, M., Cailleau–Thomas, A., Ruiz–Palacois, G., Huang, P., Jiang, X., & Le Pendu, J. (2002). Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology*, *122*(7), 1967–1977. https://doi.org/10.1053/gast.2002.33661

Matzhold, E. M., Berghold, A., Bemelmans, M. K. B., Banfi, C., Stelzl, E., Kessler, H. H., Steinmetz, I., Krause, R., Wurzer, H., Schlenke, P., & Wagner, T. (2021). Lewis and <scp>ABO</scp> histo-blood types and the secretor status of patients

hospitalized with <scp>COVID</scp> -19 implicate a role for <scp>ABO</scp> antibodies in susceptibility to infection with <scp>SARS-CoV</scp> -2. *Transfusion*, *61*(9), 2736–2745. https://doi.org/10.1111/trf.16567

Melenotte, C., Silvin, A., Goubet, A.-G., Lahmar, I., Dubuisson, A., Zumla, A., Raoult, D., Merad, M., Gachot, B., Hénon, C., Solary, E., Fontenay, M., André, F., Maeurer, M., Ippolito, G., Piacentini, M., Wang, F.-S., Ginhoux, F., Marabelle, A., … Zitvogel, L. (2020). Immune responses during COVID-19 infection. *OncoImmunology*, *9*(1). https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1807836

Míria Dantas Pereira, Mara Dantas Pereira, Cleberson Franclin Tavares Costa, Cristiane Kelly Aquino dos Santos, & Estélio Henrique Martin Dantas. (2020). Aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos da COVID-19. *Journal of Health & Biological Sciences*, *8*(1), 1–8. https://doi.org/doi: 10.12662/2317-3206jhbs.v8i1.3297.p1-8.2020

Misevic, G. (2018). ABO blood group system. *Blood and Genomics*, *2*(2), 71–84. https://doi.org/10.46701/APJBG.2018022018113

Moorjani, P., Patterson, N., Hirschhorn, J. N., Keinan, A., Hao, L., Atzmon, G., Burns, E., Ostrer, H., Price, A. L., & Reich, D. (2011). The History of African Gene Flow into Southern Europeans, Levantines, and Jews. *PLoS Genetics*, *7*(4), e1001373. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001373

Mouffak, S., Shubbar, Q., Saleh, E., & El-Awady, R. (2021). Recent advances in management of COVID-19: A review. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 143). Elsevier Masson s.r.l. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112107

Mourant, A. E., & Watkin, I. Morgan. (1952). Blood groups, anthropology and languagein wales and the western countries. *John Innes Institution and National Blood Transfusion Service, Wales*.

Muñiz-Diaz, E., Llopis, J., Parra, R., Roig, I., Ferrer, G., Grifols, J., Millán, A., Ene, G., Ramiro, L., Maglio, L., García, N., Pinacho, A., Jaramillo, A., Peró, A., Artaza, G.,

Vallés, R., Sauleda, S., Puig, Ll., & Contreras, E. (2021). Relationship between the ABO blood group and COVID-19 susceptibility, severity and mortality in two cohorts of patients. *Blood Transfusion*, *19*(1), 54–63. https://doi.org/10.2450/2020.0256-20

Murugananthan, K., Subramaniyam, S., Kumanan, T., Owens, L., Ketheesan, N., & Noordeen, F. (2018). Blood group AB is associated with severe forms of dengue virus infection. *VirusDisease*, *29*(1), 103–105. https://doi.org/10.1007/s13337-018-0426-8

Nascimento, C. M. A., Souza, C. D. F., Oliveira Silva, L. E., Silva, W. O., Barbosa, N. A., Carmo, R. F., Lima Andrade, E., Oliveira Teixeira, S. H., & Rocha, T. J. M. (2022). COVID-19 risk areas associated with social vulnerability in northeastern Brazil: An ecological study in 2020. *Journal of Infection in Developing Countries*, *16*(8), 1285–1293. https://doi.org/10.3855/jidc.15214

National Health Service. (2023). *Blood groups*. National Health Service.

Netea, M. G., Schlitzer, A., Placek, K., Joosten, L. A. B., & Schultze, J. L. (2019). Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host & Microbe*, *25*(1), 13–26. https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.006

Nogueira, P. J., Nobre, M. de A., Costa, A., Ribeiro, R. M., Furtado, C., Nicolau, L. B., Camarinha, C., Luís, M., Abrantes, R., & Carneiro, A. V. (2020). The role of health preconditions on covid-19 deaths in Portugal: Evidence from surveillance data of the first 20293 infection cases. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(8), 1–16. https://doi.org/10.3390/jcm9082368

Noori, M., Shokri, P., Nejadghaderi, S. A., Golmohammadi, S., Carson-Chahhoud, K., Bragazzi, N. L., Ansarin, K., Kolahi, A. A., Arshi, S., & Safiri, S. (2022). ABO blood groups and risk of human immunodeficiency virus infection: A systematic

review and meta-analysis. In *Reviews in Medical Virology* (Vol. 32, Issue 3). John Wiley and Sons Ltd. https://doi.org/10.1002/rmv.2298

Ochani, R. K., Kumar Ochani, R., Asad, A., Yasmin, F., Shaikh, S., Khalid, H., Batra, S., Rizwan Sohail, M., Mahmood, S. F., Ochani, R., Arshad, M. H., Kumar, A., Surani, S., Civil, R. K. M. P., Karachi, H., & Karachi, P. ; (2021). COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. In *Le Infezioni in Medicina, n* (Vol. 20).

Oliveira, V. F. de, Pianezzer, G. A., & Afonso, S. M. S. (2021). O equilíbrio de Hardy-Weinberg no sistema sanguíneo ABO: um estudo de caso em Engenheiro Coelho – SP. *Ciência e Natura*, *43*, e16. https://doi.org/10.5902/2179460X43422

Ouchetto, O., & Drissi Bourhanbour, A. (2021). Risk Factors of COVID-19 Patients. In *Disaster Medicine and Public Health Preparedness*. Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/dmp.2021.7

Pourali, F., Afshari, M., Alizadeh-Navaei, R., Javidnia, J., Moosazadeh, M., & Hessami, A. (2020). Relationship between blood group and risk of infection and death in COVID-19: a live meta-analysis. *New Microbes and New Infections*, *37*, 100743. https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100743

Rahman, S., Montero, M. T. V., Rowe, K., Kirton, R., & Kunik, F. (2021). Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, *14*(5), 601–621. https://doi.org/10.1080/17512433.2021.1902303

Rocha, P., Pigozzo, A., Quintela, B., Macedo, G., Santos, R., & Lobosco, M. (2012). Modelling the Innate Immune System. In *Bio-Inspired Computational Algorithms and Their Applications* (Vol. 1, pp. 351–370). https://doi.org/10.5772/38690

Rodrigues Neves, D., Moraes Carvalho, E., Andrade da Silva, R., de Oliveira Mendes, S., Maria Alves, S., & Osvaldo Medeiros, M. (2015). *ESTUDO GENÉTICO-*

POPULACIONAL DOS SISTEMAS DE GRUPOS SANGUÍNEOS ABO E RH DOS DOADORES DE SANGUE EM RONDONÓPOLIS-MT GENETIC STUDY POPULATION-OF BLOOD GROUP SYSTEMS ABO AND RH OF BLOOD DONORS IN RONDONÓPOLIS-MT (Vol. 14).

Romanos-Sirakis, E. C., & Desai, D. (2022). ABO Blood Group System. *Clinical Pathology, Hematology and Blood Banking (For DMLT Students)*, 287–287. https://doi.org/10.5005/jp/books/12973_37

Sabir, A., Iftikhar, A., Ijaz, M. U., Hussain, G., Rasul, A., Iqbal, R. K., Sajid, F., & Anwar, H. (2021). Retrospective study of frequency of ABO and Rhesus blood group among population of Safdarabad and Faisalabad cities of Pakistan. *BMC Research Notes*, *14*(1). https://doi.org/10.1186/s13104-020-05429-z

Santos-Neto, A. G. dos, Santos, A. de F., Santos, J. R. dos, Alves, L. L., Ramos, A. C. S., Santana, A. A. M., Santos, I. D. D. dos, & Gaspar, L. M. do A. C. (2021). COVID-19: Metodologias de diagnóstico. *Research, Society and Development*, *10*(5), e48810515114. https://doi.org/10.33448/rsd-v10i5.15114

Sardu, C., Marfella, R., Maggi, P., Messina, V., Cirillo, P., Codella, V., Gambardella, J., Sardu, A., Gatta, G., Santulli, G., & Paolisso, G. (2020). Implications of AB0 blood group in hypertensive patients with covid-19. *BMC Cardiovascular Disorders*, *20*(1), 373. https://doi.org/10.1186/s12872-020-01658-z

Schultze, J. L., & Aschenbrenner, A. C. (2021). COVID-19 and the human innate immune system. *Cell*, *184*(7), 1671–1692. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.029

Seltsam, A., Hallensleben, M., Kollmann, A., Burkhart, J., & Blasczyk, R. (2003). Systematic analysis of the ABO gene diversity within exons 6 and 7 by PCR screening reveals new ABO alleles. *Transfusion*, *43*(4), 428–439. https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2003.00321.x

Serviço Nacional de Saúde. (2022, November 30). *COVID-19: Quais os testes disponíveis em Portugal?* Direção Geral de Saúde.

Sette, A., & Crotty, S. (2021). Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, *184*(4), 861–880. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.007

Sharma, A., Ahmad Farouk, I., & Lal, S. K. (2021a). Covid-19: A review on the novel coronavirus disease evolution, transmission, detection, control and prevention. In *Viruses* (Vol. 13, Issue 2). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/v13020202

Sharma, A., Ahmad Farouk, I., & Lal, S. K. (2021b). Covid-19: A review on the novel coronavirus disease evolution, transmission, detection, control and prevention. In *Viruses* (Vol. 13, Issue 2). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/v13020202

Shibeeb, S., & Khan, A. (2022). ABO blood group association and COVID-19. COVID-19 susceptibility and severity: a review. In *Hematology, Transfusion and Cell Therapy* (Vol. 44, Issue 1, pp. 70–75). Elsevier Editora Ltda. https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.07.006

Shiloh, S., Rottmann, N., Tiete, J., Guatteri, M., Lachaux, A., Matossian, A., Hougardy, J.-M., Loas, G., & Rotsaert, M. (2019). *Mental Health Outcomes in Healthcare Workers in COVID-19 and Non-COVID-19 Care Units: A Cross-Sectional Survey in Belgium*. https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.612241

Slocum, E., Laskaris, Z., Hirschtick, J. L., McKane, P., & Fleischer, N. L. (2023). Lack of access to personal protective equipment is associated with severe COVID-19 symptoms among in-person workers. *Preventive Medicine Reports*, *32*, 102136. https://doi.org/10.1016/j.pmedr.2023.102136

Sun, L., Wang, X., Saredy, J., Yuan, Z., Yang, X., & Wang, H. (2020). Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in. *Redox Biology*, *37*. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101759

Sun, Y., Wang, L., Niu, J., Ma, T., Xing, L., Song, A., Wang, W., Shen, Y., & Yang, J. (2022). Distribution characteristics of ABO blood groups in China. *Heliyon*, *8*(9). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10568

Tamayo-Velasco, Á., Peñarrubia Ponce, M. J., Álvarez, F. J., Gonzalo-Benito, H., de la Fuente, I., Pérez-González, S., Rico, L., Jiménez García, M. T., Sánchez Rodríguez, A., Hijas Villaizan, M., Martín-Fernández, M., Dueñas, C., Gómez-Sánchez, E., Heredia-Rodríguez, M., Gorgojo-Galindo, Ó., Fernández, I., del Río, L., Carnicero-Frutos, I., Muñoz-Moreno, M. F., … Martínez-Paz, P. (2021). Can the Cytokine Profile According to ABO Blood Groups Be Related to Worse Outcome in COVID-19 Patients? Yes, They Can. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.726283

Thakur, S. K., Singh, S., Negi, D. K., & Sinha, A. K. (2023). Phenotype, allele and genotype frequency distribution of ABO and Rh(D) blood group among blood donors attending regional blood transfusion centre in Delhi, India. *Bioinformation*, *19*(4), 385–391.

The American Red Cross. (2023). *Blood Types Explained - A, B, AB and O | Red Cross Blood Services*. The American Red Cross. https://www.redcrossblood.org/donate-blood/blood-types.html

Ukaejiofo, E., & Nubila, T. (2007). Association between ABO, Rheus blood group systems and haemoglobin genotype among confirmed HIV/AIDS-TB co-infected patients in Enugu urban, Nigeria. *West African Journal of Medicine*, *25*(1). https://doi.org/10.4314/wajm.v25i1.28247

Uthaisangsook, S., Day, N. K. ;, Bahna, S. L. ;, Good, R. A. ;, & Haraguchi, S. (2002). Innate immunity and its role against infections. In *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* (Vol. 88, Issue 3, pp. 253–265). American College of Allergy, Asthma and Immunology. https://doi.org/10.1016/s1081-1206(10)62005-4

Velavan, T. P., Pallerla, S. R., Rüter, J., Augustin, Y., Kremsner, P. G., Krishna, S., & Meyer, C. G. (2021). Host genetic factors determining COVID-19 susceptibility and severity. In *EBioMedicine* (Vol. 72). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103629

Verma, M., Kulshrestha, S., & Puri, A. (2017). Genome sequencing. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1525, pp. 3–33). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6622-6_1

Vuhahula, E. A. M. ;, Yahaya, J., Morgan, E. D. ;, Othieno, E., Mollel, E., & Mremi, A. (2023). Frequency and distribution of ABO and Rh blood group systems among blood donors at the Northern Zone Blood Transfusion Center in Kilimanjaro, Tanzania: a retrospective cross-sectional study. *BMJ Open*, *13*(2). https://doi.org/10.1136/bmjopen-2022-068984

Wang, H., Zhang, J., Jia, L., Ai, J., Yu, Y., Wang, M., & Li, P. (2021). ABO blood group influence COVID-19 infection: A meta-analysis. *Journal of Infection in Developing Countries*, *15*(12), 1801–1807. https://doi.org/10.3855/jidc.13815

Watkins, W. M. (2001). The ABO blood group system: Historical background. In *Transfusion Medicine* (Vol. 11, Issue 4, pp. 243–265). https://doi.org/10.1046/j.1365-3148.2001.00321.x

World Health Organization. (2020a, March 31). *Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Situation Report – 71*. World Health Organization. https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-

World Health Organization. (2020b, December 29). *COVID-19 Weekly Epidemiological Update Global epidemiological situation*. World Health Organization. file:///C:/Users/silva/Downloads/20201229_Weekly_Epi_Update_Con_20_cleared.pdf

Wu, B.-B., Gu, D.-Z., Yu, J.-N., Yang, J., & Shen, W.-Q. (2020). Association between ABO blood groups and COVID-19 infection, severity and demise: A systematic review and meta-analysis. *Infection, Genetics and Evolution*, *84*, 104485. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104485

Yalaoui, S., Fakhfakh, R., Tritar, F., Chaouch, N., Mestiri, T., Besbes, M., & Hamzaoui, A. (2020). ABO blood groups and risk of covid-19. *La Tunisie Medicale*, *98*(12), 888–891.

Yamamoto, F. (2021). Molecular genetics and genomics of the ABO blood group system. In *Annals of Blood* (Vol. 6). AME Publishing Company. https://doi.org/10.21037/AOB-20-71

Yamamoto, F., McNeill, P. D., & Hakomori, S. (1995). Genomic organization of human histo-blood group ABO genes. *Glycobiology*, *5*(1), 51–58. https://doi.org/10.1093/glycob/5.1.51

Yüce, M., Filiztekin, E., & Özkaya, K. G. (2021). COVID-19 diagnosis —A review of current methods. *Biosensors and Bioelectronics*, *172*. https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112752

Zhang, Y., Garner, R., Salehi, S., Rocca, M. La, & Duncan, D. (2022). Molecular and antigen tests, and sample types for diagnosis of COVID-19: a review. In *Future Virology* (Vol. 17, Issue 9, pp. 675–685). Future Medicine Ltd. https://doi.org/10.2217/fvl-2021-0256

Zhao, J., Yang, Y., Huang, H.-P., Li, D., Gu, D.-F., Lu, X.-F., Zhang, Z., Liu, L., Liu, T., Liu, Y.-K., He, Y.-J., Sun, B., Wei, M.-L., Li, Y.-R., Yang, G.-Y., Wang, X.-H., Zhang, L., Zhou, X.-Y., Xing, M., & Wang, P. G. (2020). *Relationship between the ABO Blood Group and the COVID-19 Susceptibility*. https://doi.org/10.1101/2020.03.11.20031096

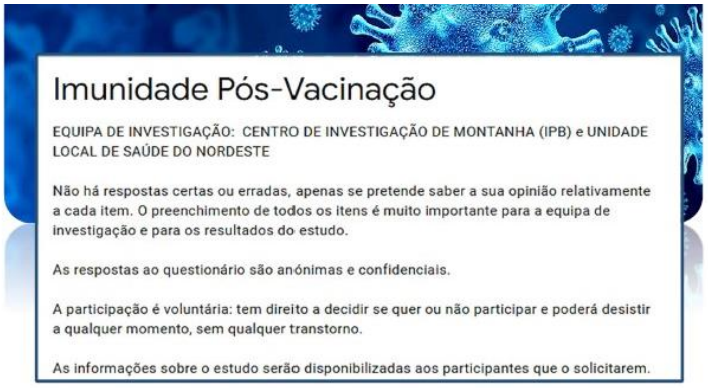
Zhou, Y., Zhang, L., Xie, Y. H., & Wu, J. (2022). Advancements in detection of SARS-CoV-2 infection for confronting COVID-19 pandemics. In *Laboratory Investigation* (Vol. 102, Issue 1, pp. 4–13). Springer Nature. https://doi.org/10.1038/s41374-021-00663-w

Zhu, F., Tao, S., Xu, X., Ying, Y., Hong, X., Zhu, H., & Yan, L. (2010). Distribution of ABO blood group allele and identification of three novel alleles in the Chinese Han

population. *Vox Sanguinis*, *98*(4), 554–559. https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01291.x

ANEXOS

Anexos- Instrumento de Recolha de Dados e Consentimentos



Imunidade Pós-Vacinação

EQUIPA DE INVESTIGAÇÃO: CENTRO DE INVESTIGAÇÃO DE MONTANHA (IPB) e UNIDADE LOCAL DE SAÚDE DO NORDESTE

Não há respostas certas ou erradas, apenas se pretende saber a sua opinião relativamente a cada item. O preenchimento de todos os itens é muito importante para a equipa de investigação e para os resultados do estudo.

As respostas ao questionário são anónimas e confidenciais.

A participação é voluntária: tem direito a decidir se quer ou não participar e poderá desistir a qualquer momento, sem qualquer transtorno.

As informações sobre o estudo serão disponibilizadas aos participantes que o solicitarem.

E-mail *

Seu e-mail

Número de ID de participante (a preencher pelo investigador responsável pela colheita).

Sua resposta

Aceita participar no estudo? *

- ◯ Sim
- ◯ Não

1

Com qual género se identifica? *

- ◯ Feminino
- ◯ Masculino
- ◯ Prefiro não dizer
- ◯ Outro:

Indique por favor a sua Profissão/Ocupação:

Sua resposta

Indique a data de nascimento *

Data

dd/mm/aaaa

Qual é a sua nacionalidade? *

Sua resposta

Indique o seu peso aproximado (Kg).

Sua resposta

Indique a sua altura (cm)

Sua resposta

2

É fumador?

- ◯ Sim
- ◯ Não

Se é fumador, indique há quanto tempo (meses, anos).

Sua resposta

Se é fumador indique o número de cigarros que fuma, em média, por dia.

- ◯ 10 ou menos
- ◯ de 11 a 20
- ◯ de 21 a 30
- ◯ Mais de 31
- ◯ Outro: _____

Se já foi fumador na passado, indique o número de anos em que fumou.

Sua resposta

Por favor, indique se tem algum destes sintomas ou doenças. *

- ☐ Diabetes
- ☐ Obesidade
- ☐ Asma
- ☐ Insuficiência Cardíaca
- ☐ Insuficiência Renal
- ☐ Tensão arterial alta
- ☐ Anemia
- ☐ Imunossupressão (SIDA, doenças autoimunes)
- ☐ Drepanocitose (anemia falciforme; anomalia da produção de hemoglobina, ...)
- ☐ Doenças inflamatórias (artrite reumatoide, a polimialgia, o lúpus e vasculites)
- ☐ Doença Oncológica
- ☐ Se teve doença oncológica, há quanto tempo acabou os tratamentos.....
- ☐ Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica
- ☐ Outro: _____

Toma alguma Medicação?

- ◯ Sim
- ◯ Não

Se sim, por favor selecione a medicação prescrita:

- [ ] Insulina
- [ ] Estatinas
- [ ] Antidepressivos
- [ ] Imunosupressores
- [ ] Antitrombóticos/Agregação plaquetária
- [ ] Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina (pressão arterial alta)
- [ ] Corticosteroides (ou corticoides, também conhecidos como cortisona, ação anti-inflamatória).
- [ ] Bloqueadores do recetor da Angiotensina II (Exantema cutâneo, tosse, angioedema, hiperpotassemia: doentes com insuficiência renal)
- [ ] Outro: _____

Recentemente realizou alguma cirurgia ou esteve internado por algum motivo?

- ◯ Sim
- ◯ Não

Em caso afirmativo, por favor indique o motivo e em que data ocorreu a hospitalização.

Sua resposta

Se é doente Oncológico, indique por favor há quanto tempo está em tratamento. Caso tenha terminado, por favor indique há quanto tempo terminou esse mesmo tratamento.

Sua resposta

Já testou positivo para o SARS-COV-2 *

- ◯ Sim
- ◯ Não

Teve sintomas? *

- ◯ sim
- ◯ Não

Em caso afirmativo teve algum destes sintomas?

- [ ] Febre (temperatura de 38ºC ou superior) há mais de 48 horas (a febre não baixa com os medicamentos, ou voltou a ter febre depois de ter estado um dia sem febre)
- [ ] Tosse persistente (superior a 5 dias) ou diferente do habitual
- [ ] Dificuldade respiratória (sente falta de ar em repouso ou em pequenos esforços, está a respirar mais depressa do que o habitual ou tem a boca ou unhas arroxeadas)
- [ ] Dor recente no peito ou nas costas (não considere dores de costas já diagnosticadas ou em tratamento)
- [ ] Vómitos persistentes e/ou diarreia grave (três ou mais episódios no mesmo dia, que impedem as suas atividades diárias)
- [ ] Tosse associada a dores de cabeça
- [ ] Tosse associada a dores musculares
- [ ] Perda ou alteração do paladar
- [ ] Perda do olfato
- [ ] Outro: _____

Em caso afirmativo, recebeu tratamento?

- [ ] Internado na Unidade COVID
- [ ] Internado na UCI
- [ ] Oxigénio
- [ ] Ventilação Mecânica
- [ ] Fui entubado
- [ ] Outro:

Já foi vacinado *

- ◯ Sim
- ◯ Não
- ◯ Não pretendo ser vacinado.

Em caso afirmativo:

- ◯ A 1ª doze
- ◯ Vacinação Completa
- ◯ Foi vacinado só com 1 dose por ter tido a COVID19
- ◯ Outro:

Se já foi vacinado em que data tomou a primeira dose?

Data

dd/mm/aaaa

Em que data tomou a segunda dose ?

Data

dd/mm/aaaa

7

Após a vacinação teve alguns sintomas? *

- ◯ Sim
- ◯ Não

Qual é a marca da vacina que lhe foi administrada? *

- ◯ mRNA - Pfizer-BioNTech
- ◯ mRNA-1273 Moderna
- ◯ Vacina baseada em vetores adenovirais, ChAdOx1-S AstraZeneca-Oxoford
- ◯ Vacina baseada em vetores adenovirais, COVID-19 Vaccine Janssen (Janssen Biologics)
- ◯ Outro:

Foi infetado após ser vacinado? *

- ◯ Sim
- ◯ Não

Se sim, apresentou sintomas? Indique os sintomas que apresentou tendo em conta os que descritos anteriormente.

Sua resposta

Qual o seu grupo sanguíneo?

- ◯ A
- ◯ B
- ◯ AB
- ◯ O
- ◯ Não Sabe

8

REPÚBLICA PORTUGUESA SAÚDE | SNS SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE | ULSNE

INFORMAÇÃO AO PARTICIPANTE

COVID-19: IMUNIDADE PÓS-VACINAÇÃO ESTUDO SEROLÓGICO NA POPULAÇÃO DE BRAGANÇA

O estudo para o qual pedimos a sua participação, tem como principal objetivo a quantificação de anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2 permitindo avaliar o "status" imunitário em indivíduos vacinados. Para tal, será realizado um imunoensaio quimioluminescente (SARS-CoV-2 IgG II de micropartículas - CMIA). Para a determinação quantitativa de anticorpos IgG (Spike) para SARS-CoV-2, será retirada uma amostra de sangue aos indivíduos recrutados para o estudo. Será aplicado um questionário sobre hábitos de vida e condições de saúde, incluindo se testou positivo para o SARS-CoV-2 antes da vacina ou mesmo depois da imunização.

CONSENTIMENTO INFORMADO, ESCLARECIDO E LIVRE

Confirmo que expliquei ao participante/representante legal, de forma adequada e compreensível, a investigação referida, os benefícios, os riscos e possíveis complicações associadas à sua realização.

Investigador responsável

Data: ___/___/___ _____

(assinatura)

Identificação do participante:

Nome_____ **BI/CC n.º**_____

PARTICIPANTE/REPRESENTANTE LEGAL

☐ Compreendi a explicação que me foi facultada acerca do estudo que se tenciona realizar. Solicitei todas as informações de que necessitei, sabendo que o esclarecimento é fundamental para uma boa decisão. Concordo em participar, respondendo às questões propostas e permitindo a recolha de amostras de sangue que serão utilizadas apenas para realizar as análises que me foram indicadas. Aceito ainda que sejam guardadas amostras que venham a ser utilizadas posteriormente, para isso serei contactado ou quem me representar legalmente. Concordo em colaborar no estudo,

O participante:

Data: ___/___/___ _____

(assinatura)

Nome (Representante legal): _____

BI/CC n.º_____ **Grau de parentesco** _____

Data: ___/___/___ _____

(assinatura)

Em atenção à "Declaração de Helsínquia" da Associação Médica Mundial e à Convenção sobre os Direitos do Homem e a Biomedicina do Conselho da Europa.

REPÚBLICA PORTUGUESA SAÚDE | SNS | ULSNE

Ide N.º 34/2021

Parecer da Comissão de Ética

Identificação do estudo:

Reunião ca 30.9.2021
que tenha, desde que haja
tenha consentimento informado
para a ULSNE.

Dr. Carlos Alberto Vaz
Presidente do
Conselho de Administração

COVID – 19: Imunidade Pós – Vacinação – Estudo Serológico na População do Nordeste de Portugal

Parecer da Comissão de Ética:

Em reunião de 09/09/2021, foi analisado o presente trabalho, tendo a CE considerado que deverá ser salvaguardado o consentimento informado nos casos em que o destinatário não reúna requisitos legais para o poder prestar (em função da idade, estado de consciência ou em situação de inabilitado).

Observada esta condição o estudo tem interesse científico para a comunidade e para a ULSNE e não tem qualquer custo direto ou indireto para a ULSNE.

A Presidente da Comissão de Ética da ULSNE, E.P.E.

Despacho do P.C.A.: