

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

RAYANE MARTINS BOTELHO

**ANÁLISE SÉRICA DE CITOCINAS E ANAFILOTOXINAS EM PACIENTES COM
COVID-19**

**MACEIÓ
2022**

RAYANE MARTINS BOTEHO

**ANÁLISE SÉRICA DE CITOCINAS E ANAFILOTÓXINAS EM PACIENTES COM
COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Urban Borbely
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Karen Steponavicius Cruz Borbely

**MACEIÓ
2022**

**Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

B748a Botelho, Rayane Martins.
Análise sérica de citocinas e anafilotoxinas em pacientes com covid-19 /
Rayane Martins Botelho. – 2022.
111 f. : il. color.

Orientador: Alexandre Urban Borbely.
Coorientadora: Karen Steponavicius Cruz Borbely.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal
de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 96-111.

1. SARS-CoV-2. 2. COVID-19. 3. Prognóstico. 4. Citocinas. 5.
Anafilotoxinas. I. Título.

CDU: 578.834: 612.017

*A todas as vítimas da pandemia de
COVID-19.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu eterno guia;

Aos meus pais e irmãos, por todo suporte, carinho e amor durante essa intensa caminhada. Ao meu noivo, Lucas Rodrigues, por trilhar esse caminho ao meu lado, por toda paciência, por me ouvir, sempre me dando forças e fornecendo incentivo nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Borbely, por todo conhecimento compartilhado, por não me deixar desistir e sempre incentivar a continuar nessa longa jornada da vida acadêmica. À minha Coorientadora Dra. Karen Borbely, pelo auxílio fornecido durante a realização dos experimentos, por tirar tantas dúvidas imunológicas.

Às minhas companheiras de luta, minhas Trofogirls, em especial a Eloiza Tanabe pela ajuda com os experimentos, pelas rápidas aulas de estatística, pelo auxílio durante toda a escrita dessa dissertação e pelas caronas até o laboratório; Ana Lucia Silva, por ser minha grande companheira, pela ajuda na separação das amostras e realização dos experimentos e análises dos dados; Keyla Nobre por todo suporte durante a realização da pesquisa e durante a escrita dessa dissertação; e Camila Mendes, por todo companheirismo e auxílio durante os experimentos.

Aos membros e professores do LBC, por todo suporte e auxílio durante o mestrado. E agradecer em especial à técnica Juliane Silva, que proporcionou o pleno funcionamento do laboratório durante esse período de crise que vivemos, permitindo que os experimentos fossem realizados.

Aos funcionários do HUPAA, por se arrisarem em meio a uma pandemia e por realizarem a coleta das amostras de sangue dos pacientes com COVID-19. Assim como, ao professor Dr. Thiago Sotero e as residentes Larrisa Pinto e Juliana Leal que realizaram a notificação dos novos pacientes que eram hospitalizados e as coletas dos dados clínicos.

A todos os professores do programa de pós-graduação em ciências da saúde por todo conhecimento repassado durante as aulas

E ao ministério da educação e a UFAL, que foram as instituições de fomento que permitiram que esse projeto pudesse ser concluído e executado com tanto êxito.

Obrigado a todos!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

RESUMO

Introdução: A infecção por síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (SARS-CoV-2) se espalhou rapidamente, resultando na pandemia da doença do coronavírus 2019 (COVID-19). A patogênese da COVID-19 está associada a uma resposta imune inadequada ou exagerada que pode resultar em níveis significativamente elevados de citocinas, aumento do surgimento de trombos, lesão pulmonar, miocardite aguda e falência de múltiplos órgãos. Embora vários dados tenham sido publicados, ainda existem lacunas de conhecimento e marcadores de prognóstico. Assim, nosso objetivo foi avaliar o perfil de citocinas e anafilotoxinas em pacientes com COVID-19 em Alagoas, Brasil, para encontrar marcadores de prognósticos.

Metodologia: Estudo observacional transversal, com 76 participantes, sendo 56 com COVID-19 com diagnóstico confirmado por qRT-PCR e 20 doadores sem COVID-19. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética humana (30732120.1.0000.5013). Os participantes do grupo controle possuíam idade, sexo e comorbidades semelhantes ao grupo COVID-19. As amostras de sangue foram obtidas assim que os pacientes chegaram ao HUPAA / UFAL e seu plasma foi quantificado para citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN- α 2, IFN- β , IFN- λ 1, IFN- λ 2 / 3, IFN- γ , TNF- α , IP-10, GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6 e IL-17A) e anafilotoxinas (C3a, C4a e C5a) por ensaios baseados em esferas de citometria de fluxo.

Resultados: Os pacientes com COVID-19 apresentaram níveis reduzidos de GM-CSF e níveis aumentados de C3a e C4a, que também foram encontrados como marcadores de gravidade. Também encontramos níveis aumentados de IL-10 e IL-12p70 em pacientes que foram ao óbito com COVID-19 em comparação com aqueles que receberam alta hospitalar. Idosos com COVID-19 tiveram aumento de IFN- λ 1, C3a e C4a em comparação com controles idosos. A comparação do gênero dos pacientes com COVID-19 mostrou que as mulheres tinham níveis aumentados de IFN- α 2, IFN- λ 2 / 3, IFN- γ e GM-CSF. Em comparação ao controle do mesmo gênero, as mulheres COVID-19 tiveram aumento de IFN- γ , C3a e C4a, enquanto os homens tiveram redução de IL-1 β , IL-12p70 e GM-CSF, e aumento de C3a e C4a. Por fim, a curva ROC das medidas C3a + C4a teve alta especificidade (100%) e sensibilidade (85%).

Conclusão: Idade, gênero e comorbidades alteram citocinas específicas que podem ser marcadores para elas, enquanto o aumento de IL-10 e IL-12p70 pode indicar mau prognóstico da COVID-19. C3a e C4a estavam notavelmente aumentados em pacientes com COVID-19 e poderiam ser marcadores da severidade da doença, indicando com alta precisão os pacientes que necessitariam de internação na UTI.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; Marcadores de prognóstico; citocinas e anafilotoxinas.

ABSTRACT

Introduction: The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection fastly spread, resulting in the pandemic coronavirus disease 2019 (COVID-19). The pathogenesis of COVID-19 is associated with an inadequate or exaggerated immune response that can result in significantly elevated levels of cytokines, increased thrombosis, lung injury, acute myocarditis and multiple organs failure. Although several data have been published, knowledge gaps still exist and prognostic markers are needed. As such, our aim was to evaluate the cytokines and anaphylotoxins profile in patients with COVID-19 in Alagoas, Brazil to find prognostic markers. **Methodology:** A cross-sectional observational study, with 76 participants, of which 56 had COVID-19 with diagnosis confirmed by qRT-PCR, while 20 were donors without COVID-19. The study was approved by the human ethical committee (30732120.1.0000.5013). Control participants were age, sex and comorbidities-matched to the COVID-19 group. Blood samples were obtained as soon as patients arrived in the HUPAA/UFAL and their plasma were quantified for cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN- α 2, IFN- β , IFN- λ 1, IFN- λ 2/3, IFN- γ , TNF- α , IP-10, GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6 and IL-17A) and anaphylotoxins (C3a, C4a and C5a) by flow cytometry bead-based assays. **Results:** COVID-19 patients had reduced levels of GM-CSF, and increased levels of C3a and C4a, which were also found as markers of severity. We also found increased levels of IL-10 and IL-12p70 in COVID-19 diseased patients in comparison to those hospital discharged. Elderly with COVID-19 had increased IFN- λ 1, C3a and C4a in comparison to elderly controls. Sex comparison of COVID-19 patients showed that women had increased levels of IFN- α 2, IFN- λ 2/3, IFN- γ and GM-CSF. In comparison to control of the same sex, COVID-19 women had increased IFN- γ , C3a and C4a, while men had reduced IL-1 β , IL-12p70 and GM-CSF, and increased C3a and C4a. Lastly, the ROC curve of C3a+C4a measures had high specificity (100%) and sensitivity (85%). **Conclusion:** Age, sex and comorbidities change specific cytokines that could be markers for them, while IL-10 and IL-12p70 increase could indicate a bad prognosis. C3a and C4a were remarkably increased in COVID-19 patients and could be markers of COVID-19 severity, indicating with high accuracy patients that would require ICU admission.

Keywords: SARS-CoV-2; Prognostic markers; cytokines and anaphylotoxins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Vias de ativação do sistema complemento.....	22
Figura 2 - Representação esquemática do complexo de ataque à membrana (MAC)	24
Figura 3 – Representação da estrutura do virion do coronavírus (CoV).....	34
Figura 4 – Representação esquemática da entrada do vírus SARS-CoV-2 na célula hospedeira.....	37
Figura 5 - Avaliação do nível sérico de citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 em relação a doadores controle.....	56
Figura 6 - Avaliação dos níveis séricos de citocinas em pacientes adultos menores de 60 anos	57
Figura 7 - Avaliação dos níveis séricos de citocinas em pacientes idosos.....	58
Figura 8 - Avaliação dos níveis séricos de citocinas em pacientes do sexo feminino	60
Figura 9 - Quantificação das citocinas em pacientes do sexo masculino.....	61
Figura 10 - Avaliação das citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 de acordo com o sexo.....	62
Figura 11 – Quantificação das citocinas nos pacientes portadores de hipertensão arterial sistêmica (HAS) e diagnosticados com COVID-19 comparados com o grupo controle com a mesma comorbidade.....	64
Figura 12 - Avaliação dos níveis séricos de citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 e portadores de hipertensão arterial sistêmica (HAS)	65
Figura 13 – Análise dos níveis séricos de citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 e portadores de <i>diabetes mellitus</i> tipo II (DMII).....	66
Figura 14 – Análise de citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 e portadores doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).....	67
Figura 15 - Análise quantitativa dos níveis séricos de citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 que possuíam câncer ou não, comparados com o grupo controle.....	68
Figura 16 – Quantificação dos níveis séricos de citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 de acordo com o escore SOFA (qSOFA).....	70
Figura 17 – Avaliação dos níveis de citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 submetidos ou não à ventilação mecânica (VM).....	71
Figura 18 - Avaliação dos níveis séricos de citocinas em relação ao desfecho clínico dos pacientes com COVID-19.....	73
Figura 19 – Quantificação dos níveis séricos de anafilotoxinas em pacientes portadores do SARS-CoV-2.....	76

Figura 20 – Avaliação dos níveis séricos das anafilotoxinas em pacientes diagnosticados com COVID-19, de acordo com a idade.....	77
Figura 21 – Avaliação dos níveis séricos das anafilotoxinas em pacientes dos sexos feminino e masculino diagnosticados com COVID-19.....	78
Figura 22 – Análise dos níveis séricos das anafilotoxinas em pacientes diagnosticados com COVID-19, correlacionada com a presença de comorbidades	79
Figura 23 – Análise dos níveis de anafilotoxinas em pacientes com COVID-19 de acordo com o escore qSOFA.....	80
Figura 24 – Avaliação das anafilotoxinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 submetidos ou não à ventilação mecânica (VM).....	81
Figura 25 – Avaliação dos níveis séricos de anafilotoxinas em pacientes diagnosticados com COVID-19, agrupados de acordo com o desfecho clínico.....	81
Figura 26 – Avaliação da curva de sobrevivência dos pacientes diagnosticados com COVID-19.....	83
Figura 27 – Avaliação do poder preditivo de C3a e C4a no prognóstico dos pacientes diagnosticados com COVID-19.....	85
Figura 28 – Ativação do sistema complemento desencadeia liberação de citocinas, inflamação e coagulação	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização demográfica e clínicas dos pacientes com a infecção por SARS-CoV-2 incluídos no estudo.....	54
Tabela 2 - Correlação dos níveis de citocinas com parâmetros laboratoriais em pacientes diagnosticados com COVID-19.....	75
Tabela 3 - Correlação dos níveis de anafilotoxinas com parâmetros laboratoriais em pacientes diagnosticados com COVID-19.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2019-nCoV - Novo coronavírus 2019

ACE2 - Enzima conversora de angiotensina 2

APN - Proteína aminopeptidase N

AUC - Área sobre a curva

CARDs - Caspases amino-terminais

CLRs - Receptores de lectina do tipo C

CoV – Coronavírus

COVID-19 - Doença do coronavírus 2019

CTD - Domínio carboxi-terminal

CTL – Controle

CTLs - Linfócitos T citotóxicos

DAMP - Padrões moleculares associados ao dano

DMII - *Diabetes mellitus* tipo II

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica

DPPa - Dipeptidil peptidase 4

DRC - Doença renal crônica

dsRNA - RNA de dupla fita

E – Proteína de envelope

EUA - Estados Unidos da América

fB - Fator B

fD - Fator D

FUT-175 – Futhan

GM-CSF - Fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos

HAS - Hipertensão arterial sistêmica

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HR - Risco relativo

HUPAA-UFAL - Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas

IC - Intervalo de confiança

IFN- α - Interferon- α

IFN- λ - Interferon- λ

IFN- β - Interferon- β

IFN- γ - Interferon- γ

Ig – Imunoglobulinas

IL- Interleucina

IQR - Intervalo interquartil

IRF - Fatores reguladores de interferons

Kb – Quilobases

LABOAL - Laboratório de Diagnóstico de Alagoas

LBC - Laboratório de Biologia Celular

LGP2 - Laboratório de Genética e Fisiologia 2

LPS – Lipopolisacarídeo

M – Proteína de membrana

MAC - Complexo de ataque à membrana

MASP - Serinoproteases associadas à manose

MBL - Lectina ligante de manose

MDA5 - Proteína 5 associada à diferenciação do melanoma

MERS-CoV – Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio

N – Proteína de nucleocapsídeo

NAb - Anticorpos naturais

NETs - Armadilhas extracelulares de neutrófilos

NF- κ B - Fator nuclear kappa B

NK - Células *Natural Killer*

NLRs - Receptores semelhantes a domínios de oligomerização de ligação a nucleotídeos

NOD - Receptores semelhantes a domínio de oligomerização de nucleotídeo

NSP - Proteínas não estruturais

OMS - Organização Mundial da Saúde

ORF - Estruturas de leitura aberta

PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos

PCR - Proteína C reativa

PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões

RBD - Domínios de ligação ao receptor

RIG-I/ RLRs - Receptores semelhantes ao gene I induzidos por ácido retinóico

RNA- Ácido ribonucléico

RNP - Complexo ribonucleoproteína helicoidal

ROC - Curva de característica de operação do receptor

S – Proteína Spike

SARS - Síndrome respiratória aguda grave

SARS-CoV – Coronavirus da Síndrome Respiratória Aguda Grave

SARS-CoV-2 – Coronavírus da Síndrome respiratória aguda grave 2

SDRA - Síndrome do desconforto respiratório agudo

SRA - Sistema renina-angiotensina

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCM - Linfócitos T de memória central

TEM - Linfócitos T de memória efetoras

TGF - Taxa de filtração glomerular

TGF- β - Fator transformador de crescimento- β

TLRs - Receptores semelhantes a Toll

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α

Treg - Linfócito T regulatório

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

VM - Ventilação mecânica

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Conceitos Básicos de Imunologia	19
2.1.1 Imunidade Inata	19
2.1.2 Imunidade Adaptativa	24
2.1.3 Citocinas	26
2.1.3.1 Interleucina-1 β (IL-1 β).....	27
2.1.3.2 Interleucina 2 (IL-2)	27
2.1.3.3 Interleucina 4 (IL-4)	27
2.1.3.4 Interleucina 6 (IL-6)	28
2.1.3.5 Interleucina 8 (IL-8)	28
2.1.3.6 Interleucina 10 (IL-10)	28
2.1.3.7 Interleucina 12p70 (IL-12p70)	29
2.1.3.8 Interleucina 17 A (IL-17A)	29
2.1.3.9 Fator de necrose tumoral- α (TNF- α)	30
2.1.3.10 Fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF)	30
2.1.3.11 Interferon- α (IFN- α)	30
2.1.3.12 Interferon- β (IFN- β)	31
2.1.3.13 Interferon- γ (IFN- γ).....	31
2.1.3.14 Interferon- λ (IFN- λ)	31
2.2. Coronavírus (CoV)	32
2.3 SARS-CoV-2 e suas Características clínicas	36
2.4 Resposta imune antiviral	39
2.5 Resposta imune contra o vírus SARS-CoV-2	42
3. OBJETIVOS	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Participantes	47
4.2. Critérios de inclusão e exclusão no estudo	47
4.2.1 Critérios de inclusão.....	47
4.2.2 Critérios de exclusão	48
4.3 Coleta de Sangue	48
4.4 Processamento e armazenamento das amostras	48
4.4 Dados clínicos e laboratoriais	49
4.3 Detecção de citocinas por citometria de fluxo	49

4.4 Análise estatística	50
5. RESULTADOS.....	52
5.1 Caracterização dos participantes diagnosticados com a infecção por SARS-CoV-2.....	52
5.2 Avaliação dos níveis séricos das citocinas por citometria de fluxo.....	55
5.2.1 Redução de IL-12p70 e GM-CSF em pacientes diagnosticados com COVID-19.....	55
5.2.2 Alteração dos níveis de citocinas em pacientes com COVID-19 idosos e adultos.....	55
5.2.3 Diferença nos níveis de citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 após comparação entre os sexos feminino e masculino.....	59
5.2.4 Níveis de citocinas em pacientes com COVID-19 e a influência da presença de comorbidades nessas moléculas.....	63
5.2.5 Avaliação da alteração nos níveis séricos das citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 de acordo com o escore qSOFA.....	69
5.2.6 Avaliação do impacto do uso da ventilação mecânica, como terapêutica para a infecção por SARS-CoV-2, na produção de citocinas.....	69
5.2.7 Alterações nos níveis séricos das citocinas dos pacientes diagnosticados COVID-19, de acordo com o desfecho clínico.....	72
5.2.8 Correlação entre os dados laboratoriais dos pacientes diagnosticados com COVID-19 e os níveis séricos das citocinas avaliadas.....	74
5.3 Avaliação dos níveis séricos das anafilotoxinas por citometria de fluxo.....	75
5.3.1 Alteração de C3a e C4a dos pacientes diagnosticados com COVID-19.....	75
5.3.2 C3a e C4a encontram-se alterados nos pacientes adultos e idosos com a infecção por SARS-CoV-2.....	76
5.3.3 Alteração das anafilotoxinas nos pacientes do sexo feminino e masculino diagnosticados com COVID-19.....	77
5.3.4 Alteração dos níveis séricos das anafilotoxinas analisadas quando avaliado o impacto da presença de comorbidades nos pacientes com COVID-19.....	78
5.3.5 Avaliação da alteração nos níveis séricos das anafilotoxinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 de acordo com o escore qSOFA.....	80
5.3.6 Utilização de ventilação mecânica altera o perfil de expressão de C3a e C4a em pacientes com COVID-19.....	80
5.3.7 Avaliação das anafilotoxinas nos pacientes com COVID-19 de acordo com o desfecho clínico.....	81
5.3.8 Correlação dos parâmetros laboratoriais e os níveis séricos de C3a e C4a em pacientes diagnosticados com COVID-19.....	82
5.4 Avaliação da probabilidade de sobrevivência de pacientes com COVID-19.....	82
5.5 Avaliação do potencial da quantificação de anafilotoxinas como teste preditor do diagnóstico e da severidade para a COVID-19.....	84
6. DISCUSSÃO.....	86
7. CONCLUSÕES.....	95

8. REFERÊNCIAS	96
-----------------------------	----

1.INTRODUÇÃO

Em 2019 em Wuhan houve um surto de pneumonia viral (SHEERVALILOU, et.al. 2020) causado por uma nova cepa de coronavírus (LIU, KUO et.al. 2020). O vírus em questão foi nomeado como Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2) (CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2020), e a doença causada por ele foi denominada, pela organização mundial da saúde (OMS), como doença do coronavírus 2019 (COVID-19) (LIU, KUO et.al. 2020). Esse novo coronavírus pertence a mesma família de coronavírus já conhecidos por causarem alterações respiratórias graves, são eles Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave-CoV (SARS-CoV) e Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio-CoV (MERS-CoV) (PEIRIS, et.al. 2003; RAJ, et.al. 2014). O novo coronavírus possui estrutura similar aos demais coronavírus já identificados, apresentando-se como uma partícula esférica, envolta por um envelope viral com genoma de RNA de fita simples e sentido positivo (LIU, KUO et.al. 2020).

Ao desenvolver a COVID-19, o paciente pode apresentar a doença de forma assintomática ou iniciar com sintomas predominantemente respiratórios, característicos da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), no entanto em casos graves pode resultar em óbito (GISONDI, et.al. 2020). Alguns pacientes, durante agravamento do quadro clínico, apresentam rápida progressão para lesão pulmonar aguda, choque séptico, disfunção de múltiplos órgãos e estado pró-trombótico (MEHTA, et.al. 2021).

Sabe-se que a resposta imune inata e a adquirida estão sendo ativadas pela infecção por SARS-CoV-2 (MORTAZ, et.al.2020). A imunidade inata é conhecida como a primeira linha de defesa do organismo, sendo responsável por gerar uma resposta inflamatória imediata, minutos após a entrada do patógeno no hospedeiro (ROMO, et.al. 2016; KAUR, et.al. 2019). Dentro da imunidade inata podemos citar a imunidade celular, gerada por células de origem hematopoiéticas, como mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células *natural Killer* (NK), capazes de produzirem e liberarem mediadores inflamatórios como interleucinas (WEISKOPF, et.al. 2009; ROMO, et.al. 2016).

Além da resposta imune por meio da ação celular, a imunidade inata possui a resposta humoral, mediada por componentes da cascata do sistema complemento e de coagulação, assim como anticorpos naturais (NAb) (MALONEY, et.al. 2020). O sistema complemento pode ser

ativado por três vias distintas, conhecidas como via clássica, via alternativa e via da lectina (SARMA, et.al. 2011). Com a ativação das vias, o sistema complemento é capaz de gerar a opsonização de patógenos, causar lise celular e a produção de anafilotoxinas (SARMA, et.al. 2011).

Após a deflagração da resposta imune inata o organismo inicia o desenvolvimento da resposta imune adaptativa, sendo as células apresentadoras de antígeno a “ponte” entre a imunidade inata e a adaptativa, capazes de sinalizar e recrutar os linfócitos, os quais se dividem em linfócitos T e B (BONILLA, et.al 2010; LIONGUE, et. al. 2011). Essas células possuem a capacidade de produzir componentes importantes para uma resposta imunológica efetiva, como citocinas e anticorpos. As citocinas possuem efeitos autócrinos, parácrinos ou endócrinos, com capacidade pleiotrópicas em diferentes células, agindo de forma complexa na regulação da resposta imunológica (DINARELLO, et.al. 2007; RAMANI, et.al. 2015, LIN, et.al. 2019).

É de conhecimento que a COVID-19 é capaz de provocar respostas imunes excessivas e descontroladas no hospedeiro, como a hipercitocinemia ou “tempestade de citocinas” que é caracterizada pela superprodução de citocinas pró-inflamatórias com alta atividade biológica em diversas células, tendo como consequência um dano extenso aos tecidos (DI GENNARO, et.al. 2020; SONG, et.al. 2020; HU, et.al. 2021). A presença da tempestade de citocinas está associada com os casos graves da COVID-19 (AZKUR, et.al. 2020). Em adição, também foi encontrado que durante a infecção por SARS-CoV-2 há uma forte ativação do sistema complemento em órgãos, como o pulmão e rins, além de estarem associados com o desenvolvimento dos trombos durante a COVID-19 (NORIS, et.al. 2020; CONWAY, et.al. 2020)

Diante do apresentado conhecer o perfil da resposta imunológica gerada nos pacientes diagnosticados com a COVID-19 é de suma importância, visto que a fisiopatologia dessa doença ainda não se encontra completamente elucidada e há fortes indícios de que a doença é capaz de gerar uma resposta imunologia alterada, com elevados níveis de citocinas e componentes do sistema complemento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Conceitos Básicos de Imunologia

Imunidade significa defesa do hospedeiro contra enfermidades, cujo objetivo é a manutenção da homeostase tecidual e integridade do organismo (SATTLER, 2017). Sendo o desenvolvimento do sistema imune considerado uma vantagem evolutiva para a efetiva sobrevivência do ser humano, sendo composto por diferentes células e moléculas, capazes de gerar uma resposta imunológica para a defesa do organismo (SATTLER, 2017). A imunidade pode ser dividida em dois tipos, que variam de acordo com a velocidade e especificidade da resposta gerada, conhecidas como imunidade inata e adaptativa (PARKIN, 2001).

2.1.1 Imunidade Inata

Imunidade inata ou natural é a primeira linha de defesa do hospedeiro, fornecendo uma resposta imediata (ROMO, et.al. 2016), capaz de gerar uma resposta inflamatória em minutos após a entrada do patógeno (KAUR, et.al. 2019). Possui papel principal na manutenção da homeostase, na prevenção da invasão de microrganismos, assim como é capaz de contribuir para desencadear a imunidade adaptativa (ROMO, et.al. 2016, KAUR, et.al. 2019). Tal imunidade é composta por barreiras físicas, microbiológicas e químicas; elementos humorais, como proteínas componentes do sistema complemento, proteínas de fase aguda e outras pentraxinas, lectinas e peptídeos antimicrobianos como as defensinas; células de origem hematopoiéticas, como mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células *natural Killer* (NK) (PARKIN, 2001; WEISKOPF, et.al. 2009; ROMO, et.al. 2016; KAUR, et.al. 2019). O método de atuação da imunidade inata é executando a mesma resposta rotineiramente, possuindo menor especificidade do que a imunidade adaptativa (BOEHM, et. al. 2014).

O sistema imune inato é capaz de reconhecer e diferenciar moléculas estranhas das produzidas pelo próprio organismo, identificando padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (PARKIN, et.al. 2001; NICHOLSON, 2016). Além destes padrões, as células da imunidade natural reconhecem sinais liberados por células próprias quando estão lesionadas ou em morte celular, conhecidos como padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) ou alarminas (VENEGAS, et.al. 2016). Para o reconhecimento dos PAMPs e DAMPs o organismo faz uso dos receptores de reconhecimento de padrões, que incluem os receptores semelhantes

a Toll (TLRs), receptores semelhantes a domínio de oligomerização de nucleotídeo (NOD), receptores de lectina tipo C, entre outros (KAUR, et.al. 2019).

Dentre as células que atuam no sistema imune inato, os fagócitos como macrófagos, células dendríticas, monócitos e neutrófilos atuam como a primeira linha de defesa aos microrganismos que rompem as barreiras físicas de proteção (NICHOLSON, 2016; ROSOWSKI, 2020). Os neutrófilos são altamente atuantes na defesa contra infecções bacterianas e fúngicas, possuem a habilidade de formar armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) para capturar patógenos grandes, assim como durante o desenvolvimento da inflamação aguda, fagocitam e liberam moléculas capazes de matar microrganismos invasores (WEISKOPF, et.al. 2009; NICHOLSON, 2016; ROSOWSKI, 2020). Já os macrófagos possuem importante papel na iniciação da inflamação, por meio da liberação de mediadores inflamatórios como interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), eliminação dos patógenos invasores, por meio de fagocitose, reparo e remodelação tecidual, além de serem capazes de regular a resposta imune adaptativa, pois estes possuem a capacidade de processamento e apresentação de antígenos (WEISKOPF, et.al. 2009; NICHOLSON, 2016; ROSOWSKI, 2020). Os monócitos sanguíneos são desenvolvidos na medula óssea adulta e em homeostase corporal podem se diferenciar em monócitos de patrulha não clássicos ou em macrófagos teciduais em estado estacionário (OZANSKA, et.al. 2020). Essas células também podem desenvolver atividades inflamatórias, com aumento na produção de citocinas, como TNF- α , IL-1 β quando expostos ao lipopolissacarídeo (LPS), ações regenerativas ou de apresentação de antígenos quando recrutados para tecidos inflamados (GUILLIAMS, et.al. 2018; OZANSKA, et.al. 2020). Já as células dendríticas, além da fagocitose, possuem função essencial na ligação do sistema imune inato e o adaptativo, processando e apresentando antígenos, além de regular a função de outras células imunológicas por meio de citocinas (WEISKOPF, et.al. 2009; ROSOWSKI, 2020).

Outra célula atuante no sistema imune inato são as células NK, as quais possuem diversas funções biológicas, primordialmente citotóxicas, capazes de reconhecer e matar células infectadas com vírus e células neoplásicas, além de secretar citocinas, como interferon- γ (IFN- γ) (WEISKOPF, et.al. 2009; MANDAL, et.al. 2015; NICHOLSON, 2016). Além das NKs, também podemos citar os granulócitos, como eosinófilos, mastócitos e basófilos, células efetoras conhecidas por desempenhar papéis fundamentais nas respostas contra parasitas e nas reações de hipersensibilidade do tipo I (RIGONI, et.al. 2018). Os eosinófilos dependem de

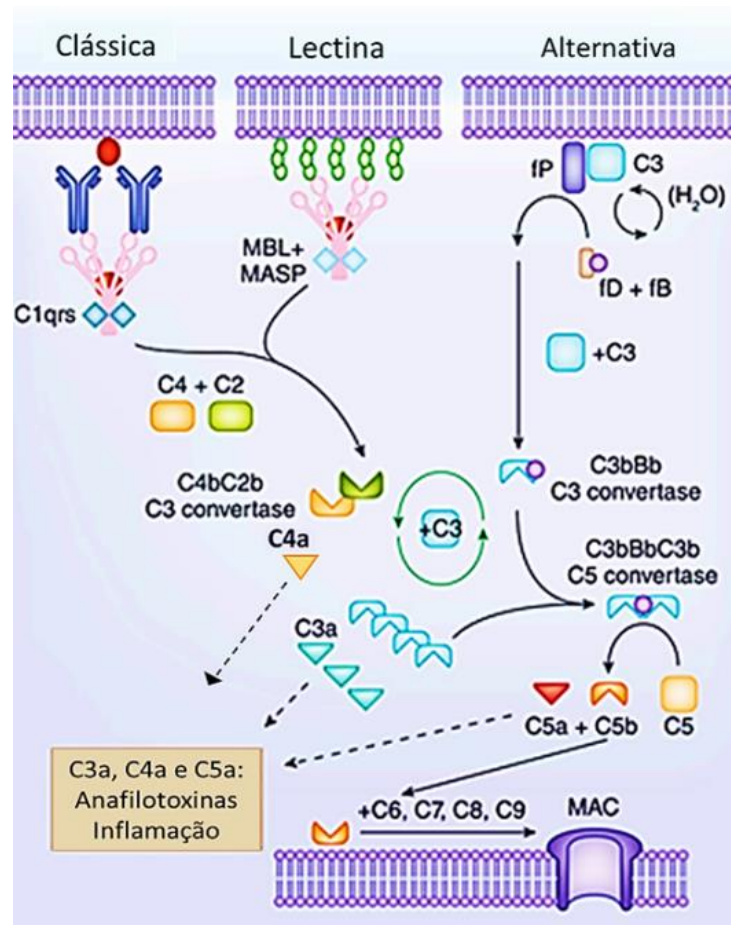
citocinas como IL-3, IL-5 e GM-CSF para sua diferenciação (ACKERMAN, et.al. 2007). Essas células são encontradas no sangue, assim como em órgãos hematopoiéticos (RIGONI, et.al. 2018), e possuem em seu citoplasma grânulos que contêm diferentes substância tóxicas, que geram respostas imunes contra helmintos e produzem estresse oxidativo resultando em apoptose dos patógenos (CHUSID, et.al. 2018). E a atividade dos eosinófilos podem resultar no desenvolvimento de doenças alérgicas no organismo (Weller, et.al. 2017). Os mastócitos são células residentes teciduais, localizados no tecido conjuntivo (KRYSTEL-WHITTEMORE, et.al. 2016; RIGONI, et.al. 2018), quando há a interação de alérgenos ou patógenos com o receptor presente na superfície, há a ativação dos mastócitos e consequente liberação de mediadores pré-formados, como histamina, dopamina, heparina entre outros (THEOHARIDES, et.al. 2019; RIGONI, et.al. 2018). Esses mediadores são capazes de aumentar a permeabilidade vascular, causar edema, broncoconstrição e urticaria (KRYSTEL-WHITTEMORE, et.al. 2016) Já os basófilos encontram-se circulantes no sangue e podem ser rapidamente recrutados para os sítios inflamatórios no corpo (RIGONI, et.al. 2018). Atuam na resposta contra parasitas secretando de forma rápida e potente citocinas do perfil Th2, como IL-4 e IL-13, após seu processo de ativação são capazes de liberar histamina presente em seus grânulos (STONE, et.al. 2010). Em adição, produzem diferentes leucotrienos que são eficientes vasoconstritores e permitem o aumento da permeabilidade vascular, sendo associados com doenças alérgicas pulmonares (STONE, et.al. 2010)

O sistema imune inato além de executar sua resposta imune por meio da ação celular, possui um sistema de resposta humoral, composto pela cascata do sistema complemento e de coagulação, assim como anticorpos naturais (NAb) (MALONEY, et.al. 2020). Em destaque, temos a cascata do sistema complemento, a qual desempenha papel fundamental nas respostas da imunidade inata contra patógenos invasores, entre eles os vírus e bactérias piogênicas, interligando a imunidade inata e adaptativa (WALPOR, 2001; MALONEY, et.al. 2020).

O sistema complemento é composto por grande número de glicoproteínas séricas e proteínas associadas à membrana, que são ativadas em sequência por mecanismo de cascata (PARKIN et.al. 2001; SARMA, et.al. 2011; HOLERS, et.al. 2014). A ativação deste sistema pode ser deflagrada por três vias distintas conduzidas pela presença de um antígeno, via clássica, alternativa e via da lectina (Figura1) (PARKIN et.al. 2001; SARMA, et.al. 2011). Após a ativação das vias do complemento, será deflagrada a opsonização dos patógenos e a remoção destes, por meio das células fagocíticas da imunidade inata, assim como a lise celular e a

produção de anafilotoxinas altamente potentes (SARMA, et.al. 2011). As anafilotoxinas são pequenos peptídeos, com potencial pró-inflamatório e geradas durante a cascata do sistema complemento, compreendendo a C3a, C4a e C5a (MARCEAU, et.al. 1987; ZHOU, et.al. 2012). Elas atuam de forma significativa na indução e regulação da inflamação, sendo capazes de mediar quimiotaxia e formação de radicais livres (ZHOU, et.al. 2012).

Figura 1 – Vias de ativação do sistema complemento.



Legenda: As diferentes vias de ativação do sistema complemento: Via clássica, via da lectina e via alternativa. Após ativado o sistema complemento libera anafilotoxinas (C3a, C4a e C5a) e forma o complexo de ataque a membrana (MAC) Fonte: Adaptado de MATHERN, et.al. 2015

O mecanismo de ativação por meio da via clássica, será deflagrado quando há a formação de imunocomplexos, após a ligação de IgG ou IgM a patógenos ou a outros antígenos estranhos (SARMA, et.al. 2011). O complexo multimérico C1, composto pelas moléculas C1q, C1r e C1s, liga-se à porção Fc do imunocomplexo, resultando em sua ativação (EBENBICHLER, et.al. 1991; VIGNESH, et.al. 2017; LING, et.al. 2019; BARDHAN, et.al. 2021). Após ativação de C1s há a clivagem das proteínas do sistema complemento C4 em

C4a+C4b e C2 em C2a+C2b, para a formação do complexo C3 convertase da via clássica (C4bC2b), capaz de clivar C3 em C3a e C3b, e levando a ativação da via comum. A C3a é uma anafilotoxina, cuja atuação estimula o processo inflamatório e recruta neutrófilos, e a C3b é uma opsonina, a qual irá ligar-se ao antígeno para promover sua fagocitose (GARCIA, et.al. 2016; VIGNESH, et.al. 2017; AFSHAR-KHARGHAN, 2017). Além dos imunocomplexos, as pentraxinas são capazes de eliminar patógenos após ligar-se diretamente a C1q e iniciar a cascata por via clássica do sistema complemento (SARMA, et.al. 2011)

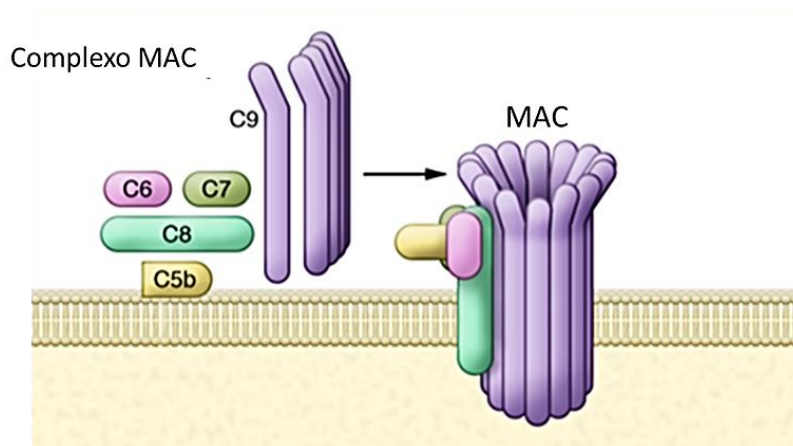
Já na via alternativa, a ativação do complemento decorre espontaneamente e de forma contínua, não havendo uma ativação específica (HOLERS, et.al. 2014, MATHERN, et.al. 2015). Para regulação da ativação dessa via há as proteínas do fator H e o fator I (BRILLAND, et.al. 2019). Na via alternativa a molécula de C3 passa por alterações conformacionais e montagens espontâneas (HOLERS, et.al. 2014), gerando o recrutamento do fator B (fB) e do fator D (fD) (MATHERN, et.al. 2015). O fD cliva o fB, gerando a molécula Bb, a qual será capaz de clivar C3 em C3a e C3b. A molécula C3b se liga a Bb, formando a C3 convertase da via alternativa (C3bBb) (MATHERN, et.al. 2015), levando à ativação da via comum.

Já a via das lectinas, será ativada por meio da proteína plasmática conhecida como lectina ligante de manose (MBL), ou através da ficolina, as quais ligam-se a segmentos de carboidratos presentes nas superfícies de patógenos, tais como leveduras, bactérias, vírus e parasitas (RUNZA, et.al. 2008; SARMA, et.al. 2011; MATHERN, et.al. 2015). Após esta ligação, as moléculas de serinoproteases associadas à manose (MASP), ligam-se à MBL para clivar C4 e C2, gerando o complexo da C3 convertase (C4bC2b) (HOLERS, et.al. 2014; MATHERN, et.al. 2015) e iniciando a ativação da via comum.

Consequentemente, independente da via ativada, a cascata prosseguirá da mesma forma, onde o complexo C3 convertase gera complexos multiméricos com a adição de moléculas extras de C3b, proporcionando a formação do complexo da protease C5 convertase (C4bC2bC3b ou C3bBbC3b) (MATHERN, et.al. 2015). A C5 convertase é capaz de clivar a molécula de C5 em C5a e C5b, sendo C5a uma potente anafilotoxina, cuja atuação permite o recrutamento de neutrófilos para o local do dano tecidual (AFSHAR-KHARGHAN, 2017). Em seguida C5b associa-se às moléculas C6, C7, C8 e C9 para a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) (Figura 2), (SARMA, et.al. 2011; AFSHAR-KHARGHAN, 2017; BARDHAN, et.al. 2021). O MAC resulta na formação de poros nas membranas plasmáticas, permitindo um

influxo expressivo de cálcio, causando perda de potencial da membrana mitocondrial e rompimento das células (MATHERN, et.al. 2015; AFSHAR-KHARGHAN, 2017).

Figura 2- Representação esquemática do complexo de ataque à membrana (MAC)



Fonte: AFSHAR-KHARGHAN e colaboradores, 2017.

2.1.2 Imunidade Adaptativa

A imunidade adaptativa possui duas grandes características primordiais, a especificidade e a memória imunológica, pelas quais o organismo pode distinguir um grande número de patógenos microbianos e desenvolver respostas mais vigorosas, com maior velocidade e eficácia a repetidas exposições ao mesmo agente, permitindo assim proteção a reinfecções pelo mesmo antígeno (PARKIN, 2001; BONILLA, et.al. 2010; NICHOLSON, 2016). Dentre as principais células da imunidade adaptativa destacamos os linfócitos, que se dividem em linfócitos T e B (BONILLA, et.al 2010; LIONGUE, et. al. 2011).

Os linfócitos T são formados na medula óssea e possuem seu processo de amadurecimento no timo. Essas células são responsáveis por organizar as respostas imunes adaptativas, por citotoxicidade e permitem o desenvolvimento da memória imunológica e autotolerância. Após processo de maturação intratímica, a partir de seleções positivas e negativas, os linfócitos T podem ser classificados em subpopulações, com distintas funções especializadas (LIONGUE, et.al. 2011; BRUMMELMAN, et. al. 2018), entre as quais podemos citar os linfócitos T $CD8^+$ e $CD4^+$ *naives* (virgem). Os linfócitos T $CD8^+$ e $CD4^+$ liberados no sangue periférico são células mantidas em quiescência, com baixa atividade metabólica e transcricional, migrando para os linfonodos (BRUMMELMAN, et.al. 2018; CHAPMAN, et.al. 2019). Nos linfonodos, após apresentação de antígeno, assim como ajustes nas expressões de

citocinas tais como IL-2, TGF- β e IL-10 e alterações metabólicas há a saída do estado quiescente dessas células, permitindo que iniciem a expansão clonal e diferenciação em células efetoras que migram para locais em processo de inflamação (BRUMMELMAN, et.al. 2018; CHAPMAN, et.al. 2020).

Os linfócitos T CD4⁺, ao tornarem-se efetores, podem ser diferenciados em vários subconjuntos: T auxiliares 1 (Th1), Th2, Th17, Th9 e Treg (LUCKHEERAM, et.al. 2012; BRUMMELMAN, et.al. 2018). Para a sinalização da diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ em Th1 e Th2 há a atuação das citocinas IL-12 e IL-4, respectivamente (HIRAHARA, et.al. 2016). As células Th1 são importantes para a defesa contra patógenos intracelulares, como vírus e bactérias, pela ativação de macrófagos e produzem citocinas como IFN- γ , IL-2 e fator de necrose tumoral (TNF) (ROMAGNANI, et.al. 1994; BRUMMELMAN, et.al. 2018). As células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, e são associadas com o desenvolvimento de respostas imunes contra helmintos parasitários e com a estimulação de reparos em tecidos danificados (ROMAGNANI, et.al. 1994; WALKER, et.al. 2017). Entre as funções das células Th17, estas atuam no recrutamento de neutrófilos contra bactérias extracelulares e fungos, com a expressão das citocinas IL-17, IL-22 e IL-23 (WALKER, et.al. 2017; BRUMMELMAN, et.al. 2018; LEE, et.al. 2018). Já as Treg, as quais são um subconjunto especializado de linfócitos T CD4⁺, são capazes de suprimir as respostas imunes adaptativas e participarem da manutenção da homeostase imunológica, além de produzirem citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β (LEE, et.al. 2018; KUMAR et al. 2018; OWEN, et.al. 2019). Já os linfócitos T CD8⁺, atuam na eliminação de células tumorais e células infectadas por patógenos intracelulares como vírus. Essas células são conhecidas como linfócitos T citotóxicos por possuírem a capacidade de induzir a morte das células infectadas, além de secretarem citocinas como IFN- γ e TNF- α (MITTRÜCKER, et.al. 2014; GERRITSEN, et.al. 2015).

Após a eliminação dos antígenos alvo, parte dos linfócitos permanecem no hospedeiro, como linfócitos T de memória, geradas a partir de uma ativação anterior e permitindo a manutenção da imunidade por um amplo período, com cinética de resposta mais acelerada (ROSENBLUM, et.al. 2016; KUMAR et al. 2018; BRUMMELMAN, et.al. 2018). Os linfócitos T de memória podem ser classificados em dois tipos distintos, células T de memória efetoras (TEM) e células T de memória central (TCM), as quais desenvolvem suas funções em tecidos periféricos e em órgãos linfoides secundários, respectivamente (SALLUSTO, et.al. 2004; ANDO, et.al. 2019).

Com relação aos linfócitos B, eles são formados na medula óssea e possuem como principal função a produção de imunoglobulinas (Ig), apresentam antígenos, são capazes de desenvolverem memória imunológica, e dependendo do estágio de diferenciação e ativação podem secretar citocinas (BONILLA, et.al 2010; LIONGUE, et.al. 2011; KUMAR et al. 2018; VAZQUEZ et al. 2015). Sabe-se que a memória imunológica às doenças infecciosas está relacionada com a presença dos linfócitos B de memória, os quais atuam nas respostas durante reinfecções a patógenos e suas variantes, ao entrarem em contato com esses agentes infecciosos retornam para o estado de plasmócito, capazes de produzir os anticorpos necessários (AKKAYA, et.al. 2020)

Na resposta imune adaptativa quando há o reconhecimento de antígenos estranhos por intermédio dos linfócitos B, será gerada a resposta humoral mediada pela secreção de Ig (ABBAS, et.al. 2015). O antígeno liga-se às imunoglobulinas IgM e IgD, expressas na superfície dos linfócitos B *naives*, e inicia a sua ativação e posteriormente a sua diferenciação, onde ocorre a troca das Ig, substituindo a região da cadeia pesada por γ , α ou ϵ (PIEPER, et.al. 2013; YU, et.al. 2019). As trocas das imunoglobulinas permitem a geração de anticorpos com funções distintas a diferentes agentes infecciosos (ABBAS, et.al. 2015). Diferentes fatores influenciam esse processo, como a atuação de IFN- γ para a troca por IgG, atuante na resposta à vírus e bactérias intracelulares; e IL-4 para a substituição por IgE, e a alteração para IgA será influenciada pelo fator transformador de crescimento- β (TGF- β) (BORISH, et.al. 2003; RAMANI, et.al. 2015). Vale ressaltar que em testes clínicos o aparecimento de IgM é associado com infecção ativa ou recente, enquanto IgG aparece posteriormente, sendo correlacionada com infecções passadas (MAHAJAN, et. al. 2020).

2.1.3 Citocinas

Em ambos os tipos de imunidade ocorre a atuação de citocinas, proteínas solúveis produzidas e secretadas por uma grande variedade de células imunes e não imunes, capazes de regular e coordenar a atividades das células pertencentes a imunidade inata e adaptativa. As citocinas estão presentes em diferentes processos como na apresentação de antígeno, na diferenciação da medula óssea, na inflamação, no reparo tecidual, no controle da proliferação e diferenciação celular, na regulação da angiogênese e entre outros processos fisiológicos e patológicos (BORISH, et.al. 2003; TISONCIK, et.al. 2012; RAMANI, et.al. 2015). As citocinas possuem efeitos autócrinos, parácrinos ou endócrinos, com capacidade pleiotrópicas em diferentes células, agindo de forma complexa na regulação da resposta imunológica

(DINARELLO, et.al. 2007; RAMANI, et.al. 2015, LIN, et.al. 2019). As citocinas são moléculas efetoras e mensageiras poderosas do sistema imune (OUYANG, et.al. 2019). Parte das citocinas atuantes no organismo, serão brevemente destacadas a seguir.

2.1.3.1 Interleucina-1 β (IL-1 β)

Interleucina-1 β (IL-1 β), trata-se de um agonista pró-inflamatório (PALOMO, et.al. 2015), induzida por sinais inflamatórios, como endotoxinas, microrganismo, entre outros, em diversos tipos celulares do sistema imunológico, sendo produzida principalmente por células da linhagem fagocítica mononuclear (BORISH, et.al. 2003; BENT, et.al. 2018). Tal citocina possui capacidade de ativar células da imunidade inata, como as células apresentadoras de antígeno, assim como atua no direcionamento e polarização de células T CD4+, para que estas se diferenciem no perfil Th1 e Th17; e possui atuação sobre o aumento na proliferação de linfócitos B (BORISH, et.al. 2003; BENT, et.al. 2018). Essa citocina também atua de forma efetiva na indução de respostas inflamatórias locais e sistêmicas e na deflagração da resposta antitumoral (GABAY, et.al. 2010; PALOMO, et.al. 2015; BENT, et.al. 2018).

2.1.3.2 Interleucina 2 (IL-2)

Interleucina 2 (IL-2) foi a primeira molécula sinalizadora do sistema imune a ser descoberta (VALENCIA, et.al. 2020). A IL-2 é produzida a partir de linfócitos T auxiliares CD4+, por meio da ativação destas células pelo TCR e moléculas coestimuladoras (BORISH, et.al. 2003; MALEK, et.al. 2008; VALENCIA, et.al. 2020). Ela possui efeitos sobre muitas células, como indução da proliferação de linfócitos T e B, assim como das células NK, além de realizar a indução da morte de células danosas ao organismo (GAFFEN, et.al. 2004; VALENCIA, et.al. 2020).

2.1.3.3 Interleucina 4 (IL-4)

A IL-4 é produzida por células Th2 e células da imunidade inata como mastócitos, basófilos e eosinófilos (HO, et.al. 2016). Possui efeito essencial na imunidade adaptativa atuando na promoção do crescimento e sobrevivência de linfócitos B e na regulação da produção de anticorpos, nos quais permite a troca de classe da imunoglobulina para IgE, desta forma estando presente no desenvolvimento das respostas contra hipersensibilidade (HO, et.al. 2016; BROWN, et.al. 2017; YOON, et.al. 2019). Quando ocorre alteração na expressão de IL-4 pode haver desenvolvimento de alergias (BROWN, et.al. 2017).

2.1.3.4 Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6 será produzida mediante a infecções e lesões teciduais, sendo produzida por monócitos e macrófagos (TANAKA, et.al. 2014; TANAKA, et.al. 2016). Tal citocina possui amplo efeito sobre células inflamatórias, contribuindo para a remoção de agentes infecciosos e restauração dos tecidos lesionados, além de atuar na ativação de células hepáticas para a produção de proteínas de fase aguda, desta forma possuindo efeitos locais e sistêmicos (BORISH, et.al. 2003; HUNTER, et.al. 2015; TANAKA, et.al. 2016). Dentre os efeitos da IL-6 nas células imunológicas, podemos destacar a estimulação para a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos maduros secretores de Ig e a manutenção do equilíbrio entre os subtipos de linfócitos T (BORISH, et.al. 2003; ROSE-JOHN, 2018). Atualmente, IL-6 é vista como um importante alvo para intervenções clínicas, principalmente por meio de seu bloqueio em doenças autoimunes (HUNTER, et.al. 2015; ROSE-JOHN, 2018).

2.1.3.5 Interleucina 8 (IL-8)

A IL-8 é também conhecida como CXCL8 e pertence à família das quimiocinas que atua nos receptores CXCR1 e CXCR2 (RUSSO, et.al. 2014). Sendo responsável pela atração de leucócitos desenvolvendo um infiltrado leucocitário inflamatório polimorfonuclear, atuação na eliminação de patógenos, além de contribuir para processos associados ao desenvolvimento de patologias, como lesão tecidual, fibrose e, transição epitélio mesênquimal e formação de neoplasias (RUSSO, et.al. 2014; ALFARO, et.al. 2017; BIE, et.al. 2019).

2.1.3.6 Interleucina 10 (IL-10)

A IL-10 é uma citocina com função anti-inflamatória, atuando significativamente nos processos de manutenção e restabelecimento da homeostase imunológica no organismo, por meio da promoção de mecanismos utilizados em reparos teciduais, controle da inflamação e na modulação de resposta do sistema imune adaptativo (YAO, et.al. 2013; BEDKE, et.al. 2019; OUYANG, et.al. 2019). Tal citocina possui efeito pleiotrópico, diante disso uma ampla variedade de células é capaz de produzir IL-10, entre elas linfócitos associados com processos de regulação imunológica, monócitos e células B (BORISH, et.al. 2003; YAO, et.al. 2013; BEDKE, et.al. 2019).

2.1.3.7 Interleucina 12p70 (IL-12p70)

Atualmente a família de citocinas da IL-12 possuem 5 componentes, os quais são IL-12, IL-23, IL27, IL-35 e IL-39 (FLOSS, et.al. 2020) A IL-12p70 trata-se da expressão conjunta de duas subunidades p35 e p40 (ZHANG, WANG, 2008; GEE, et.al. 2009). Tal citocina será produzida principalmente por fagócitos e células dendríticas (HAMZA, et.al. 2010), ou seja, após a exposição a PAMPs as células dendríticas podem produzir IL-12p70 (MAROOF, et.al. 2008; GORIELY, et.al. 2008), assim como as células NK após o contato com antígenos bacterianos intracelulares (KEEGAN et al. 2019). Ao ser produzida IL-12 está associada com a indução de proliferação das células NK e linfócitos T, possibilita o aumento da citotoxicidade, da expressão de moléculas de adesão nos linfócitos T e de mediadores citotóxicos como o INF- γ , favorecendo a formação de células Th1 (GORIELY, et.al. 2008; ZHANG, WANG, 2008; GEE, et.al. 2009; HAMZA, et.al. 2010; KEEGAN et al. 2019). Outras células podem ser alvos da atuação da IL-12, entre elas os linfócitos B, nos quais há o aumento na produção de imunoglobulinas ligadas com o perfil Th1 de resposta imunológica e podemos citar também a atuação dessa citocina no aumento de atividade antimicrobiana nos macrófagos (HAMZA, et.al. 2010). Diante disso, a IL-12 pode ser associada com o desenvolvimento de doenças inflamatórias autoimunes, como colite e encefalite autoimune (WOJNO, et.al. 2019), atuando também contra doenças virais, associadas ao vírus influenza A e vírus herpes simples, e bacterianas, como tuberculose (HAMZA, et.al. 2010).

2.1.3.8 Interleucina 17 A (IL-17A)

Os linfócitos Th17 são células produtoras de Interleucina-17A (IL-17A) (MIOSSEC, et.al. 2009; CHEN, KOLLS, 2017; RODRIGUES-DIEZ, et.al. 2021). A IL-17A possui papel importante contra antígenos bacterianos e fúngicos, assim como durante o processo de inflamação tecidual, induzindo a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1 β , IL-6 e GM-CSF; induz a expressão de peptídeos antimicrobianos, entre eles as defensinas; estimula a liberação de metaloproteinases de matriz de fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, atua no processo de recrutamento de neutrófilos, e no desenvolvimento de doenças autoimunes e alérgicas (IWAKURA, et.al. 2011; GU, et.al. 2013; CHEN, KOLLS, 2017).

2.1.3.9 Fator de necrose tumoral- α (TNF- α)

O TNF- α trata-se de uma citocina com atividade pró-inflamatória, produzida por diversas células no corpo (BALKWILL, et.al. 2006; AGGARWAL, et.al. 2011; MEHAFFEY, et.al. 2017). Essa citocina pode ter sua expressão induzida por fatores como LPS bacterianos, antígenos virais e parasitários, por anafilotoxina C5a, complexos imunes e pelo próprio TNF- α (ZELOVÁ, et.al. 2013). Dentre as funções do TNF- α , podem ser citadas, a capacidade de mediar processos inflamatórios agudos e crônicos, atua na reparação tecidual, atuação sobre a proliferação fisiológica na diferenciação dos linfócitos B, atividade antitumoral, atuação em diversas doenças pulmonares e cardiovasculares (PALLADINO, et.al 2003; AGGARWAL, et.al. 2011; MEHAFFEY, et.al. 2017).

2.1.3.10 Fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF)

O GM-CSF pertence a superfamília do fator estimulador de colônias, envolvido na hematopoiese a partir de precursores da medula óssea, com a geração de monócitos, macrófagos e células dendríticas (BURGESS, 1980; BECHER, et.al. 2016; DOUGAN, et.al. 2019). A produção de GM-CSF ocorre por diferentes tipos celulares como macrófagos, linfócitos T, fibroblastos e células endoteliais (BURGESS, 1980; MEHTA, et.al. 2015). O GM-CSF é atuante nos locais em inflamação, frequentemente associados com processos regulatórios da inflamação na resposta a patógenos, em doenças autoimunes e câncer (DOUGAN, et.al. 2019).

2.1.3.11 Interferon- α (IFN- α)

Sabe-se que a resposta inicial do hospedeiro quando há uma infecção viral será a indução de interferons do tipo I (GIBBERT, et.al. 2012), um deles o IFN- α , o qual possui mais de 12 formas distintas (ZHANG, et.al. 2008; LIU, DIEDRICHS-MÖHRING, 2019). O IFN- α também pode vir a ser induzido em resposta a infecções bacterianas, neoplasias e células heterólogas (LIU, DIEDRICHS-MÖHRING, 2019), sendo derivado, principalmente de monócitos, macrófagos e linfócitos B (BORISH, et.al. 2003). O IFN- α possui diversos efeitos imunomoduladores, dos quais podemos citar a regulação da atividade de células NK e regulação positiva das moléculas de MHC classe I, além de exercer atividades antivirais e antitumorais, por meio da inibição da replicação viral em células infectadas e proporciona a estimulação dos linfócitos T citotóxicos (BORISH, et.al. 2003; LIU, DIEDRICHS-MÖHRING, 2019).

2.1.3.12 Interferon- β (IFN- β)

O interferon- β pertence ao tipo I dos interferons (SCHRODER, et.al. 2003; MARKOWITZ, et.al. 2007). Ele é produzido pela maioria das células em resposta a infecções virais, dentre elas os fibroblastos, leucócitos e células endoteliais (MARKOWITZ, et.al. 2007; GONZÁLEZ-NAVAJAS, et.al. 2013; MASTRANGELI, et.al. 2014). Entre as respostas geradas pelo IFN- β podemos citar a capacidade destes de reduzir a apresentação de antígenos, por meio da redução da expressão de moléculas de MHC de classe II, inibir a proliferação dos linfócitos T, de interferir na produção de citocinas como a IL-10 (MARKOWITZ, et.al. 2007; AXTELL et al. 2011; GONZÁLEZ-NAVAJAS, et.al. 2013; MASTRANGELI, et.al. 2014; KAPLAN, et.al. 2017; JAKIMOVSKI, et al. 2018).

2.1.3.13 Interferon- γ (IFN- γ)

O IFN- γ é o representante dos IFN tipo II (SCHRODER, et.al. 2003; GONZÁLEZ-NAVAJAS, et.al. 2013; FENIMORE, et.al. 2016). Dentre as principais células responsáveis por produzir IFN- γ estão os linfócitos T, as células NKs, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B e esta produção será regulada por interleucinas como IL-12 e IL-18 (SCHRODER, et.al. 2003; ZHANG, et.al. 2008; KAK, et.al. 2018). O IFN- γ é conhecido por seu papel crítico na sinalização de células imunológicas e na regulação do sistema imunológico (FENIMORE, et.al. 2016), atuando no reconhecimento e eliminação de patógenos, aumentando a expressão de MHC na superfície celular, também sendo capaz de possuir papel antitumoral, por atuar sobre a proliferação de células neoplásicas, permite a estimulação de macrófagos, induzindo mecanismos antimicrobianos e possui atividade antiviral (SCHRODER, et.al. 2003; FENIMORE, et.al. 2016; KAK, et.al. 2018). O sistema imunológico depende de uma expressão controlada de IFN- γ , quando há uma expressão excessiva pode haver danos teciduais, necrose e inflamação, contribuindo assim para a patologia de doenças (FENIMORE, et.al. 2016; KAK, et.al. 2018).

2.1.3.14 Interferon- λ (IFN- λ)

Pertencente aos interferons do tipo III, o interferon- λ (IFN- λ) (ZHANG, et.al. 2008; LAZEAR, et.al. 2015) pode ser subdividido em quatro subtipos IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2, IFN- λ 3 e IFN- λ 4 (ZANONI et al. 2017). Os IFN- λ 1 e IFN- λ 2 compartilham 81% dos aminoácidos, enquanto os IFN- λ 2 e IFN- λ 3 compartilham mais de 90% dos seus aminoácidos, e o IFN- λ 4 é o mais diferente, possuindo apenas 28% de similaridade com os aminoácidos encontrados nos

demais IFN- λ (HEMANN, et al, 2017). Inicialmente foi reconhecido o potencial do IFN- λ em fornecer proteção antiviral menos agressiva nas superfícies epiteliais, atuando em locais de barreiras anatômicas, resultando em menos danos colaterais, quando comparado com os IFN do tipo I (LAZEAR et al. 2019), além de atuar na resposta contra infecções bacterianas, atuação antitumoral, por indução de apoptose das células tumorais (ESLAM, et.al. 2016).

2.2. Coronavírus (CoV)

Os coronavírus são pertencentes à ordem *Nidovirales*, na família *Coronaviridae* e são subdivididos em quatro gêneros distintos baseados nas características genótípicas e filogenéticas. Dessa forma, são classificados como coronavírus alfa (α -CoV), beta (β -CoV), gama (γ -CoV) e delta (δ -CoV) (MAIER et.al. 2015; CUI, et.al. 2019; MIN, 2020).

Os diferentes gêneros de coronavírus são capazes de infectar uma grande variedade de animais, causando alterações respiratórias, entéricas, hepáticas e neurológicas (WOO et.al., 2012), sendo os gêneros α -CoV e β -CoV predominantemente encontrados em mamíferos (CUI, 2019), enquanto os gêneros γ -CoV e δ -CoV são detectados em aves (WOO et. al., 2012).

Dentre os coronavírus encontrados em mamíferos podemos destacar inicialmente 6 cepas distintas que são capazes de infectar seres humanos: HCoV-229E, HCoV-OC43, SARS-CoV, HCoV-NL63, MERS-CoV e HCoV-HKU1 (HOEK, et.al., 2004; HOEK, et.al., 2006; ZUMLA, et.al., 2016). Comumente os coronavírus são bem tolerados pelos humanos, sendo considerados vírus endêmicos na população (ZAKI, et.al. 2012), causando alterações respiratórias leves, semelhantes a gripe (COPRECHINI, et.al. 2020). Entretanto, desde 2002 as cepas SARS-CoV e MERS-CoV foram associadas com o desenvolvimento de alterações respiratórias graves (PEIRIS, et.al. 2003; PEIRIS, et.al. 2003 (a); RAJ, et.al. 2014; ASSIRI, et.al. 2013).

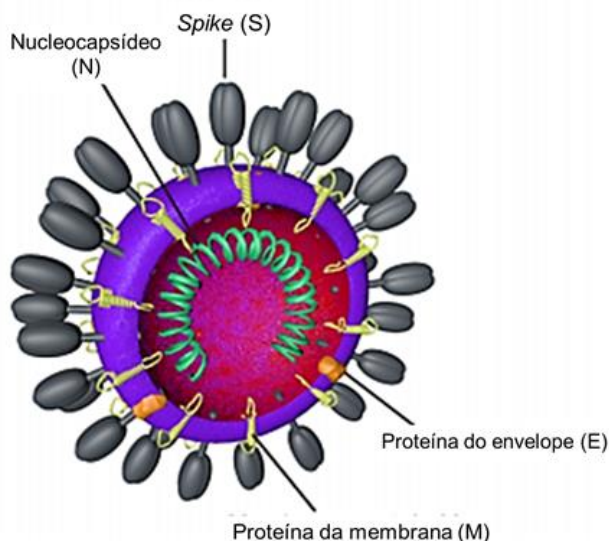
Como visto acima, os CoVs muitas vezes são bem tolerados pelos seres humanos, mas nas últimas duas décadas foram observados o surgimento de epidemias associadas a diferentes cepas do coronavírus. Entre eles, o SARS-CoV, foi o responsável pelo grande número de casos de síndrome respiratória aguda grave (SARS) na província de Guangdong na China e conseguiu atingir mais de vinte países no mundo, em diferentes continentes, nos anos de 2002-2003 (PIRES, et.al. 2003; RABAAN, et.al. 2020; YAN, et.al. 2020), sendo considerada a primeira pandemia do século XXI (PIRES, et.al. 2003). Os portadores de SARS-CoV apresentam

sintomas respiratórios, como tosse, pneumonia, taquipnéia, dispnéia, entre outros, podendo ocorrer deterioração da função pulmonar (PIRES, et.al. 2003; SIMS, et.al. 2007).

Dez anos após o surto de SARS-CoV, em 2012 na região do Oriente Médio, uma nova epidemia foi associada aos coronavírus, dessa vez associada à cepa MERS-CoV, iniciando na Arábia Saudita e Catar (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012; RAJ, et.al. 2014). Filogeneticamente correlacionado com CoVs encontrados em camelos e dromedários, estes foram considerados os possíveis hospedeiros intermediários que propiciaram a disseminação do vírus para os humanos (RAJ, et.al. 2014). Após o aparecimento do primeiro caso de MERS-CoV, o vírus foi detectado em mais de 27 países no Oriente Médio, na Europa, Norte da África e na Ásia (CHAFEKAR, et.al. 2018). Dentre as características clínicas manifestadas por pacientes destacam-se febre, calafrios, mialgia, diarreia, alterações pulmonares unilaterais ou bilaterais, SDRA, com rápida progressão (RAJ, et.al. 2014; CHAFEKAR, et.al. 2018).

Por meio de métodos fenotípicos, estudos mostraram que os coronavírus formam partículas esféricas, com presença de envelope com diâmetro entre 120-160 nm, com o aspecto de coroa ou do latim *Corona*, o que dá origem a nomenclatura destes vírus (LAI, et.al. 1997; WOO, et.al. 2010). O CoV contém genoma longo de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples não segmentado, com até 32 quilobases (Kb), de sentido positivo (FORNI, et.al. 2017; CUI, 2019). O genoma viral é composto em sua maior parte por duas grandes estruturas de leitura aberta (ORF – *Open Reading Frames*) localizadas na extremidade 5', as quais são responsáveis por gerar dezesseis proteínas não estruturais (NSP 1 a 16) (SU, et.al. 2016; FORNI, et.al. 2017), enquanto na extremidade terminal 3' há as ORF responsáveis por codificar proteínas presentes na estrutura viral, entre elas a proteína *Spike* (S), de Envelope (E), de Membrana (M) e de Nucleocapsídeo (N) (Figura 3) (SU, et.al. 2016). Em adição, nesta região nos coronavírus pertencentes ao gênero β -CoV há a codificação da proteína hemaglutinina esterase (HE) (WEISS, et.al. 2011).

Figura 3 – Representação da estrutura do virion do coronavírus (CoV)



Fonte: Belouzard e colaboradores, 2012

Tratando-se das proteínas estruturais, inicialmente podemos destacar as proteínas E e M, as quais são pequenas proteínas transmembrana presentes em todos os coronavírus (WOO, et.al. 2010). Também são importantes para a replicação viral e formação de partículas semelhantes a vírus (VLP) (CORSE, et.al. 2003). A proteína E está envolvida em diversos aspectos do ciclo de vida viral, sendo responsável pela montagem e morfogênese do vírion e participa do brotamento viral (DeDIEGO, et.al. 2006; LIU, et.al. 2007; SCHOEMAN, et.al. 2019). Já a proteína M é mais abundante e relaciona-se com a definição da forma do envelope viral (NEUMAN et.al. 2011).

Além das proteínas citadas, a região 3' do genoma viral também codifica a proteína N, (SU, et.al. 2016) sendo a mais abundante nas células infectadas (CHANG, et.al. 2014), tanto no citoplasma como no núcleo celular (HISCOX, 2001). A proteína N tem como principal função o empacotamento da molécula de RNA viral, no complexo ribonucleoproteína helicoidal (RNP), conhecido como capsídeo ou nucleocapsídeo (CHANG, et.al. 2014; MCBRIDE, et.al. 2014). A formação do nucleocapsídeo protege o genoma viral e garante a replicação do mesmo (MCBRIDE, et.al. 2014). Além da atuação da proteína N frente a replicação viral, a interação desta proteína com as demais proteínas estruturais é essencial para a montagem do CoV (MCBRIDE, et.al. 2014).

Dentre as proteínas estruturais do CoV há ainda a proteína S (SU, et.al. 2016), uma glicoproteína de membrana com a presença de peptídeos de sinal, possuindo a maior variação genômica entre os coronavírus (WOO, et.al. 2010). Ao analisar o CoV na microscopia eletrônica, é possível observar que a proteína S fornece ao vírus a aparência de coroa, pois forma trímeros na superfície viral (WOO, et.al. 2010; BELOUZARD, et.al. 2012; LI, 2016). Trata-se de uma molécula multifuncional, cujo principal papel é mediar a adesão, ligação ao receptor e entrada do CoV na célula hospedeira (WOO, et.al. 2010; LI, 2016; NEUMAN, et.al. 2016). Além de permitir a entrada do vírus na célula, a proteína S é responsável pelo tropismo do vírus por tecidos específicos e é uma das moléculas mais significativas para a indução da resposta imune do hospedeiro, o qual irá produzir anticorpos neutralizantes específicos para a proteína S (HOFMANN, et.al. 2004; LI,2016).

A proteína S contém três divisões, um grande ectodomínio, uma âncora transmembrana e uma cauda curta intracelular (LI, 2016). O Ectodomínio possui dois domínios funcionalmente distintos, domínio N-terminal conhecido como S1 e domínio C-terminal denominado S2, envolvidas no reconhecimento do receptor e na facilitação da fusão das membranas virais e do hospedeiro permitindo a entrada do genoma viral, respectivamente (WOO, et.al. 2010; BELOUZARD, et.al. 2012; HULSWIT, et.al. 2016; LI,2016). No domínio S1 é observado uma maior divergência entre as sequências, variando entre as espécies de um mesmo gênero de CoV, que funciona como domínio de ligação ao receptor (RBD) (BELOUZARD, et.al. 2012).

Sabendo que a proteína S liga-se nos receptores das células hospedeiras é imprescindível o conhecimento destes receptores, atualmente o número conhecido de receptores utilizados pelo CoV é limitado. No entanto, sabe-se que o tipo de receptor não é conservado entre as diferentes cepas de coronavírus, onde o HCoV-229E utiliza a proteína aminopeptidase N (APN), o HCoV-NL63 e SARS-CoV faz uso da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) e o MERS-CoV se liga à dipeptidil peptidase 4 (DPP4) (BELOUZARD, et.al. 2012; YANG, et.al. 2014; HULSWIT, et.al. 2016). Com relação à ACE2, esta é homóloga à carboxipeptidase ACE, responsável pela formação a angiotensina II, o qual está ativa no sistema renina-angiotensina (SRA) (KUBA, et.al. 2010). A ACE2 mantém a homeostase do SRA regulando negativamente esse sistema (LI, ZHOU et.al. 2020). Alguns estudos identificaram a presença da ACE2 em células epiteliais dos alvéolos pulmonares, no endotélio de artérias e veias, assim como em enterócitos do intestino delgado, células do miocárdio, nas células do túbulo proximal nos rins e em células uroteliais (HAMMING, et.al. 2004; XU, et.al. 2020).

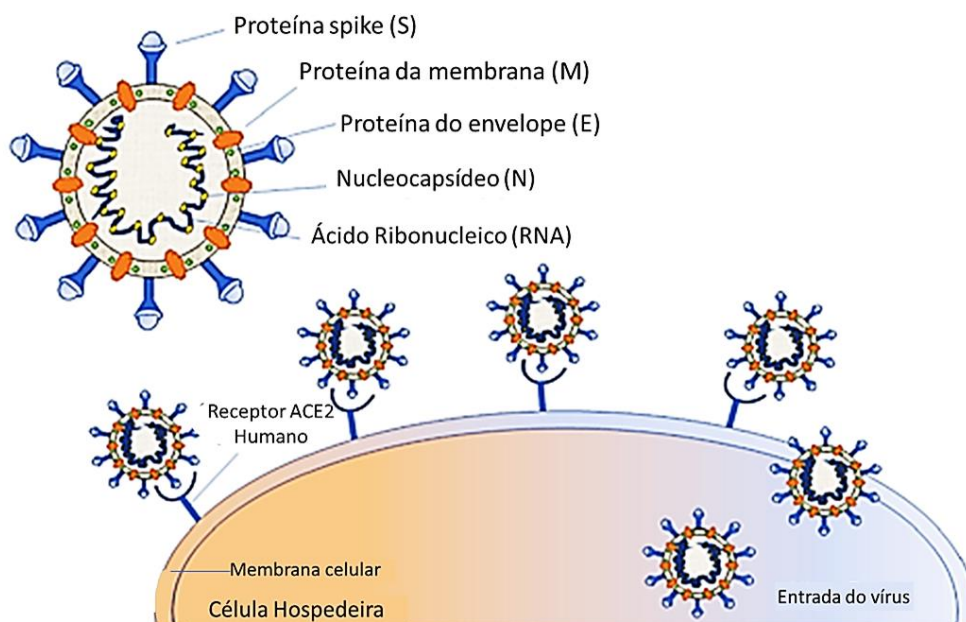
A partir da identificação dos coronavírus como responsáveis pelos dois surtos citados, foi evidente a alta transmissibilidade e patogenicidade desses vírus (YAN, et. al. 2020). Recentemente houve ainda a descoberta de mais uma cepa de coronavírus capaz de infectar seres humanos e responsável pela pandemia mundial iniciada em 2019 em Wuhan, na China, conhecido como síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2) (HARRISON, et.al. 2020; CHEN, et.al. 2021), causadora da doença provocada pelo coronavírus de 2019 (COVID-19).

2.3 SARS-CoV-2 e suas Características clínicas

Em dezembro de 2019 houve a notificação na China de grande número de casos de pneumonia de origem viral em Wuhan, na província de Hubei, (PHELAN, et.al. 2020; SHEERVALILOU, et.al. 2020) e por meio de sequenciamento genômico foi constatado que uma nova cepa de coronavírus era a causa (LIU, KUO et.al. 2020). Inicialmente esse novo vírus foi nomeado pela organização mundial da saúde (OMS) como novo coronavírus 2019 (2019-nCoV) e nomeou a doença originada desse vírus como doença do coronavírus 2019 (COVID-19) (LIU, KUO et.al. 2020), representada como uma doença respiratória aguda, com potencial fatal (SHEERVALILOU, et.al. 2020). Em seguida, esse vírus foi renomeado para Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (SARS-CoV-2), pelo comitê internacional de taxonomia de vírus (CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2020).

Assim como os demais coronavírus, o SARS-CoV-2 apresenta-se como uma partícula esférica envelopada com genoma de RNA com fita simples de sentido positivo (LIU, KUO et.al. 2020), o qual faz parte do gênero β dos coronavírus (SAMUDRALA, et.al. 2020). Estruturalmente, possuem as proteínas *Spike* ou de pico (S), Envelope (E), Membrana (M) e nucleocapsídeo (N) (figura4) (NAQVI, et. al. 2020). O passo inicial para a infecção do SARS-CoV-2 é a ligação específica da proteína Spike ou de pico (S) ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) para entrada na célula (Figura 4), onde o vírus libera seu genoma e se replica, resultando na formação de novas partículas virais e a propagação do vírus para as outras células (SOY, et.al. 2020; V'KOVSKI, et.al. 2021). O receptor ACE2 para entrada do SARS-CoV-2 no organismo está localizado nos pulmões (CLERKIN et. al, 2020), coração, rins (TIKELLIS, et.al. 2012), células epiteliais da mucosa oral (XU, et.al. 2020), nas células endoteliais (XU, et.al. 2017) e no trato gastrointestinal (GALANOPOULOS, et.al. 2020).

Figura 4 – Representação esquemática da entrada do vírus SARS-CoV-2 na célula hospedeira.



Legenda: Representação da entrada do vírus SARS-Cov-2 na célula hospedeira humana por meio do receptor ACE2. Fonte: NAQVI, et. al. 2020

A infecção causada pelo SARS-CoV-2 conseguiu se disseminar rapidamente para outras regiões da China e atingir diferentes continentes, tornando-se uma ameaça global (WU, et al. 2020; LIU, KUO et.al. 2020). Com a rápida expansão dos casos de COVID-19, a OMS classificou esse surto como uma pandemia em março de 2020 (SAMUDRALA, et.al. 2020). Em 12 de junho do mesmo ano, segundo dados da OMS, já haviam sido notificados mundialmente mais de 7 milhões de casos de COVID-19, com número superior a 400 mil óbitos causados pela infecção pelo SARS-CoV-2 (OMS,2020).

No Brasil o primeiro caso de infecção pelo SARS-CoV-2 foi detectado em fevereiro de 2020 (OLIVEIRA, et.al. 2020; TANG, et.al. 2020), em um paciente na cidade de São Paulo, do sexo masculino, 61 anos, que havia retornado de uma viagem da Itália (ARAUJO, et.al. 2020) e a infecção rapidamente se disseminou pelo território nacional, atingindo São Paulo, Rio de Janeiro e outros estados em algumas semanas (TANG, et.al. 2020). No período de realização deste estudo foram registrados o total de 2.074.860 casos de COVID-19 no Brasil, no dia 18 de junho de 2020, colocando o Brasil como o segundo país com maior número de casos no mundo, ficando atrás dos Estados Unidos da América (EUA), que totalizaram 3.647.715 casos (BRASIL, 2020). De acordo com dados do Ministério da Saúde, o coeficiente de incidência bruto do Brasil era de 9.873 casos/1 milhão de habitantes (BRASIL, 2020). Ao observarmos o

número de óbitos acumulados, no mesmo período, foram registrados 78.772 óbitos por COVID-19, com coeficiente de mortalidade de 374 óbitos/1 milhão habitantes (BRASIL, 2020). Dentre as regiões brasileiras, o Nordeste ocupava a segunda posição de acordo com o coeficiente de incidência, com 1.214,3 casos/100 mil habitantes e mortalidade de 44,1 óbitos/100 mil habitantes (BRASIL, 2020). Já o estado de Alagoas, apresentou 49.583 casos da COVID-19 desde o início da pandemia (BRASIL, 2020). Em relação aos óbitos foram notificados o total de 1.381 óbitos (BRASIL, 2020). Desde o início da pandemia até o dia 25 de dezembro de 2021 no Brasil haviam sido confirmados 22.234.626 casos de COVID-19 e 618.424 óbitos por essa doença no país (BRASIL, 2021). Enfatizando o grave problema de saúde pública que o Brasil e o mundo enfrentam desde o início da pandemia pela COVID-19.

O vírus SARS-CoV-2 tem sua transmissão por meio de gotículas e aerossóis respiratórios e entra no corpo através das mucosas nasal, nasofaringe e orofaringe (CLERKIN et. al, 2020; GISONDI, et.al. 2020). Ao desenvolver a COVID-19, esta pode variar com apresentação assintomática ou sintomas predominantemente respiratórios, característicos da síndrome do desconforto respiratória aguda (SDRA). Em casos graves pode evoluir para falência de múltiplos órgãos e morte (GISONDI, et.al. 2020; MEHTA, et.al. 2021). A evolução para casos mais graves da COVID-19 é associada com a idade mais avançada dos pacientes e a presença de comorbidades (SOY, et.al. 2020). Os sintomas mais comuns são febre, tosse seca, perda do olfato e paladar, conjuntivite, fadiga e dispnéia (CLERKIN et. al, 2020; GISONDI, et.al. 2020 PANDEY, et.al. 2020). Também podem se manifestar com dores de cabeça, dor de garganta e rinorréia, assim como sintomas não respiratórios, tais quais náusea, diarreia e lesões cutâneas (DI GENNARO, et.al. 2020; GISONDI, et.al. 2020).

A COVID-19 é capaz de provocar respostas imunes excessivas e descontroladas no hospedeiro, a hipercitocinemia ou “tempestade de citocinas”, tendo como consequência um dano extenso aos tecidos (DI GENNARO, et.al. 2020; HU, et.al. 2021). Alguns pacientes, durante agravamento do quadro clínico, apresentam rápida progressão para lesão pulmonar aguda e síndrome da insuficiência respiratória aguda com choque séptico, disfunção de múltiplos órgãos e estado pró-trombótico (MEHTA, et.al. 2021).

Diante das alterações evidenciadas durante a infecção pelo vírus SARS-CoV-2, as quais são similares a diversas outras infecções respiratórias, é de suma importância avaliarmos como o organismo reage frente a outras infecções virais.

2.4 Resposta imune antiviral

Sabe-se que os vírus são importantes causadores de doenças infecciosas e a forma como o organismo humano detecta e responde a esses invasores determina o desfecho dessas infecções (CARTY, et.al. 2021). Os vírus possuem variadas estruturas genômicas, podendo ser compostos por fita positivas ou negativas, dupla ou simples, de ácido ribonucléico (RNA) ou ácido desoxirribonucléico (DNA) (AOSHI, et.al. 2011). O sistema imunológico inato é a primeira linha de defesa do organismo contra os patógenos invasores e é essencial para o desenvolvimento de repostas imunológicas antivirais, que finalizam com a eliminação desse patógeno (ZAHID, et. al. 2020).

Sabe se que as células hospedeiras reconhecem os vírus por meio de diversos receptores imunes inatos de reconhecimento de padrões (PRRs), transmembrana ou citosólicos, que desencadeiam várias vias de sinalização, fazendo uso de proteínas adaptadoras, quinases e proteínas regulatórias (AOSHI, et.al. 2011; YANG, SHU, 2020). Os receptores de membrana incluem os TLRs e os receptores de lectina do tipo C (CLRs), já os receptores localizados no citoplasma das células, podemos citar os receptores semelhantes a domínios de oligomerização de ligação a nucleotídeos (NLRs), receptores semelhantes ao gene I induzidos por ácido retinóico (RIG-I/ RLRs) e sensores citosólicos de DNA (MA, et.al. 2018; BRIARD, et.al. 2020). Esses receptores reconhecem PAMPs específicos, como os ácidos nucleicos do genoma viral, estruturas de superfície como capsídeo, e produtos da replicação viral (KOYAMA, et.al. 2008; ZAHID, et. al. 2020).

A partir da ativação dos receptores, durante a infecção viral, ocorre a cascata de sinalização associada às respostas inatas, resultando na produção de INFs, quimiocinas e citocinas (CARTY, et.al. 2021), desenvolvendo respostas de citocinas dependentes do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e repostas de INF- α e IFN- β dependentes de fatores reguladores de interferons (IRF) (AOSHI, et.al. 2011). De forma geral, os INF do tipo I e do tipo III são poderosas citocinas antivirais, capazes de induzir a expressão de genes que atuam como fatores diretos para que seja limitada a replicação viral e disseminação para outras células (ZAHID, et. al. 2020; CARTY, et.al. 2021). Citocinas como IL-6, TNF- α e IL-1 β são responsáveis por recrutar leucócitos para o local da infecção e desencadear um processo inflamatório (AOSHI, et.al. 2011).

Desta forma o sistema imune inato atua para que haja posterior ativação da resposta adaptativa, a qual permite a produção de anticorpos pelos linfócitos B, os quais podem ser classificados em anticorpos neutralizantes ou não neutralizantes, responsáveis por mediar a resposta imune humoral contra vírus (ALI, et.al. 2020; STAMBAS, et.al. 2020). Os anticorpos neutralizantes irão se ligar a um epítipo do envelope viral causando assim a neutralização da infecção viral, por bloquear a interação do vírus com o receptor celular ou impedir a liberação do genoma viral (ALI, et.al. 2020). Já os anticorpos não neutralizantes se ligam a áreas na superfície do vírus, porém não removem totalmente o vírus ou impedem a infecção. Deste modo, o imunocomplexo (vírus-anticorpo) entra na célula por endocitose (ALI, et.al. 2020).

Na resposta imune adaptativa também ocorre a ativação de linfócitos T citotóxicos, os quais eliminam as células infectadas por vírus, sendo indispensáveis para que haja uma resposta imunológica antiviral eficaz e específica (KOYAMA, et.al. 2008; CARTY, et.al. 2021). Após a infecção, os linfócitos T $CD3^+CD8^+$ serão estimulados por sinais emitidos pela ligação dos antígenos aos TCRs, moléculas coestimuladoras e citocinas inflamatórias (HASHIMOTO, et.al. 2019). Essa infecção viral provoca respostas do tipo 1, que irão promover a ativação dos linfócitos T $CD3^+CD8^+$ em linfócitos T citotóxicos (CTLs) capazes de provocar a morte das células infectadas por atuação de granzimas e perforinas, além de secretar citocinas como $IFN\gamma$ e TNF (KAECH, et.al. 2012). Além da atuação de CTLs, os linfócitos T $CD3^+CD4^+$ são estimulados a se diferenciar em linfócitos Th1, os quais atuam produzindo $IFN-\gamma$, TNF- α e IL-2, promovendo a coordenação da resposta imune antiviral e proporcionando a morte das células infectadas pelos vírus (KAECH, et.al. 2012). Podemos citar também a atuação dos linfócitos foliculares T que são responsáveis por formarem e iniciarem as respostas do centro germinativo dos linfócitos B, proporcionando a elaboração de anticorpos neutralizantes com alta afinidade viral (KAECH, et.al. 2012). Após a eliminação do vírus invasor, grande parte das células efetoras sofrem apoptose, no entanto cerca de 5 a 10% das células permanecem no organismo para posterior formação das células de memória da imunidade (HASHIMOTO, et.al. 2019). Desta forma a imunidade adaptativa é necessária para a eliminação do vírus e o estabelecimento da memória para proteção contra futuras invasões (STAMBAS, et.al. 2020).

Infecções causadas por vírus de DNA podem se manifestar de forma aguda, levando a doenças graves e potencialmente fatais, ou crônica quando o vírus é capaz de manipular as respostas imunes do hospedeiro (MA, et.al. 2018). Essas proteínas que reconhecem o DNA podem ser divididas de acordo com seu padrão de expressão e localização subcelular, a primeira

categoria são os sensores de DNA endossômicos (membros da família TLR) e a segunda categoria são os sensores responsáveis por detectar ácidos nucleicos citoplasmático na maioria dos tipos celulares (ZAHID, et. al. 2020). Ou de acordo com sua resposta final, entre os sensores de DNA que permitem a produção de INF do tipo I e aqueles que resultam na ativação de inflamassoma (BRIARD, et.al. 2020).

Iremos destacar os vírus cujo genoma é composto por RNA, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus ebola, vírus da influenza (CHEN, et.al. 2017). Dependendo da rota de entrada do vírus e o local de replicação, o RNA viral poderá ser detectado por um ou mais receptores específicos resultando na elaboração de respostas imunológicas coordenadas (LIU, et.al. 2020). Diversos sensores de RNA viral são conhecidos, os quais são capazes de detectar o RNA genômico dos vírions invasores, os fatores intermediários da replicação de RNA ou produtos de sua transcrição, que permitem subsequente ativação de respostas imunes por intermédio de IFN do tipo I ou a ativação de inflamassoma (CHAN, et.al. 2016). Os TLRs são a família de receptores de maior importância para a deflagração da resposta antiviral após a infecção (JENSEN, et.al. 2012). A família dos TLR humanos é composta por 10 membros, dos quais TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 e TLR8 são conhecidos por atuarem no processo de reconhecimento de estruturas dos vírus de RNA, incluindo o seu genoma e glicoproteínas de superfície (JENSEN, et.al. 2012). Sabe-se que a invasão de vírus de RNA regula positivamente a expressão de IFN do tipo I por meio dos TLR7, TLR8 e TLR3 (JENSEN, et.al. 2012).

Dentre os mecanismos de detecção de RNA viral de forma independente de TLR nós temos os receptores da família RLR e os NLRs que são conhecidos por serem receptores citosólicos (JENSEN, et.al. 2012). A família dos RLRs é composta por três membros, RIG-I, proteína 5 associada à diferenciação do melanoma (MDA5) e laboratório de genética e fisiologia 2 (LGP2), as quais são proteínas capazes de realizar ligação com RNA de dupla fita (dsRNA) (JACOBS, et.al. 2012; REHWINKEL, et.al. 2020) Todos os membros possuem um domínio helicase central e um domínio conhecido como carboxi-terminal (CTD), no entanto, RIG-I e MDA5 ainda possuem dois domínios de ativação e recrutamento de caspases amino-terminais (CARDs), (REHWINKEL, et.al. 2020). Após os RLRs reconhecerem o RNA presente no genoma viral, principalmente RIG-I e MDA5, estes induzem respostas de IFN do tipo I e tipo III (LIU, et.al. 2020; REHWINKEL, et.al. 2020). Estudos mostram que algumas proteínas da família NLRs podem detectar RNA de fita dupla (dsRNA) e de forma subsequente

desencadear respostas antivirais dependentes do IFN tipo I ou de inflamassoma (LIU, et.al. 2020). Diversos membros dos NLRs humanos funcionam como base para a formação dos inflamassomas, como NLRP1, NLRP3 e NLRC4, os quais permitem a regulação positiva de IL-1 e IL-18 (JACOBS, et.al. 2012; LIU, et.al. 2020).

2.5 Resposta imune contra o vírus SARS-CoV-2

A resposta imune desenvolvida pela infecção por SARS-CoV-2 ainda é pouco compreendida, mas conhecer os mecanismos moleculares e celulares que podem estar envolvidos por trás da resposta imunológica desencadeada por esse vírus é de suma importância para o aperfeiçoamento de estratégias terapêuticas que auxiliem no controle da infecção e possa melhorar o prognóstico clínico dos portadores da COVID-19 (CANEDO-MARROQUÍN, et.al. 2020).

Sabe-se que a resposta imune inata e a adquirida estão sendo ativadas pela infecção por SARS-CoV-2 (MORTAZ, et.al.2020). Após entrada nas células epiteliais do sistema respiratório o vírus SARS-CoV-2 inicia a resposta imune a partir da liberação de citocinas inflamatórias, seguida por fraca resposta de IFNs (HU, et.al. 2021). Na região pulmonar o vírus infecta os pneumócitos do tipo I e do tipo II, além dos macrófagos presentes nos alvéolos, iniciando sua replicação intracelular (CAVALCANTE-SILVA, et.al. 2020). Com a propagação da infecção e aumento na replicação viral ocorre o rompimento da integridade da barreira epitélio-endotelial pulmonar, permitindo que o vírus infecte células endoteliais nos capilares pulmonares exacerbando a inflamação permitindo o influxo de neutrófilos e monócitos (WIERSINGA, et.al. 2020). Sendo evidenciado em exames por imagem a presença de infiltrados inflamatórios mononucleares na região intersticial do pulmão, assim como edema (WIERSINGA, et.al. 2020). Ainda há a indicação de que a elevação de neutrófilos recrutados ainda imaturos ou disfuncionais auxiliam no desequilíbrio durante o combate a infecção por SARS-CoV-2 em casos graves (CAVALCANTE-SILVA, et.al. 2020).

Acredita-se que a patogênese da COVID-19 está associada a uma resposta imune inadequada ou uma reação exagerada deste sistema, tais alterações podem resultar em níveis significativamente elevados de citocinas, quimiocinas e radicais livres responsáveis por causar graves danos pulmonares e em outros órgãos alvos da COVID-19 (MORTAZ, et.al.2020). A condição citada anteriormente é conhecida como tempestade de citocinas, onde há superprodução de citocinas pró-inflamatórias com alta atividade biológica em diversas células

e tecidos, ocasionada principalmente por uma perda do feedback negativo durante a ativação do sistema imune (SONG, et.al. 2020). Destacamos que a produção exacerbada de citocinas pode gerar feedback positivo em células imunológicas, aumentando seu recrutamento para o local da infecção e desta forma há o rápido aumento da inflamação, gerando danos em múltiplos órgãos (SONG, et.al. 2020). A tempestade de citocina está associada com os casos graves da COVID-19, sendo um fator importante para a alta taxa de mortalidade dessa doença, assim como o desenvolvimento de insuficiência de múltiplos órgãos, a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e o aparecimento de coágulos intravasculares de forma disseminada (AZKUR, et.al. 2020). Essa inflamação generalizada está sendo caracterizada por aumento nos níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-1RA, CCL2, CCL8, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL16, IP-10, TNF- α e IFN- γ (AZKUR, et.al. 2020; BLANCO-MELO, et.al. 2020; YANG, et.al. 2020b). Em adição, devido a rápida replicação do vírus SARS-CoV-2 no hospedeiro ocorre piroptose celular e lise celular, permitindo a liberação massiva de citocinas e quimiocinas contribuindo para o desenvolvimento da tempestade de citocinas (SONG, et.al. 2020).

Como visto anteriormente a resposta imunológica contra vírus de forma geral está associada com a produção de IFNs do tipo I e tipo III que são capazes de induzir a produção de diversos efetores antivirais para que a célula seja capaz de resistir a infecção viral (PARK, et.al. 2020), no entanto foi observado que há uma resposta deficiente dos IFNs de ambos os tipos durante a infecção por SARS-CoV-2 (BLANCO-MELO, et.al. 2020). Sabe-se que os coronavírus tem capacidade de interferir em diversos processos gerados durante a imunidade inata antiviral, entre eles podemos destacar sua interferência no processo de produção dos IFNs, na sinalização dessas moléculas e durante a função efetora dos genes estimuladores dos IFNs (PARK, et.al. 2020) Em associação, sabe-se que o SARS-CoV e o MERS-CoV, são capazes de codificar diversas proteínas, estruturais e não estruturais, que irão antagonizar a sinalização dos IFNs e causar uma resposta tardia dessas moléculas (TAEFEHSHOKR et al. 2020; SONG, et.al. 2020). E a resposta ineficiente desses IFNs está associada com maior letalidade dos pacientes diagnosticados com a COVID-19 (CANEDO-MARROQUÍN, et.al. 2020).

Outro fator associado com a patogenicidade da infecção por SARS-CoV-2 é a ativação viral do inflamassoma citoplasmático NLRP3 (AZKUR, et.al. 2020), a qual permite a facilitação da inflamação ao produzir IL-1 β e IL-18, além de proporcionar morte celular por meio de piroptose (VAN DEN BERG, et.al. 2020; ZHAO, et. al. 2021). O SARS-CoV-2 pode realizar a ativação do inflamassoma NLRP3 de duas formas distintas, por meio de atuação direta

do vírus, ou variados eventos de sinalização celular (ZHAO, et. al. 2021). Mesmo sendo peça importante durante o combate a infecções virais pelo hospedeiro, quando esse inflamassoma é ativado pode levar a lesões patológicas nos tecidos durante o processo de infecção (ZHAO, et. al. 2021). Além de estar relacionada com o desenvolvimento de tempestade de citocinas e o desenvolvimento da SDRA nos pacientes com COVID-19 (SAEEDI-BOROUJENI, et. al. 2020; ZHAO, et. al. 2021). Por fim, há em conjunto a associação do inflamassoma de NLRP3 com o desenvolvimento de coágulos, danos ao endotélio e aos alvéolos pulmonares, pois este permite que haja elevação dos níveis de IL-1 β , o qual permite um aumento no número de neutrófilos ativados e esses produzem de forma mais abundante suas armadilhas extracelulares (NETs) que irão gerar os danos citados (ZHAO, et.al. 2021).

Em conjunto a imunidade inata possui como parte da sua atividade humoral as moléculas do sistema complemento, sendo observado que este, durante a infecção por SARS-CoV-2, está sendo fortemente ativado na região pulmonar, circulação e nos rins dos pacientes (NORIS, et. al. 2020). A exacerbação do sistema complemento pode resultar em aumento significativo da infiltração de neutrófilos e monócitos nos alvéolos e excessiva produção das anafilotoxinas C3a e C5a (SHIBABAW, et. al. 2020). Sendo C5a uma das moléculas responsáveis por desencadear a liberação de outras citocinas resultando em deterioração das células endoteliais com consequente aumento de permeabilidade dos vasos (SHIBABAW, et. al. 2020). Além disso são evidenciadas fortes relações entre a ativação exagerada do sistema complemento com o desenvolvimento de alterações trombóticas durante infecções por SARS-CoV-1 e MERS-CoV e dados similares são encontrados quando avaliados a participação das moléculas do sistema complemento na patogênese da trombose presente nos pacientes com COVID-19 (CONWAY, et. al. 2020).

Outras alterações imunológicas presentes em pacientes diagnosticados com COVID-19 com maior grau de severidade é a presença de linfopenia, ativação e função de linfócitos alteradas, anormalidades nos granulócitos e monócitos (YANG, et.al. 2020a). Assim como em outras doenças virais respiratórias linfopenia profunda pode estar presente nos pacientes com a COVID-19, pois o vírus SARS-CoV-2 pode infectar e matar os linfócitos T, além de ser potencialmente prejudicial à linfopoiese (WIERSINGA, et.al. 2020). Nesses pacientes há diminuição nos níveis de linfócitos totais, dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (YANG, et.al. 2020b). Essa linfopenia de linfócitos T associada com a tempestade de citocinas, também possui correlação com o agravamento dos casos de COVID-19 (HU, et.al. 2021). Além disso, é

conhecido que no momento da infecção por SARS-CoV as células apresentadoras de antígenos possuem alteração em suas funções, assim como uma migração prejudicada das células dendríticas, o que resulta em redução da preparação das células T (MORTAZ, et.al.2020). Além da linfopenia dos linfocitos T, há ainda a redução de linfócitos B (YANG, et.al. 2020b), no entanto há indicação que essa alteração não se encontra significativa durante a resposta imunológica dos pacientes com COVID-19 (YANG, et.al. 2020a). Ainda é evidenciado em exames laboratoriais a redução dos eosinófilos nos pacientes com a COVID-19, sendo essa condição associada com a gravidade dos casos da doença (ZHANG, et.al. 2020; ROSENBERG, et. al. 2021). De forma geral a presença de eosinopenia no organismo está acompanhada por redução de linfócitos, plaquetas, assim como aumento de proteína C reativa e IL-6 (ROSENBERG, et. al. 2021).

Desta forma, destacamos que a atividade do sistema imunológico tem impacto significativo na patogênese da COVID-19, assim como na gravidade dessa doença. É de fundamental conhecer os efeitos do SARS-CoV-2 na citocinas e anafilotoxinas séricas em pacientes com COVID-19.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral: investigar valor prognóstico da dosagem de painel de citocinas e anafilotoxinas em pacientes diagnosticados com COVID-19.

Objetivos específicos:

- Avaliar a secreção das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, CXCL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, TNF- α , GM-CSF, IP-10, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- λ 1 e IFN- λ 2/3 no plasma dos pacientes com COVID-19 e doadores controle;
- Quantificar os níveis das anafilotoxinas C3a, C4a e C5a no plasma dos pacientes diagnosticados com COVID-19 e doadores controle;
- Correlacionar os parâmetros de citocinas e anafilotoxinas entre os grupos com os desfechos clínicos de alta hospitalar ou óbito durante o período da pesquisa, assim como características demográfica e clínicas dos pacientes;
- Avaliar a curva de sobrevivência dos pacientes diagnosticados com COVID-19 de acordo com características clínicas e demográficas;
- Analisar o poder preditivo da quantificação das anafilotoxinas para o diagnóstico da COVID-19, assim como seu prognóstico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Participantes

A pesquisa possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, pela Plataforma Brasil, nº 30732120.1.0000.5013, assim como do Comitê de pesquisa do Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA-UFAL). Para a participação no estudo foi necessária a assinatura prévia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Contudo, no caso dos indivíduos hospitalizados, seguindo os protocolos de biossegurança, o consentimento foi obtido por meio de ligação telefônica e envio do TCLE por meio do aplicativo Whatsapp para o familiar mais próximo ou responsável legal pelo paciente hospitalizado, com a posterior assinatura eletrônica do TCLE.

A presente pesquisa trata-se de um estudo observacional do tipo transversal, no qual foram incluídos 76 participantes, dos quais 56 apresentaram diagnóstico positivo para SARS-CoV-2 por RT-qPCR. Estes exames foram conduzidos pelo próprio HUPAA-UFAL, confirmando que os participantes estavam com COVID-19 no momento da internação. Os outros 20 participantes foram indivíduos voluntários recrutados com idade, gênero e comorbidades prévias pareadas. Também foram realizados testes de RT-qPCR para confirmar que os participantes saudáveis não estavam infectados por SARS-CoV-2. Esses testes foram realizados por meio de parceria com o Prof. Marcelo Duzzioni do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da UFAL e somente foram admitidos os casos negativos. Também realizamos teste de ELISA (*EUROIMMUN - Alemanha*; Lot:E200514AS) para IgA e IgG específicas para proteína S de SARS-CoV-2. Por apresentar alta concentração de IgA, 1 controle foi excluído, resultando ao final em 19 controles utilizados no estudo.

4.2. Critérios de inclusão e exclusão no estudo

4.2.1 Critérios de inclusão

No grupo COVID-19, foram inclusos no estudo pacientes que deram entrada na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) ou Enfermaria do HUPAA-UFAL, no período de maio a julho de 2020, e que apresentaram testes moleculares positivos para SARS-CoV-2. No grupo controle, foram inclusos 19 indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 30 e 90 anos, e comorbidades

similares aos dos indivíduos internados, como *Diabetes mellitus* tipo II (DMII), hipertensão arterial sistêmica (HAS) e obesidade.

4.2.2 Critérios de exclusão

No grupo COVID-19 foram excluídos os participantes sem confirmação por RT-qPCR. Dentre os voluntários, foram excluídos do presente estudo, aqueles que relataram sintomas gripais, como febre, tosse, cefaleia e dispneia, nos 30 dias que antecederam a pesquisa, ou que apresentaram teste RTq-PCR positivo para SARS-Cov-2 no momento da coleta, ou que apresentaram sorologia positiva para IgA ou IgG, assim como presença de doenças genéticas, doenças autoimunes, como Lúpus eritematosos sistêmico, doenças neurodegenerativas, como Esclerose lateral amiotrófica, doenças reumáticas e pacientes com câncer em estado terminal em uso de cuidados paliativos.

4.3 Coleta de Sangue

De todos os participantes, foram coletados cerca de 2 mL de sangue total em tubos com EDTA, os quais foram utilizados para posterior processamento e separação de plasma e dos leucócitos, como detalhado no item a seguir. As coletas de sangue dos indivíduos hospitalizados foram realizadas pelos técnicos do Laboratório de Análises Clínicas do HUPAA-UFAL, no momento da internação. Já as coletas de sangue dos indivíduos saudáveis voluntários foram realizadas por mim, no Laboratório de Biologia Celular, respeitando todos os critérios de biossegurança. Ainda, dos voluntários saudáveis foram coletados um acréscimo de 4 mL de sangue total para a realização de exames hematológicos e bioquímicos, os quais foram realizados pelo Laboratório de Diagnóstico de Alagoas – LABOAL.

4.4 Processamento e armazenamento das amostras

Após a obtenção de sangue total dos indivíduos, os tubos foram transportados ao Laboratório de Biologia Celular - LBC/UFAL, onde foi executada a separação do plasma com 30 minutos de centrifugação a 1000 g, para posterior armazenamento a - 80 °C. Este plasma foi distribuído em diferentes alíquotas, definidas a seguir:

- 1- 62,5 µl do plasma destinados para análise do Kit LEGENDplex™ *Human Anti-Virus Response Panel* (13 plex ,BioLegend, Reino Unido)
- 2- 62,5 µl do plasma destinados para uso no Kit LEGENDplex™ *Human CD8/NK Panel* (13 plex, BioLegend, Reino Unido)

- 3- 50 µl do plasma para avaliação das anafilotoxinas do sistema complemento pelo Kit CBA *Human Anaphylatoxin* (BD Biosciences, EUA)

Nas alíquotas destinadas para analisar as moléculas do sistema complemento, antes do armazenamento, foi adicionado FUT-175 (Futhan; 552035; BD), sendo utilizado como inibidor das vias clássicas e alternativas do sistema complemento, preservando as anafilotoxinas no momento da coleta. Sendo utilizado 10 µL de FUT-175 a cada 100 mL de plasma.

4.4 Dados clínicos e laboratoriais

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com COVID-19 foram obtidos por meio de análise dos prontuários eletrônicos, enquanto os dados dos participantes controles foram obtidos após consulta com médico no HUPAA/UFAL e resultados dos testes laboratoriais. As variáveis analisadas foram idade, sexo, presença das comorbidades: DMII, HAS, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doença renal crônica (DRC), obesidade, asma, doenças autoimunes, doença hepática e câncer; sintomas apresentados, duração dos sintomas após admissão; desfecho (óbito ou alta hospitalar); internação na unidade de terapia intensiva (UTI) ou enfermaria; pontuação qSOFA (0-3), e informações sobre testes laboratoriais para avaliação de dados sobre: hemoglobina, plaquetas, leucócitos totais e individuais, ferritina, proteína C reativa, creatinina, glicose, triglicerídeos, colesterol total, ureia, cálcio, potássio, e sódio.

4.3 Detecção de citocinas por citometria de fluxo

As amostras armazenadas foram descongeladas para análise da concentração plasmática de citocinas por citometria de fluxo, para detecção de diferentes citocinas e anafilotoxinas. Por meio de Kits LEGENDplex™ *Human Anti-Virus Response Panel* (13 plex - Cat. 740390, Lot B310340, BioLegend), analisamos as seguintes citocinas IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN-α2, IFN-β, IFN-λ1 (IL-29), IFN-λ2/3 (IL-28A/B) IFN-γ, TNF-α, IP-10, GM-CSF, seguindo especificações do fabricante. Para complementar a análise de citocinas, utilizado de forma complementar o Kit LEGENDplex™ *Human CD8/NK Panel* (13 plex - Cat. 740267, Lot B314528, BioLegend), pelo qual foi analisado IL-2, IL-4, IL-6 e IL-17A, conforme instruções do fabricante. Em adição, quantificamos as anafilotoxinas C3a, C4a e C5a com o Kit CBA *Human Anaphylatoxin* (Cat. 561418, Lot 0017360, BD Biosciences), conforme instruções do fabricante. As citocinas foram detectadas com o citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences), utilizando o programa FACS Diva (BD Biosciences). Os resultados do kit da BD foram avaliados utilizando o programa *FlowJo X* (BD Biosciences) e os resultados dos kits da

Biolegend foram analisados utilizando o programa Legendplex v. 8.0 (Biolegend). Os resultados foram convertidos e apresentados em pg/mL.

4.4 Análise estatística

Para categorizar as amostras presentes no estudo, a estatística descritiva utilizada para variáveis quantitativas foi por meio do uso de medianas/interquartil, enquanto para as variáveis categóricas, utilizamos porcentagem. No estudo optamos por não retirar os *outliers*, visto que queremos demonstrar de forma mais fidedigna a realidade encontrada. Para correlacionar os níveis de citocinas e anafilotoxinas com as características clínicas e demográficas dos pacientes utilizamos teste não paramétricos, por se tratar de amostras que não apresentam distribuição normal, comparando os valores de medianas encontrados.

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para avaliarmos a igualdade das medianas dos indivíduos agrupados em dois grupos distintos. Foi utilizado nas análises comparativas das citocinas com dados clínicos como febre, hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes mellitus II (DMII), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), neutrofilia, leucopenia, linfopenia, uso de ventilação mecânica, desfecho clínico (alta ou óbito), para a comparação entre pacientes dos grupos COVID-19 e controle, e entre dados demográficos como sexo e idade.

Já o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de comparações múltiplas de Dunn foi utilizado quando agrupamos os indivíduos em três ou mais grupos distintos, para dados como: qSOFA, a síndrome do desconforto respiratório, pacientes com ou sem câncer quando comparados com o grupo controle, os níveis de triglicérideo e ferritina, o tempo de internação na enfermaria ou UTI e o tempo de internação total dos pacientes, analisar a comparação entre pacientes internados com os indivíduos pertencentes ao grupo controle, e para avaliar os dias de sintomas dos indivíduos diagnosticados com COVID-19.

Para correlação das variáveis laboratoriais com os níveis de citocinas e anafilotoxinas foi utilizado a correlação de Spearman, com intervalo de confiança de 95%. Os dados laboratoriais analisados por meio dessa correlação foram: ferritina, plaquetas, hemoglobina, neutrófilos, leucócitos, linfócitos, taxa de filtração glomerular (TGF), a razão entre linfócitos e neutrófilos e proteína C reativa (PCR).

Avaliamos também a chance de sobrevida dos pacientes diagnosticados com SARS-Cov-2, considerando o tempo de início dos sintomas até o desfecho clínico (óbito ou alta), a partir da curva de sobrevivência, pelo teste de hipótese Gehan-Breslow Wilcoxon. Através desse teste foram observadas características clínicas e demográficas, a fim de verificar seu impacto sobre a sobrevida dos pacientes. Dentre estas, avaliamos os seguintes parâmetros: uso de ventilação mecânica, HAS, DM II, síndrome do desconforto respiratório agudo, DPOC, câncer, triglicerídeos, linfopenia, leucocitose e neutrofilia; e características demográficas como sexo e idade. Para o cálculo do risco relativo (*Hazard ratio* -HR), foi utilizado o teste Logrank (Mantel-Cox), com intervalo de confiança de 95%.

E por fim, foi avaliado o poder preditivo da quantificação das anafilotoxinas (C3a e C4a) em distinguir os pacientes diagnosticados com COVID-19 de acordo com o seu prognóstico, diferenciando os pacientes hospitalizados na enfermaria e aqueles internos na UTI, para tal análise foi realizado o método da curva ROC, o qual permite avaliar a acurácia do desempenho de testes diagnósticos ou prognósticos.

Todos os resultados estatísticos foram considerados significantes quando o valor de p foi igual ou menor que 0,05 ($P < 0,05$), sendo realizada as análises por meio do programa *Prism 8* (GraphPad, EUA) e a curva ROC foi elaborada a partir do programa *MetaboAnalyst 5.0* disponibilizado online.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização dos participantes diagnosticados com a infecção por SARS-CoV-2.

Todos os pacientes encontravam-se hospitalizados no HUPAA-UFAL, 30 pacientes encontravam-se na UTI, representando maior severidade da doença, 27 pacientes eram internos da enfermaria, sendo estes classificados como um grau moderado da COVID-19 (Tabela 1). Referente aos dados demográficos dos pacientes hospitalizados, a média de idade dos participantes do estudo foi de 59,43 anos para os pacientes hospitalizados na UTI e 64,52 anos para os que estavam internos nas enfermarias (Tabela 1). Ao observarmos o gênero, o feminino foi o mais prevalente representando 32 pacientes, cerca de 56% do total da amostra, enquanto o masculino representa 25 pacientes, equivalente a 43,85% dos pacientes, sendo observado um maior número de mulheres hospitalizadas na UTI, 60% dos participantes desse grupo (Tabela 1). Nos pacientes participantes do estudo a HAS foi a comorbidade mais observada, estando presente em 35 pacientes (61,40%), representando 66,67% dos pacientes UTI e 55,56% dos pacientes enfermaria. Após a HAS a DMII é a segunda comorbidade mais prevalente presente em 30 participantes com COVID-19 (52,63%), equivalendo a 53,33% dos pacientes UTI e 51,85% dos pacientes hospitalizados na enfermaria (Tabela 1). Além das comorbidades já citadas, em nossa amostra foram encontrados 21 pacientes com câncer, 15 pacientes com DPOC e 2 pacientes com doença renal crônica (Tabela 1)

Da sintomatologia clínica apresentada pelos pacientes no momento da admissão, a dispneia é o sintoma mais predominante, o qual esteve presente em 53 pacientes diagnosticados com COVID-19 (92,98%), e ao avaliarmos esse sintoma por modalidade de internação, foi constatado que 100% dos pacientes UTI apresentaram dispneia (Tabela 1). A dispneia foi seguida por tosse em 43 dos pacientes (75,43%), 39 pacientes apresentaram SDRA (68,42%), assim como febre (68,42%) (Tabela 1). Outros sintomas foram citados, com menor frequência, entre eles mialgia, diarreia, anosmia e cefaleia (Tabela 1).

Durante o período de internação para avaliação da gravidade da disfunção do organismo foi aplicado um sistema de pontuação que realiza a quantificação das alterações baseada em alguns fatores. No HUPAA-UFAL foi utilizado o escore de avaliação de falência de órgãos relacionado a sepse (SOFA), o qual é utilizado para descrever quantitativamente e objetivamente o grau de disfunção ou falência de órgãos ao longo do tempo em pacientes, a pontuação varia do 0 (normal) até 4 (maior grau de anormalidade) (Vincent, et.al. 1996). Nos participantes incluídos no estudo, 9 apresentaram o qSOFA normal e 48 apresentaram algum

tipo de anormalidade, com qSOFA superior a 1 (Tabela 1). Onde 100% dos pacientes internos na UTI tiveram pontuação maior que 1 no escore qSOFA, evidenciado o maior grau de severidade destes pacientes.

Dentre os dados laboratoriais avaliados observamos redução significativa nos níveis de hemoglobina nos pacientes diagnosticados com COVID-19, tanto os hospitalizados na UTI quanto os pacientes da enfermaria, quando comparados ao grupo controle (Tabela 1). Na avaliação de células imunológicas, observamos redução na contagem de linfócitos nos pacientes com COVID-19, quando comparados ao controle, já os leucócitos e neutrófilos mostraram-se significativamente elevados nos pacientes diagnosticados com COVID-19 quando comparados com o grupo controle (Tabela 1). Ao analisarmos moléculas como ferritina, CPK, proteína C reativa, creatinina e ureia, podemos observar elevação nos níveis de ferritina e proteína C reativa nos pacientes com COVID-19 quando comparado com o controle e apenas os pacientes com COVID-19 hospitalizados na UTI apresentaram aumento nos níveis de ureia (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização demográfica e clínicas dos pacientes diagnosticados com COVID-19 incluídos no estudo.

Características	Grupo Controle (n=19)	Pacientes Enfermaria (n=27)	Pacientes UTI (n=30)
Idade, Média ± SD	57,84 ± 12,76	64,52 ± 16,93	59,43 ± 17,67
Sexo, N°. (%)			
Masculino	9 (47,37)	13 (48,15)	12 (40,00)
Feminino	10 (52,63)	14 (51,85)	18 (60,00)
Comorbidades, N°. (%)			
Hipertensão	7 (36,84)	15 (55,56)	20 (66,67)
Diabetes	2 (10,52)	14 (51,85)	16 (53,33)
Doença pulmonar obstrutiva crônica	0 (00,00)	8 (29,63)	7 (23,33)
Doença renal crônica	0 (00,00)	1 (3,70)	1 (03,33)
Câncer	0 (00,00)	16 (59,26)	5 (16,67)
Sintomas, N°. (%)			
Febre	-	16 (59,26)	23 (76,67)
Tosse	-	20 (74,07)	23 (76,67)
Dispneia	-	23 (85,19)	30 (100,0)
SDRA	-	15 (55,56)	24 (80,00)
Anosmia	-	3 (11,11)	0 (00,00)
Diarreia	-	6 (22,22)	3 (10,00)
Mialgia	-	9 (33,33)	7 (23,33)
Cefaleia	-	3 (11,54)	0 (00,00)
qSOFA = 0	-	9 (33,33)	0 (00,00)
qSOFA > 1	-	18 (66,67)	30 (100,0)
Bioquímica, Mediana (Q3 – Q1)			
Hemoglobina	14,10 (14,60 – 13,60)	11,35 (12,85 – 10,01)****	13,04 (13,76 – 11,26)**
Plaquetas	233.000 (274.000 – 194.000)	191.500 (304.250 – 155.000)	239.000 (336.500 – 162.000)
Leucócitos	6.000 (7.600 – 5.300)	10.300 (15.250 – 6.300)**	11.250 (16.125 – 7.550)****
Linfócitos	2.214 (2.631 – 1.992)	1.244 (1.752 – 679)***	962 (1.700 – 610)****
Neutrófilos	3.168 (4.044 – 2.750)	7.018 (10.645 – 4.738)****	8.407 (12.901 – 5.623)****
Ferritina	148,10 (266,20 -118,95)	1.195 (2.469 – 321)****	1.483 (2.950 – 584)****
CPK	143 (212,10 – 109,50)	114 (193 – 44)	96 (348 – 69)
Proteína C reativa	1,94 (4,95 – 0,74)	95 (172 – 56)****	129 (235 – 43)****
Creatinina	1,01 (1,11 – 0,97)	0,93 (1,06 – 0,75)	0,98 (1,68 – 0,70)
Ureia	32,60 (37,35 – 27,45)	39 (60 – 27)	51 (88 – 32)**

Teste de Mann-Whitney em comparação ao grupo controle. * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0,0001. Fonte: autora.

5.2 Avaliação dos níveis séricos das citocinas por citometria de fluxo.

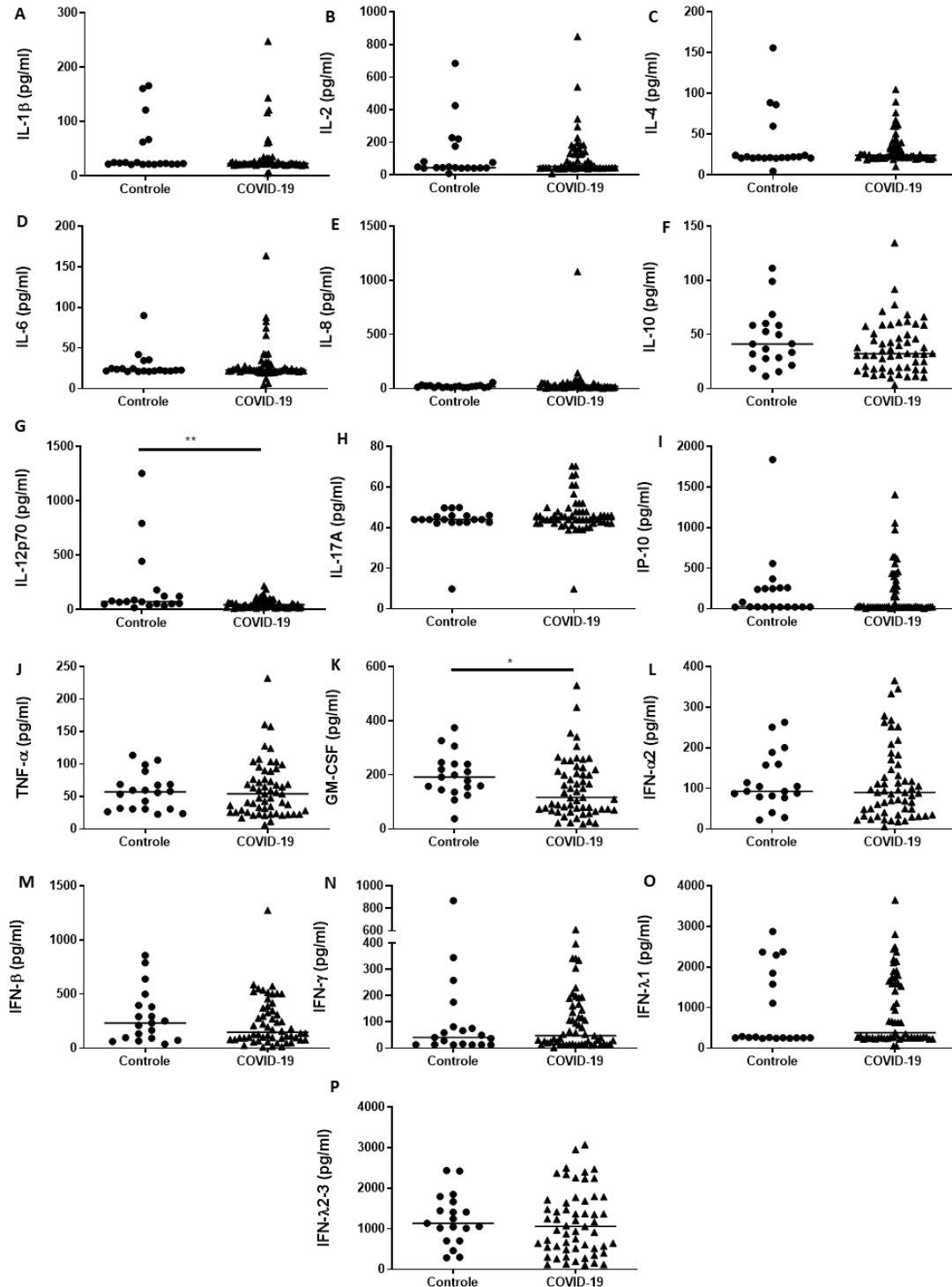
5.2.1 Redução de IL-12p70 e GM-CSF em pacientes diagnosticados com COVID-19.

Inicialmente avaliamos os níveis de citocinas presentes no plasma de pacientes diagnosticados com COVID-19 e dos voluntários que não possuíam a infecção por SARS-CoV-2. Foi possível observar que os pacientes com COVID-19 apresentaram redução significativa das citocinas IL-12p70 (mediana, 45,07; Intervalo interquartil (IQR), 76,55 - 21,71; $p=0,0045$) e GM-CSF (117,0; 216,6 - 71,71; $p= 0,0322$) quando comparados ao grupo controle (Figura 5 G e K). As demais citocinas não apresentaram alterações estatisticamente significantes.

5.2.2 Alteração dos níveis de citocinas em pacientes com COVID-19 idosos e adultos.

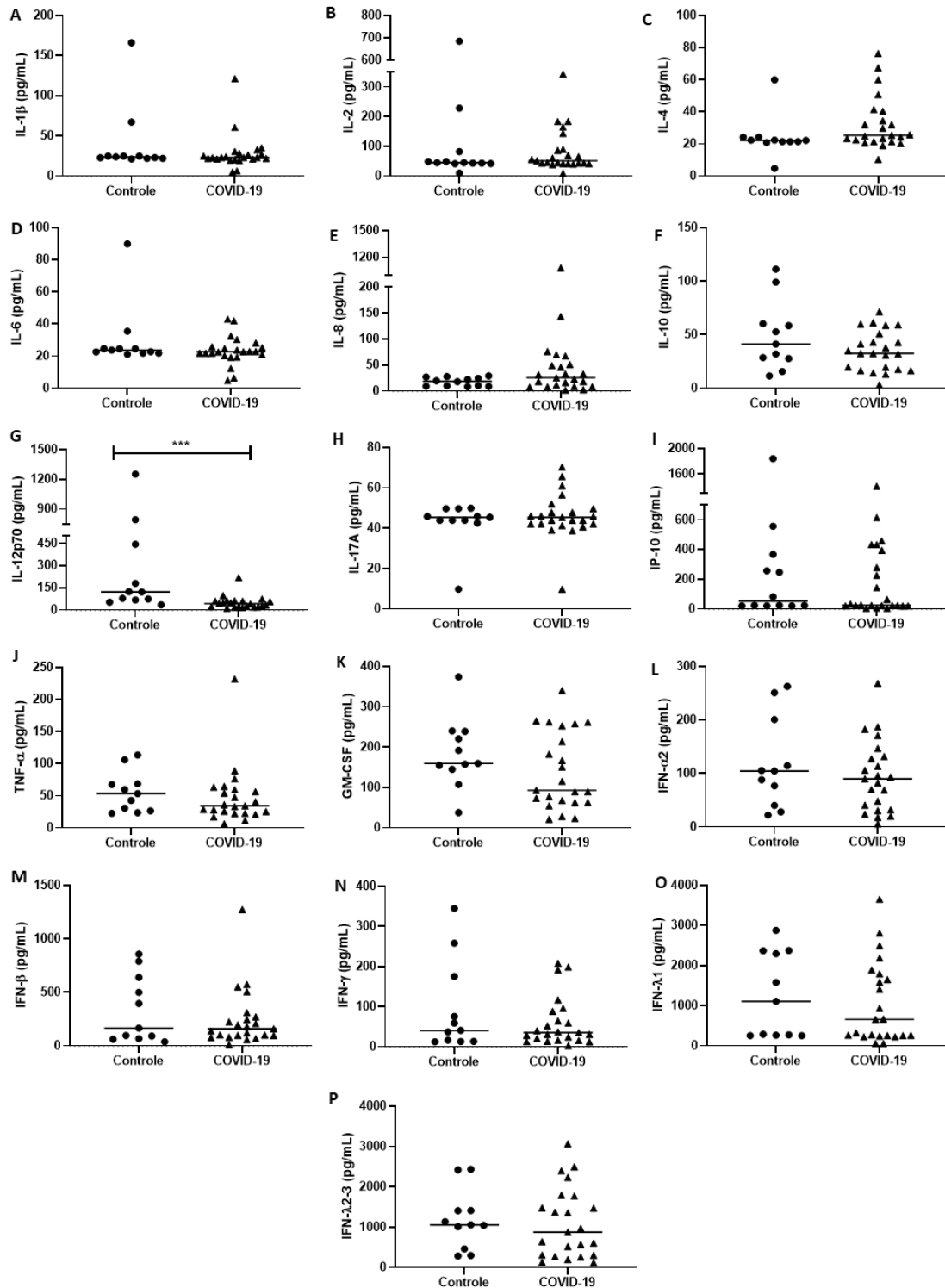
Em seguida, avaliamos se a idade estaria afetando a expressão de citocinas nos pacientes positivos para SARS-CoV-2. Primeiro dividimos os participantes em dois grupos, os adultos que possuíam idade entre 19 e 59 anos e os idosos, idade a partir de 60 anos. Ao analisarmos os níveis das citocinas dos pacientes adultos em comparação com o grupo adulto que não possuía a COVID-19, encontramos uma expressiva redução da citocina IL-12p70 (43,06; 60,76 - 23,04; $p= 0,0006$) nos pacientes adultos quando comparado com o controle (Figura 6 G). Em relação aos participantes idosos podemos ver aumento na quantificação de INF- λ 1 (381,8; 1666 - 264,1; $p=0,0193$) quando comparado com o controle na mesma faixa etária (Figura 7 O). Tanto para adultos como idosos as demais citocinas avaliadas não apresentaram alterações significativas (Figura 6 e 7 respectivamente).

Figura 5 - Avaliação do nível sérico de citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 em relação a doadores controle.



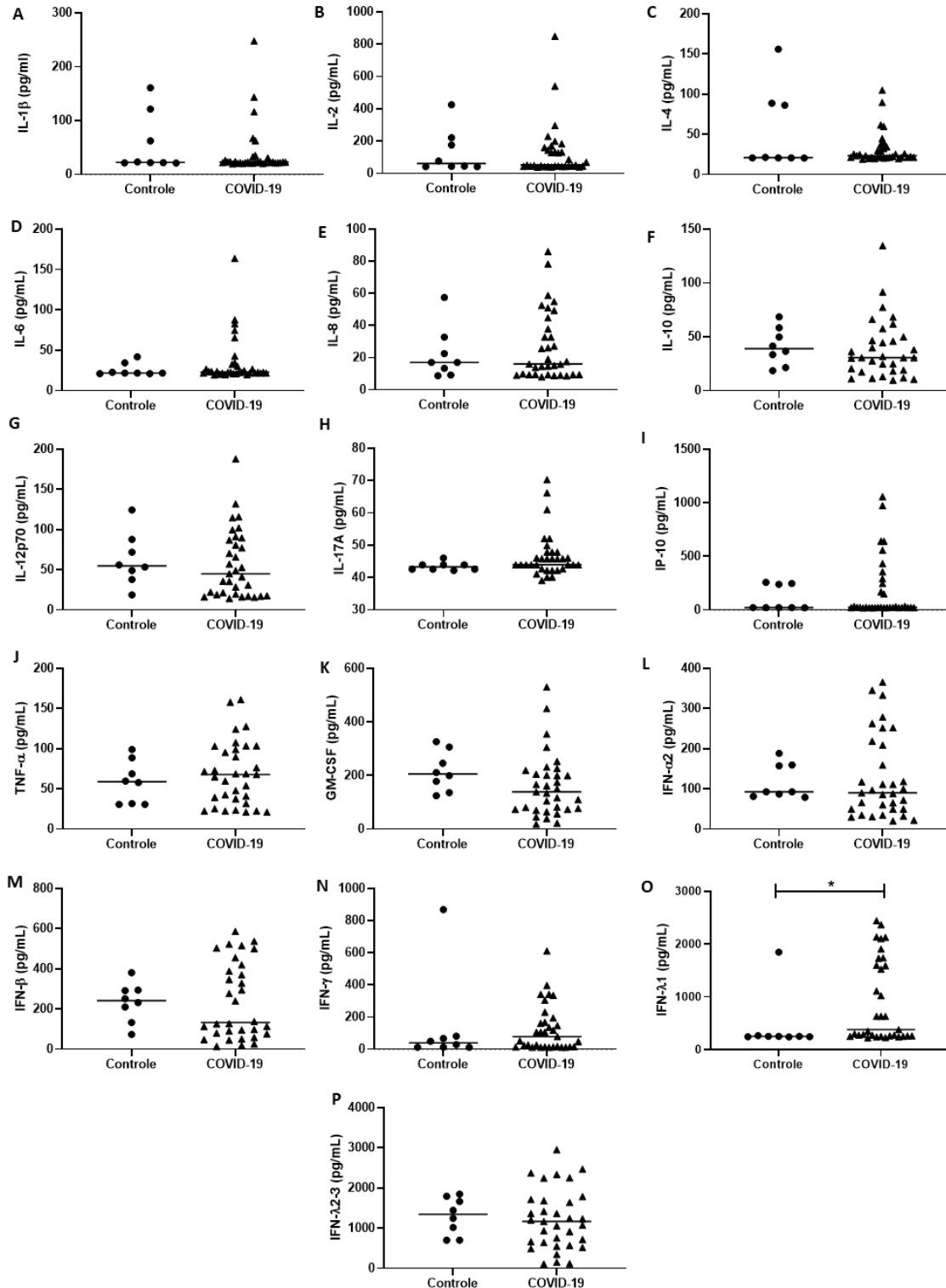
Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das citocinas IL-1 β (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-6 (D), IL-8 (E), IL-10 (F), IL-12p70 (G), IL-17A (H), IP-10 (I), TNF- α (J), GM-CSF (K), IFN- α 2 (L), IFN- β (M), IFN- γ (N), IFN- λ 1 (O) e IFN- λ 2-3 (P) em pacientes diagnosticados com COVID-19 e voluntários controle. Grupo COVID-19: N 56; Grupo Controle: N 19. Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. * $p = 0,0322$; ** $p = 0,0045$. Fonte: autora.

Figura 6 - Avaliação dos níveis séricos de citocinas em pacientes adultos menores de 60 anos.



Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das citocinas IL-1 β (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-6 (D), IL-8 (E), IL-10 (F), IL-12p70 (G), IL-17A (H), IP-10 (I), TNF- α (J), GM-CSF (K), IFN- α 2 (L), IFN- β (M), IFN- γ (N), IFN- λ 1 (O) e IFN- λ 2-3 (P) em pacientes adultos diagnosticados com COVID-19 comparados com doadores adultos sem a infecção. Grupo Controle: N 11; Grupo COVID-19: N 23; Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. *** $p = 0,0006$. Fonte: autora

Figura 7 - Avaliação dos níveis séricos de citocinas em pacientes idosos.

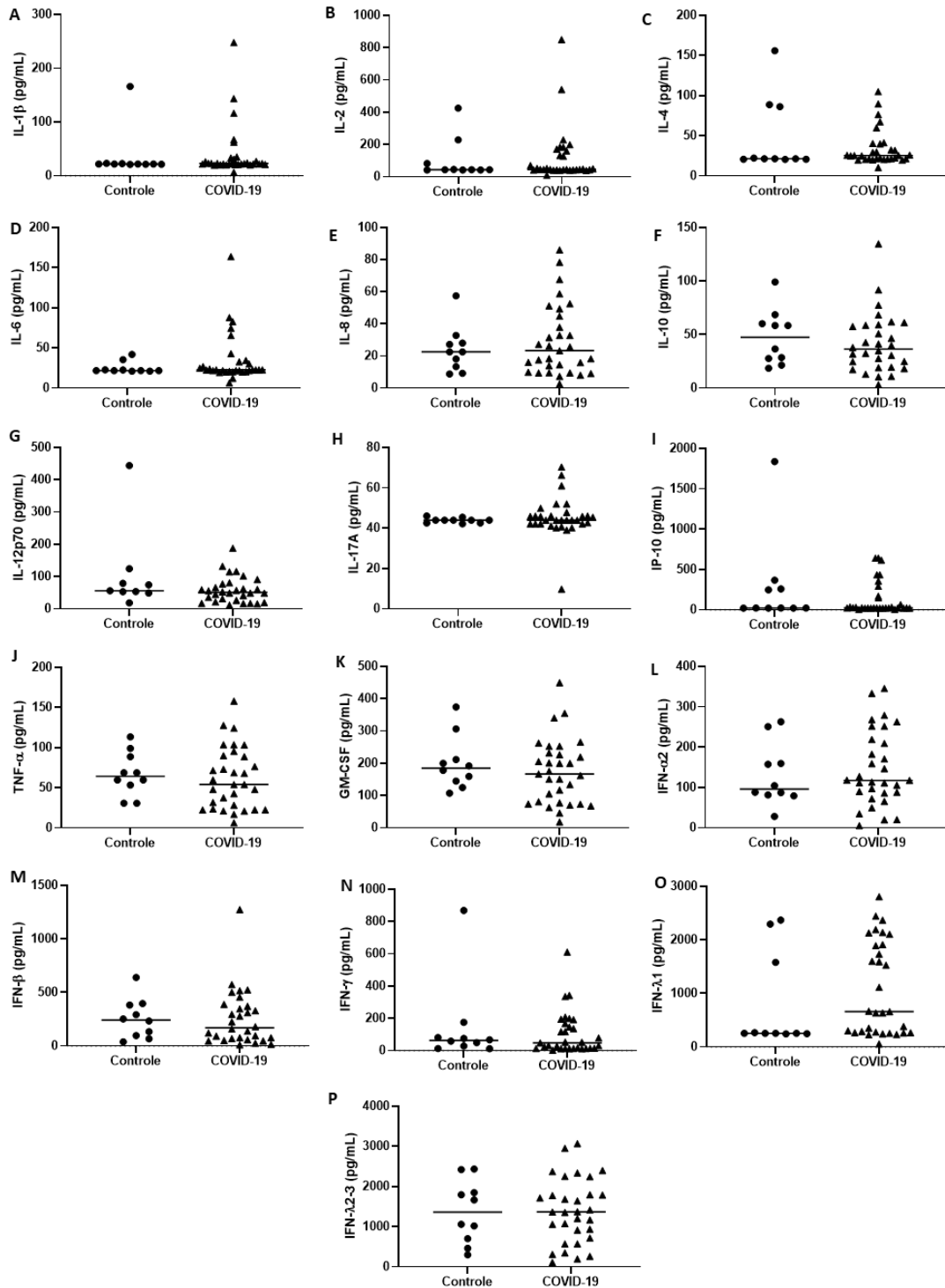


Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das citocinas IL-1 β (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-6 (D), IL-8 (E), IL-10 (F), IL-12p70 (G), IL-17A (H), IP-10 (I), TNF- α (J), GM-CSF (K), IFN- α 2 (L), IFN- β (M), IFN- γ (N), IFN- λ 1 (O) e IFN- λ 2-3 (P) em pacientes idosos diagnosticados com COVID-19 comparados com doadores idosos sem a infecção. Grupo Controle: N 8; Grupo COVID-19: N 33; Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. * $p = 0,0193$. Fonte: autora

5.2.3 Diferença nos níveis de citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 após comparação entre os sexos feminino e masculino.

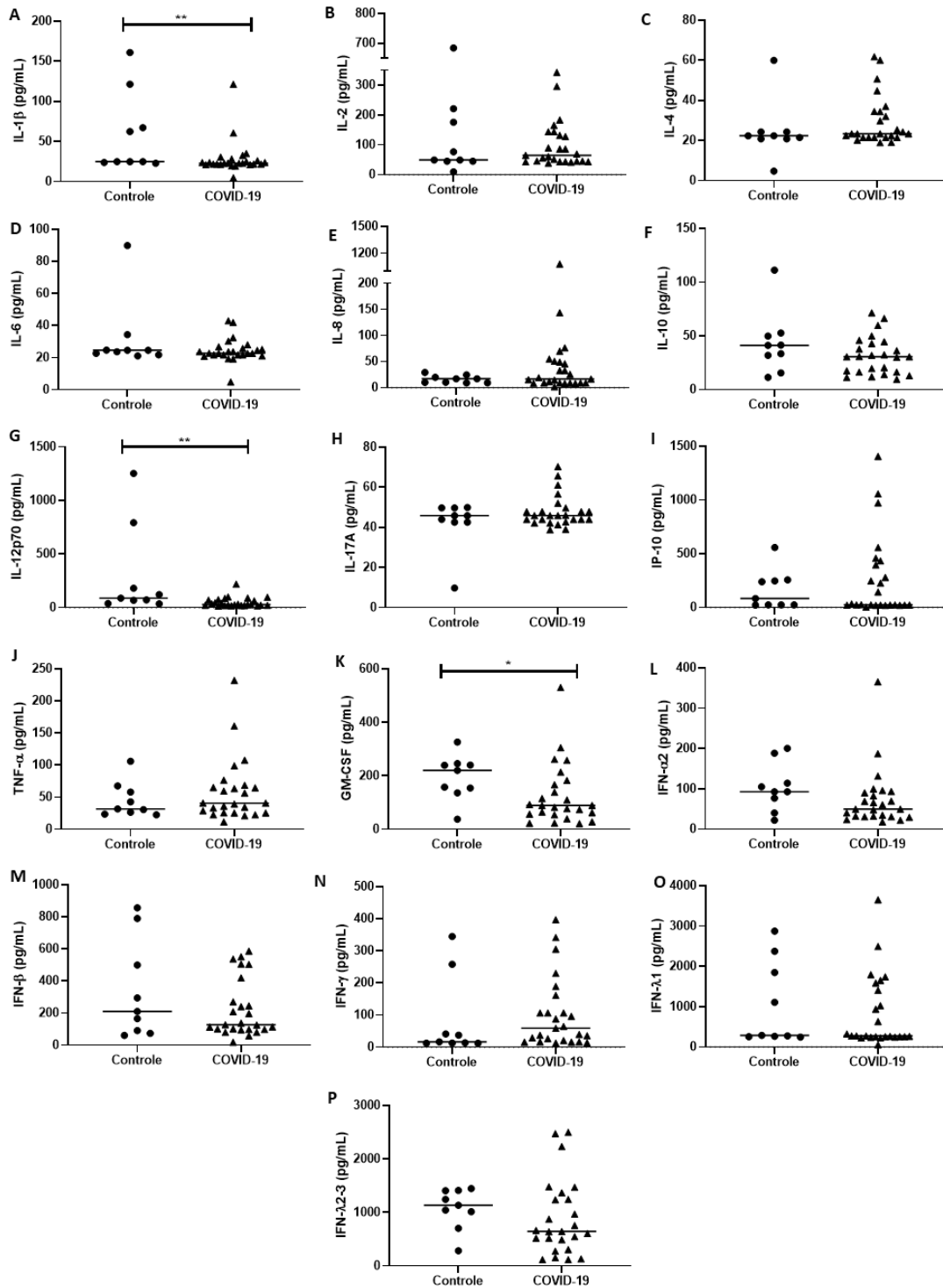
Ao avaliarmos os níveis de citocinas presente no plasma sanguíneo de mulheres com COVID-19, não foram identificadas alterações estatisticamente significantes (Figura 8). O mesmo teste foi realizado para a avaliação da diferença nas citocinas séricas dos pacientes masculinos, sendo constatado que há uma redução em IL-1 β (22,90; 27,15-21,66; $p=0,0094$), IL-12p70 (28,53; 72,25-20,08; $p=0,0031$) e GM-CSF (89,30; 174,7-55,58; $p=0,0400$), quando estes são comparados com o grupo controle do mesmo sexo (Figura 9). Após identificar essas diferenças entre grupo controle e pacientes com COVID-19, decidimos investigar se estaria havendo alterações significativas nas citocinas ao compararmos pacientes diagnosticados com COVID-19 separados por sexo. Sendo observado que as mulheres diagnosticadas com a infecção por SARS-CoV-2 apresentam níveis mais elevados de GM-CSF (166,8; 231,8-77,16; $p=0,0360$), IFN- α 2 (117,4; 218,7-86,11; $p=0,0007$) e IFN- λ 2-3 (1364; 1797-717,0; $p= 0,0191$) quando comparados com o sexo masculino (Figura 10).

Figura 8- Avaliação dos níveis séricos de citocinas em pacientes do sexo feminino.



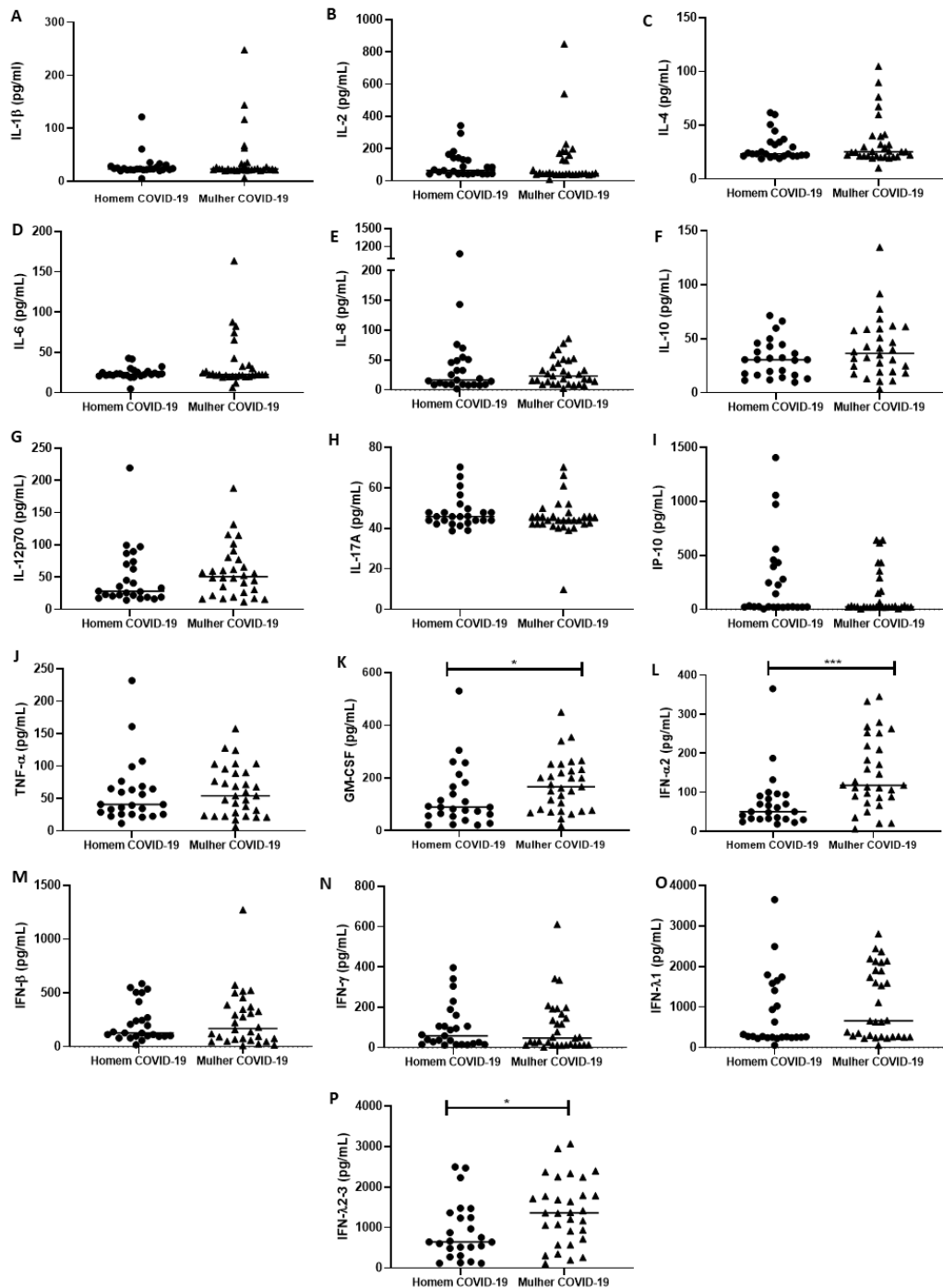
Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das citocinas IL-1 β (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-6 (D), IL-8 (E), IL-10 (F), IL-12p70 (G), IL-17A (H), IP-10 (I), TNF- α (J), GM-CSF (K), IFN- α 2 (L), IFN- β (M), IFN- γ (N), IFN- λ 1 (O) e IFN- λ 2-3 (P) em pacientes do sexo feminino diagnosticados com COVID-19 comparados com doadores do mesmo sexo sem a infecção. Grupo Controle: N 10; Grupo COVID-19: N 31; Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. Fonte: autora

Figura 9 - Quantificação das citocinas em pacientes do sexo masculino.



Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das citocinas IL-1 β (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-6 (D), IL-8 (E), IL-10 (F), IL-12p70 (G), IL-17A (H), IP-10 (I), TNF- α (J), GM-CSF (K), IFN- α 2 (L), IFN- β (M), IFN- γ (N), IFN- λ 1 (O) e IFN- λ 2-3 (P) em pacientes do sexo masculino diagnosticados com COVID-19 comparados com doadores do mesmo sexo sem a infecção. Grupo Controle: N 9; Grupo COVID-19: N 25; Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. * $p = 0,0400$; ** $p < 0,009$. Fonte: autora

Figura 10 - Avaliação das citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 de acordo com o sexo.



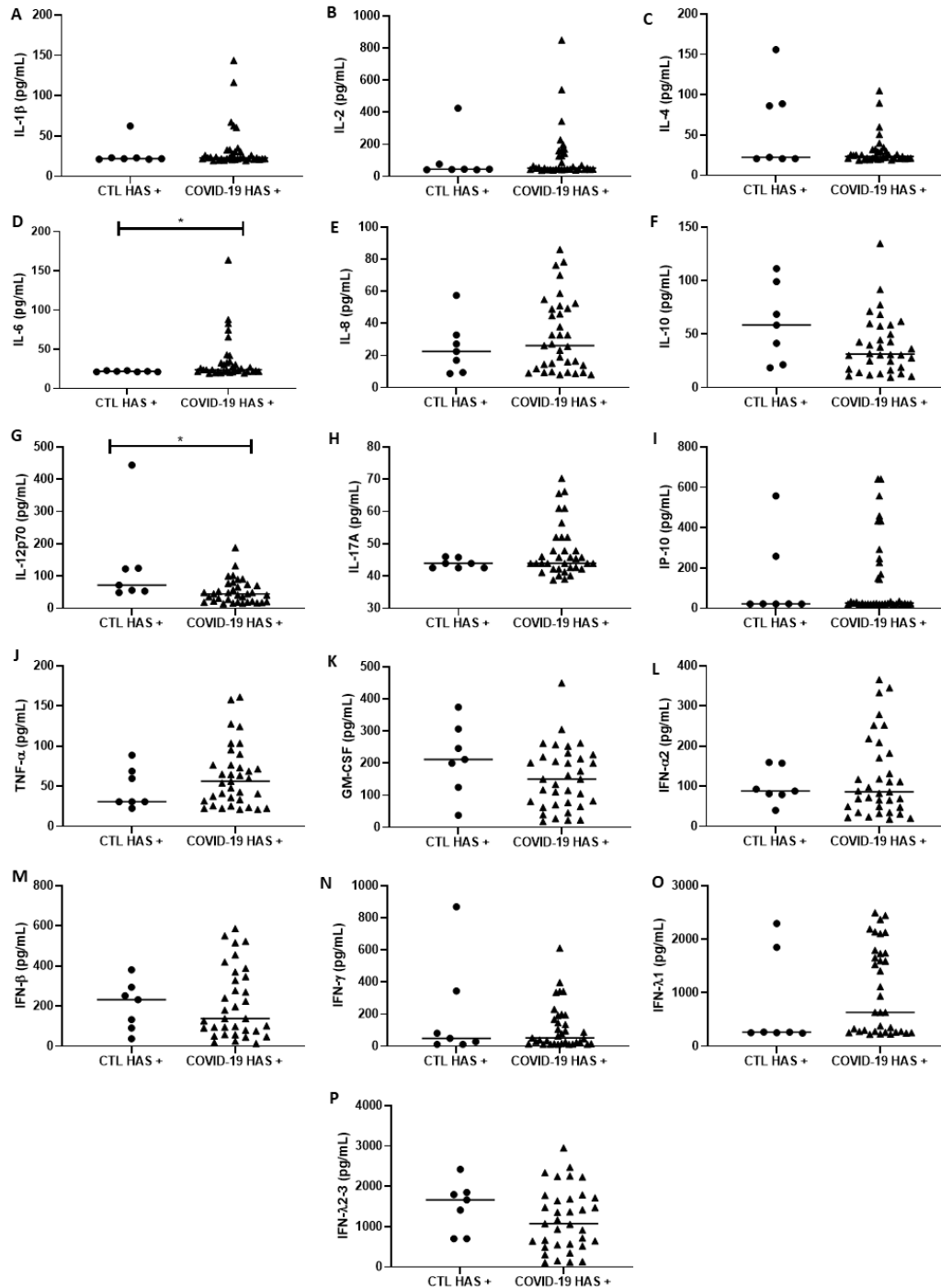
Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das citocinas IL-1 β (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-6 (D), IL-8 (E), IL-10 (F), IL-12p70 (G), IL-17A (H), IP-10 (I), TNF- α (J), GM-CSF (K), IFN- α 2 (L), IFN- β (M), IFN- γ (N), IFN- λ 1 (O) e IFN- λ 2-3 (P) em pacientes diagnosticados com COVID-19 dos sexos feminino e masculino. Grupo Masculino: N 25; Grupo Feminino: N 31; Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$; *** $p = 0,0007$. Fonte: autora.

5.2.4 Níveis de citocinas em pacientes com COVID-19 e a influência da presença de comorbidades nessas moléculas.

Ao caracterizarmos nossa amostra foi notório a grande quantidade de pacientes que possuíam comorbidades, tais como HAS, DMII, DPOC e câncer, por esse motivo agrupamos os pacientes de acordo com a presença dessas desordens para verificar como poderiam estar afetando os níveis de citocinas presentes no plasma. Inicialmente avaliamos a influência de HAS nos pacientes com COVID-19 quando comparados com voluntários controle com a mesma comorbidade. Foi observado que em pacientes com HAS e COVID-19 há uma elevação de IL-6 (23,71; 32,81-21,78; $p=0,0410$) (Figura 11 D) e redução nos níveis de IL-12p70 (44,91; 74,27-20,91; $p=0,0141$), quando comparados com o grupo controle (Figura 11 G). Em seguida, avaliamos apenas os pacientes hospitalizados com COVID-19 divididos pela presença ou ausência de HAS, sendo encontrado novamente a elevação de IL-6 (23,71; 32,81- 21,78; $p=0,0268$) no plasma de pacientes que possuíam a HAS e COVID-19, quando comparado com pacientes positivos para SARS-CoV-2 sem HAS (Figura 12 D).

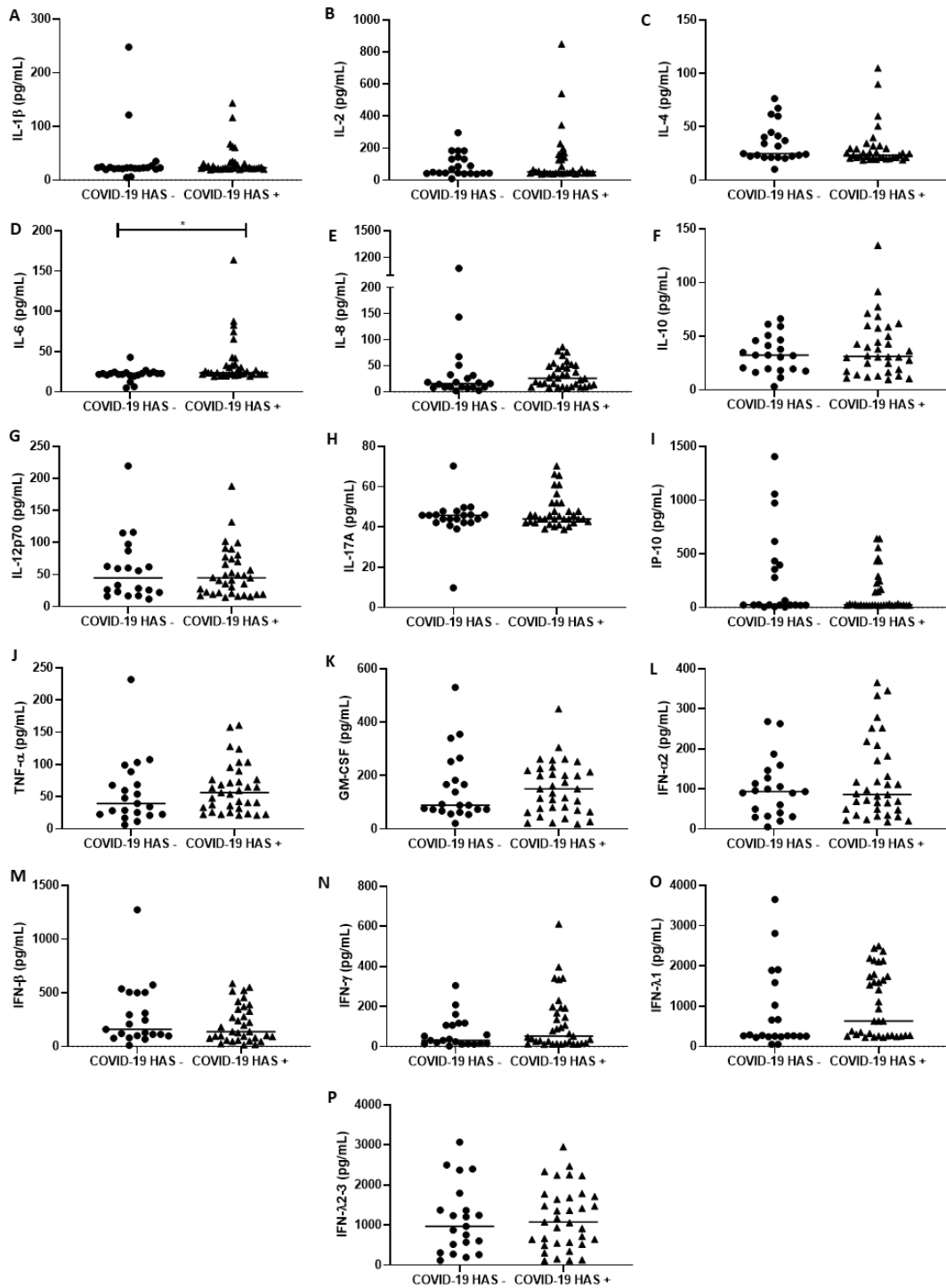
Também foi avaliada a presença de DMII em pacientes com COVID-19 e como esta estaria afetando a produção de citocinas, observamos o aumento no quantitativo de TNF- α (66,91; 100,2- 33,84; $p=0,0309$) nos pacientes COVID-19 com DMII, quando comparados ao grupo COVID-19 sem a comorbidade (Figura 13 J). Analisamos ainda como a DPOC poderia afetar os níveis das citocinas nos pacientes com a infecção por SARS-CoV-2, para isso agrupamos os pacientes com COVID-19 em dois grupos, os que possuíam a DPOC (DPOC+) e os que não possuíam a comorbidade (DPOC -). Ao realizarmos a quantificação das citocinas nesses pacientes foi constatado que tal comorbidade não estaria associada alterações significativas nas citocinas avaliadas (Figura 14). Por último, analisamos o impacto do câncer nos pacientes com COVID-19 sobre os níveis de citocinas, nesse caso os pacientes com COVID-19 foram agrupados em pacientes com câncer (COVID-19 CA +) e sem câncer (COVID-19 CA -). Ao realizarmos o comparativo do nível de citocinas, foi detectado alteração significativa apenas na IL-12p70 (30,91; 58,31-19,38; $p=0,0015$), onde há redução nos níveis dessa citocina no grupo câncer -, quando comparamos com o grupo controle (Figura 15 G). E ao compararmos os grupos COVID-19 CA - e COVID-19 CA +, observamos um aumento significativo nos níveis de IL-12p70 (70,22; 99,67-35,47; $p=0,0348$) nos pacientes com câncer (Figura 15 G).

Figura 11 – Quantificação das citocinas nos pacientes portadores de hipertensão arterial sistêmica (HAS) e diagnosticados com COVID-19 comparados com o grupo controle com a mesma comorbidade.



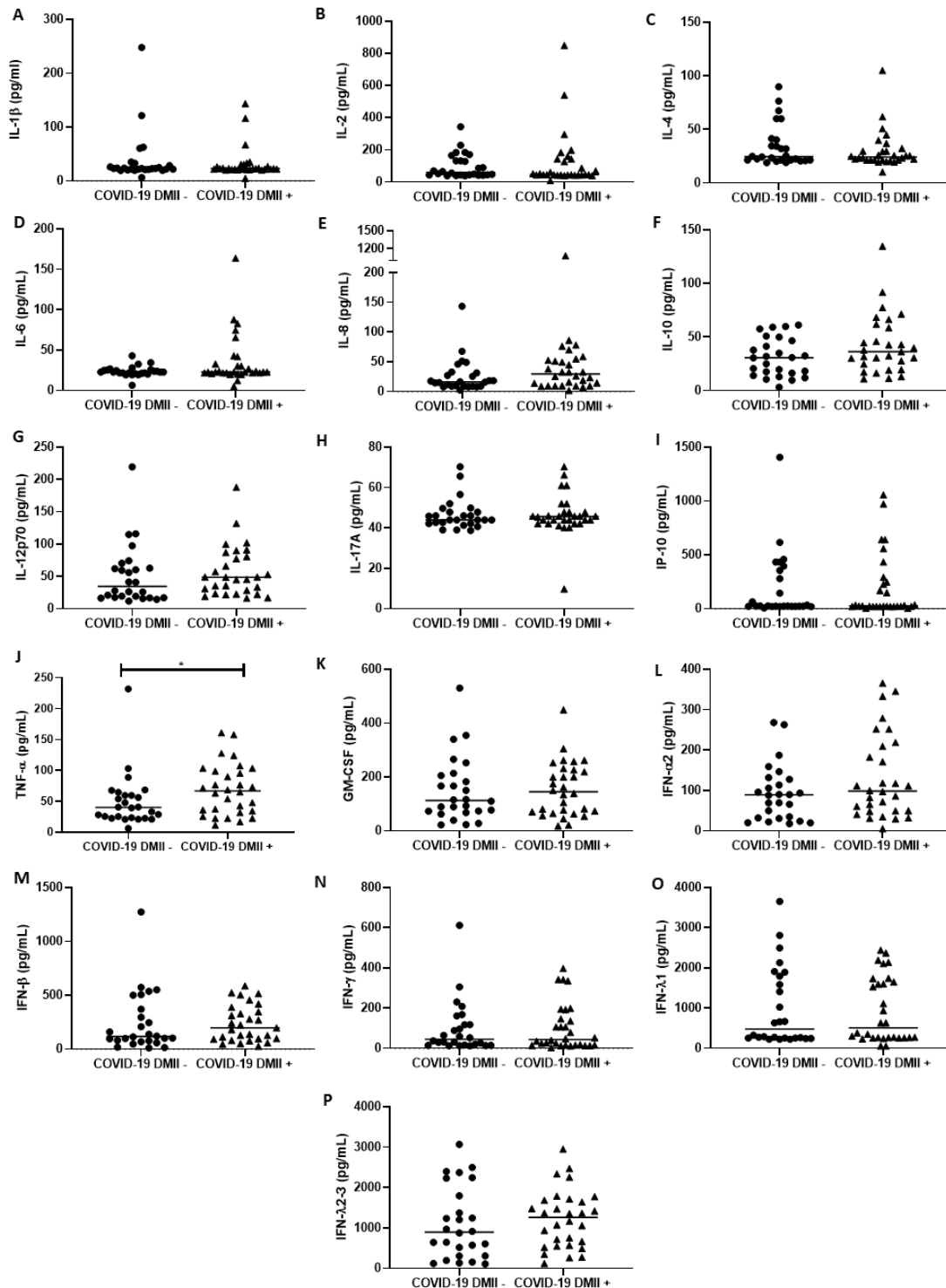
Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das citocinas IL-1 β (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-6 (D), IL-8 (E), IL-10 (F), IL-12p70 (G), IL-17A (H), IP-10 (I), TNF- α (J), GM-CSF (K), IFN- α 2 (L), IFN- β (M), IFN- γ (N), IFN- λ 1 (O) e IFN- λ 2-3 (P) em pacientes diagnosticados com COVID-19 que possuíam HAS (COVID-19 HAS+) em comparação com o grupo com doadores controle com HAS (CTL HAS+). Grupo COVID-19 HAS+: N 35; Grupo CTL HAS+: N 7; Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney.; * $p < 0,05$. Fonte: autora

Figura 12- Avaliação dos níveis séricos de citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 e portadores de hipertensão arterial sistêmica (HAS).



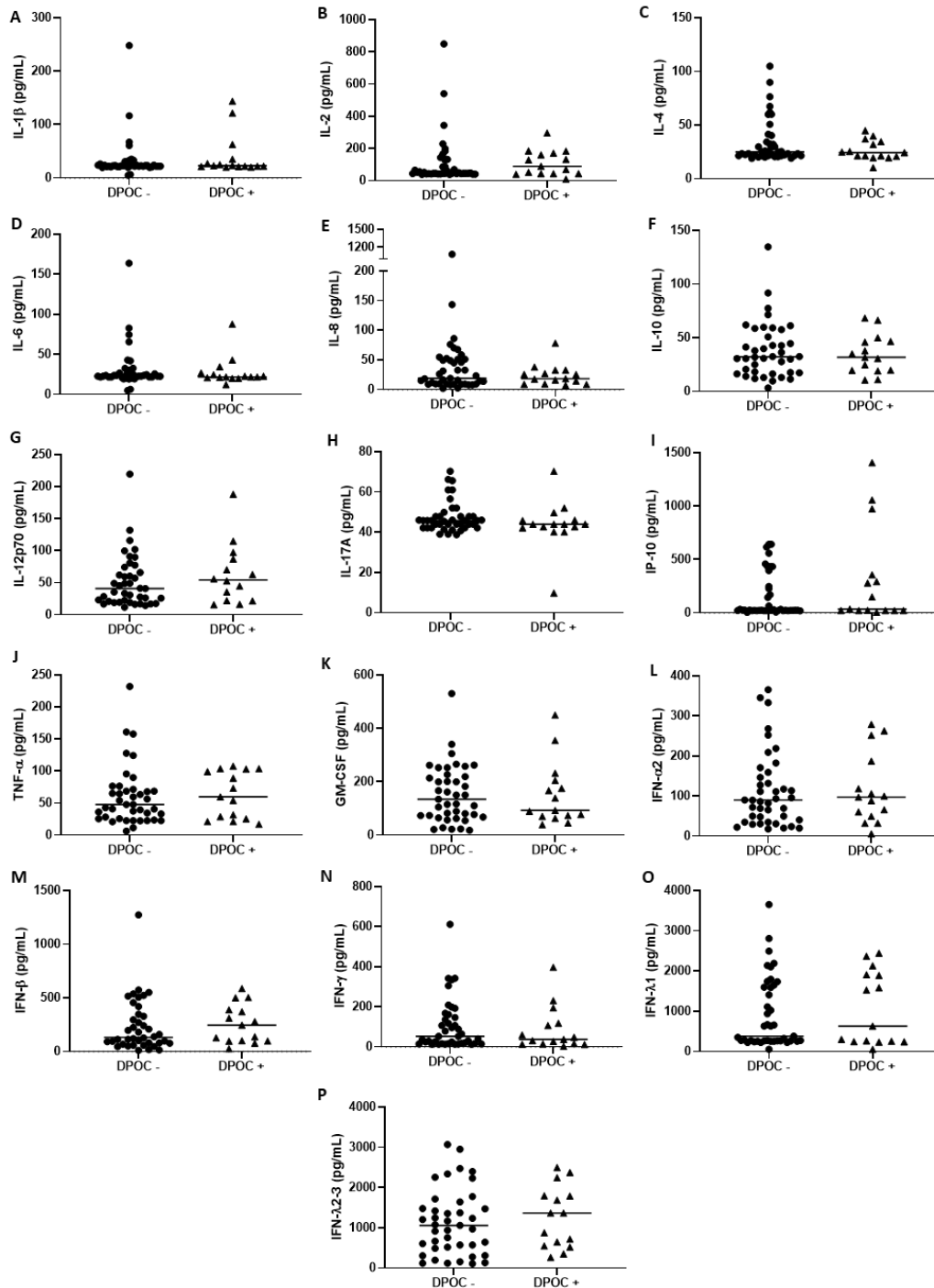
Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das citocinas IL-1 β (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-6 (D), IL-8 (E), IL-10 (F), IL-12p70 (G), IL-17A (H), IP-10 (I), TNF- α (J), GM-CSF (K), IFN- α 2 (L), IFN- β (M), IFN- γ (N), IFN- λ 1 (O) e IFN- λ 2-3 (P) em pacientes diagnosticados com COVID-19 que possuíam HAS (HAS+) em comparação com o grupo sem a comorbidade (HAS-). Grupo HAS+: N 35; Grupo HAS- : N 21; Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney.; * $p = 0,0268$. Fonte: autora

Figura 13 – Análise dos níveis séricos de citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 e portadores de *diabetes mellitus* tipo II (DMII).



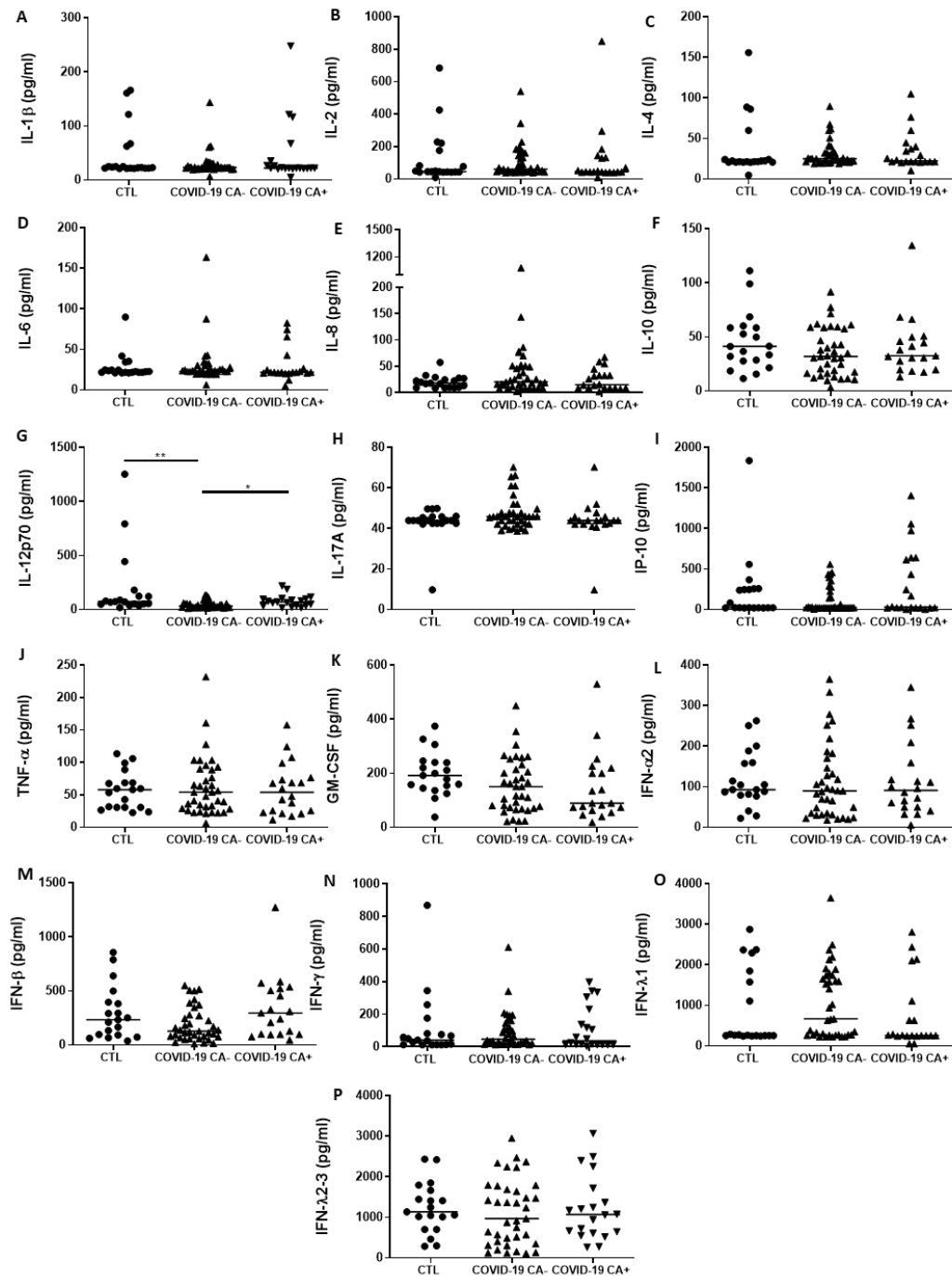
Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das citocinas IL-1 β (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-6 (D), IL-8 (E), IL-10 (F), IL-12p70 (G), IL-17A (H), IP-10 (I), TNF- α (J), GM-CSF (K), IFN- α 2 (L), IFN- β (M), IFN- γ (N), IFN- λ 1 (O) e IFN- λ 2-3 (P) em pacientes diagnosticados com COVID-19 que possuíam DMII (DMII+) em comparação com o grupo sem a comorbidade (DMII-). Grupo DMII+: N 30; Grupo DMII- : N 26; Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney.; * $p = 0,0309$. Fonte: autora

Figura 14 – Análise de citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 e portadores doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).



Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das citocinas IL-1 β (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-6 (D), IL-8 (E), IL-10 (F), IL-12p70 (G), IL-17A (H), IP-10 (I), TNF- α (J), GM-CSF (K), IFN- α 2 (L), IFN- β (M), IFN- γ (N), IFN- λ 1 (O) e IFN- λ 2-3 (P) em pacientes diagnosticados com COVID-19 que possuíam DPOC (DPOC+) em comparação com o grupo sem a comorbidade (DPOC-). Grupo DPOC+: N 15; Grupo DPOC- : N 41; Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. Fonte: autora

Figura 15 - Análise quantitativa dos níveis séricos de citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 que possuíam câncer ou não, comparados com o grupo controle.



Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das citocinas IL-1 β (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-6 (D), IL-8 (E), IL-10 (F), IL-12p70 (G), IL-17A (H), IP-10 (I), TNF- α (J), GM-CSF (K), IFN- α 2 (L), IFN- β (M), IFN- γ (N), IFN- λ 1 (O) e IFN- λ 2-3 (P) em pacientes diagnosticados com COVID-19 associada a câncer (COVID-19 CA+) em comparação com participantes sem câncer com COVID-19 (COVID-19 CA-) e voluntários sem câncer (CTL), Grupo Controle: N 19; Grupo COVID-19 CA-: N 37; Grupo COVID-19 CA+: N 20; Análise estatística por meio do teste ANOVA e pós teste de Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0005$. Fonte: autora

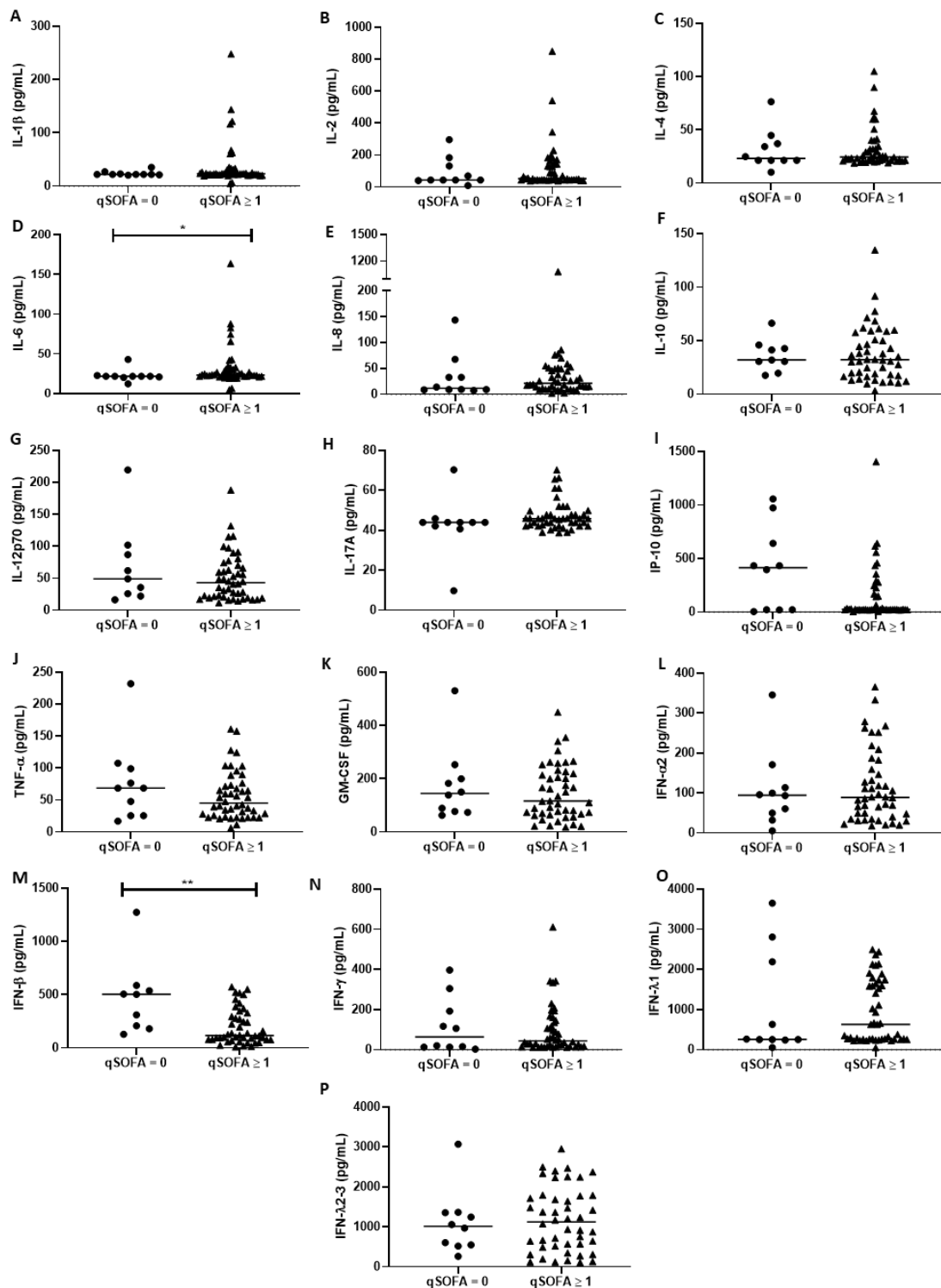
5.2.5 Avaliação da alteração nos níveis séricos das citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 de acordo com o escore qSOFA.

Como citado anteriormente o escore SOFA é utilizado para a avaliar os níveis de dano aos órgãos durante uma infecção, quanto maior o grau do qSOFA maior será a gravidade da doença. Diante disso, decidimos avaliar como esse critério clínico de estadiamento da doença estaria se relacionando com os níveis de citocinas no plasma de pacientes com COVID-19. Agrupamos os pacientes, entre aqueles que não tiveram disfunções dos órgãos, ou seja, que tiveram pontuação zero no qSOFA (qSOFA=0) e os que possuíam algum grau de alteração (qSOFA \geq 1), quanto maior a pontuação maior o dano e conseqüentemente a severidade da COVID-19. Sendo observada redução do IFN- β (117,2; 303,5-77,10; $p= 0,0021$) no grupo qSOFA \geq 1, comparado ao grupo qSOFA=0 (Figura 16 M) e aumento nos níveis de IL-6 (23,25; 30,25- 21,78; $p= 0,0408$) no grupo qSOFA \geq 1, quando comparado com o grupo que possui qSOFA=0 (Figura 16 D).

5.2.6 Avaliação do impacto do uso da ventilação mecânica, como terapêutica para a infecção por SARS-CoV-2, na produção de citocinas.

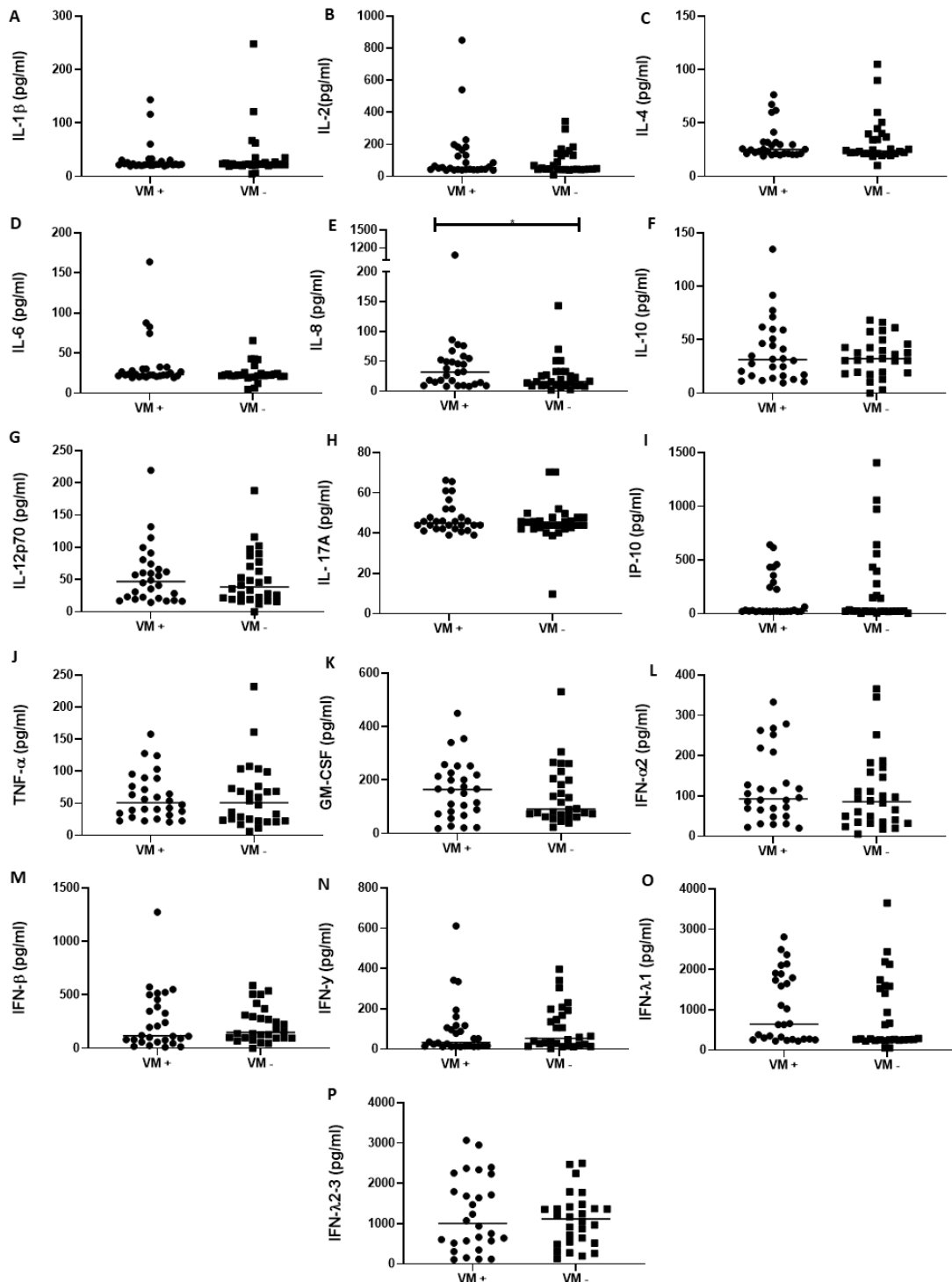
Entre os critérios relacionados com a gravidade da COVID-19, elencamos a utilização da ventilação mecânica (VM) como terapêutica no tratamento dos pacientes. Desta forma, para avaliar o impacto da VM separamos os pacientes em dois grupos, aqueles que fizeram uso dessa técnica (VM+) e o que não necessitaram utilizar a VM em seu tratamento (VM-). E foi possível identificar alteração nos níveis séricos de IL-8 (32,13; 54,30- 12,50; $p= 0,0341$), a qual encontrava-se aumentada nos pacientes que utilizaram a VM (Figura 17 E). As demais citocinas avaliadas não tiveram modificações significativas.

Figura 16 – Quantificação dos níveis séricos de citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 de acordo com o escore SOFA (qSOFA).



Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das citocinas IL-1β (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-6 (D), IL-8 (E), IL-10 (F), IL-12p70 (G), IL-17A (H), IP-10 (I), TNF-α (J), GM-CSF (K), IFN-α2 (L), IFN-β (M), IFN-γ (N), IFN-λ1 (O) e IFN-λ2-3 (P) em pacientes diagnosticados com COVID-19 de acordo com a pontuação obtida no escore SOFA, Grupo qSOFA 0: N 10; Grupo qSOFA ≥1: 46; Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$. Fonte: autora

Figura 17 – Avaliação dos níveis de citocinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 submetidos ou não à ventilação mecânica (VM).

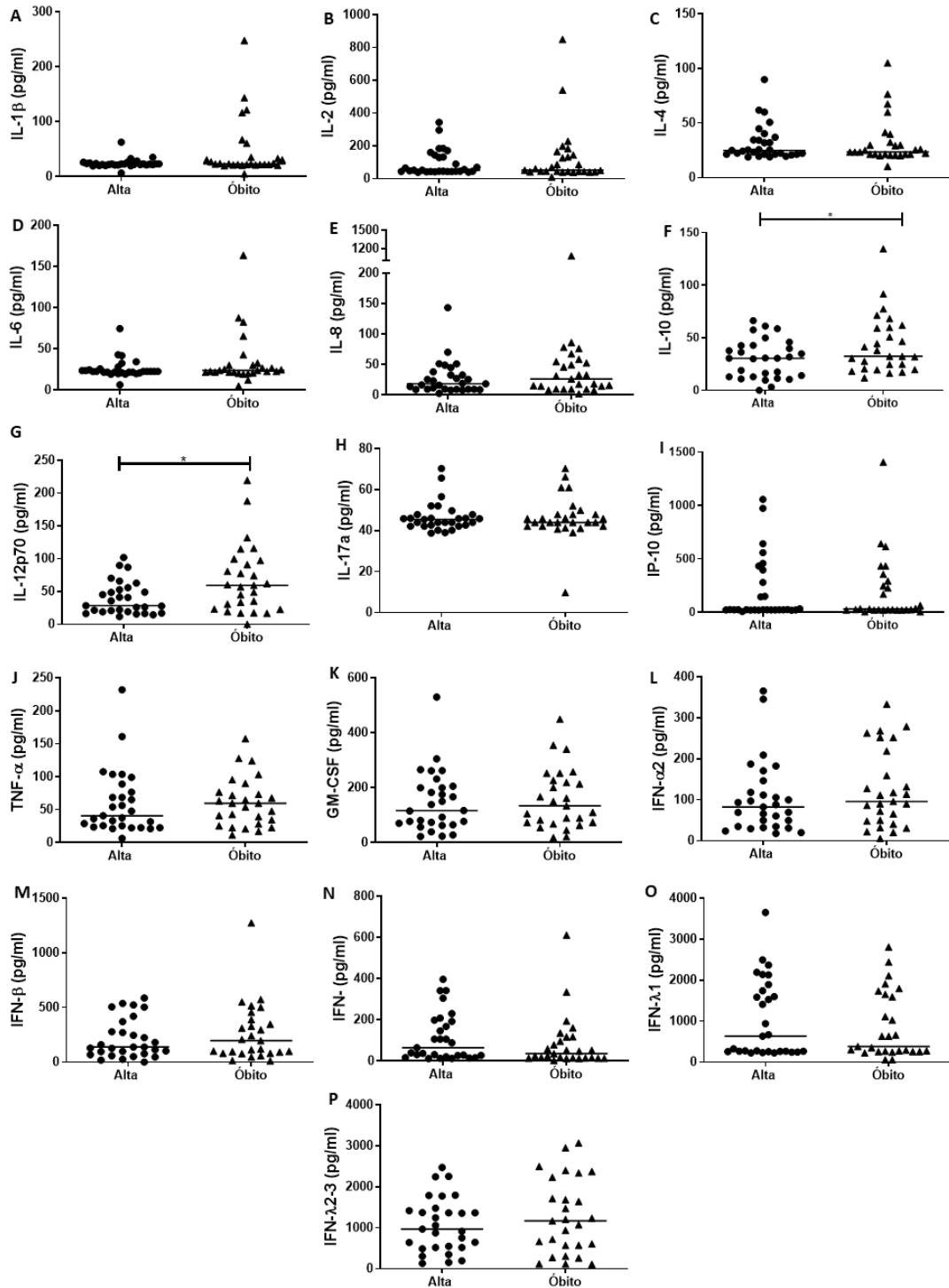


Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das citocinas IL-1 β (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-6 (D), IL-8 (E), IL-10 (F), IL-12p70 (G), IL-17A (H), IP-10 (I), TNF- α (J), GM-CSF (K), IFN- α 2 (L), IFN- β (M), IFN- γ (N), IFN- λ 1 (O) e IFN- λ 2-3 (P) em pacientes diagnosticados com COVID-19 que utilizaram ventilação mecânica (VM+) em comparação com o grupo que não fez uso desta terapêutica (VM-). Grupo VM+: N 28; Grupo VM- : N 28; Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. * $p = 0,034$. Fonte: autora

5.2.7 Alterações nos níveis séricos das citocinas dos pacientes diagnosticados COVID-19, de acordo com o desfecho clínico.

Em seguida avaliamos o padrão apresentado pelas citocinas a depender do desfecho clínico do paciente e como estas poderiam estar relacionadas com o prognóstico dos pacientes diagnosticados com COVID-19. Para tal avaliação os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com o desfecho clínico, o primeiro grupo estavam os pacientes que receberam alta hospitalar e no outro grupo os pacientes que vieram a óbito em decorrência da COVID-19. Vale inicialmente ressaltar que em números absolutos observamos dentre os indivíduos diagnosticados com COVID-19 o total de 27 óbitos. Das citocinas analisadas foi evidenciado alteração estatisticamente significativa em duas citocinas, IL-10 (32,48; 59,81- 20,60; $p=0,0462$) encontra-se aumentada nos pacientes que vieram a óbito (Figura 18 F) quando comparado com os pacientes que receberam alta. Assim como, foi detectado aumento expressivo nos níveis séricos de IL-12p70 (59,50; 97,31- 23,19; $p=0,0236$) nos pacientes do grupo óbito, quando comparado com o grupo alta (Figura 18 G). Nenhuma outra citocina avaliada apresentou alteração quando comparado o desfecho clínico dos pacientes.

Figura 18 - Avaliação dos níveis séricos de citocinas em relação ao desfecho clínico dos pacientes com COVID-19.



Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das citocinas IL-1 β (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-6 (D), IL-8 (E), IL-10 (F), IL-12p70 (G), IL-17A (H), IP-10 (I), TNF- α (J), GM-CSF (K), IFN- α 2 (L), IFN- β (M), IFN- γ (N), IFN- λ 1 (O) e IFN- λ 2-3 (P) em pacientes diagnosticados com COVID-19 comparando o desfecho clínico destes pacientes. Grupo Alta: N 29; Grupo Óbito: N 27. Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$. Fonte: autora

5.2.8 Correlação entre os dados laboratoriais dos pacientes diagnosticados com COVID-19 e os níveis séricos das citocinas avaliadas.

Optamos por avaliar os parâmetros laboratoriais, como contagem de plaquetas, leucócitos, neutrófilos, linfócitos, hemoglobina, proteína C reativa (PCR) e ferritina, e como estes estariam se correlacionando com as citocinas avaliadas no estudo, para isso utilizamos o teste de correlação de Spearman. Podemos observar que ao analisarmos o número de plaquetas com a quantificação das citocinas, apenas IL-17A apresentou uma correlação estatística, a qual apresenta correlação positiva com as plaquetas, ou seja, quanto maior o número dessa célula maior a concentração de IL-17A (Tabela 2). Quando avaliamos a correlação com os neutrófilos encontramos correlação negativa com IFN- β , ou seja, quanto maior o número de neutrófilos, menor o nível dessa citocina (Tabela 2). Também foi encontrado correlação estatística quando avaliamos a dosagem de PCR, a qual apresentou correlação negativa com IL-10 e IFN- α 2 (Tabela 2). Assim como foi encontrado correlação negativa entre o quantitativo de ferritina e os níveis séricos de INF- γ (Tabela 2). Em seguida foi aplicado o mesmo teste para a contagem de leucócitos, e não foi encontrado nenhuma correlação significativa, assim como com a contagem de linfócitos e hemoglobina (Tabela 2).

Tabela 2- Correlação dos níveis de citocinas com parâmetros laboratoriais em pacientes diagnosticados com COVID-19.

	Plaquetas		Leucócitos		Neutrófilos		Linfócitos		Hemoglobina		Proteína C reativa		Ferritina	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
IL-1β	0,25	0,06	0,06	0,65	0,07	0,61	0,01	0,97	0,15	0,26	-0,03	0,82	0,05	0,75
IL-2	0,12	0,38	-0,12	0,36	-0,15	0,27	-0,16	0,23	0,13	0,34	-0,23	0,09	-0,05	0,70
IL-4	-0,08	0,56	-0,21	0,11	-0,19	0,16	-0,15	0,25	-0,18	0,19	0,04	0,75	-0,05	0,71
IL-6	0,20	0,15	-0,10	0,47	-0,08	0,57	-0,14	0,30	0,08	0,54	-0,10	0,48	-0,05	0,74
IL-8	0,20	0,15	-0,04	0,77	-0,02	0,89	-0,12	0,36	0,01	0,93	-0,02	0,86	0,08	0,58
IL-10	-0,04	0,77	0,01	0,92	0,00	0,97	-0,09	0,54	-0,24	0,08	-0,30	0,03	-0,10	0,49
IL-12p70	0,02	0,90	-0,11	0,44	-0,05	0,74	-0,11	0,42	-0,14	0,30	-0,09	0,53	0,00	0,97
IL-17A	0,29	0,03	-0,04	0,75	-0,03	0,85	0,00	0,99	0,15	0,29	-0,06	0,68	0,07	0,64
IP-10	0,09	0,52	-0,06	0,67	-0,14	0,29	0,06	0,67	0,14	0,30	0,04	0,79	0,16	0,25
TNF-a	0,23	0,09	0,16	0,23	0,12	0,36	0,00	0,98	0,21	0,11	-0,21	0,12	-0,10	0,46
GM-CSF	0,07	0,58	-0,23	0,09	-0,24	0,08	-0,04	0,74	-0,18	0,19	-0,22	0,10	-0,18	0,19
IFN-a2	0,08	0,58	-0,12	0,39	-0,16	0,25	0,04	0,77	-0,09	0,53	-0,27	0,05	-0,15	0,30
IFN-b	-0,06	0,66	-0,22	0,11	-0,28	0,04	-0,06	0,64	-0,03	0,85	-0,10	0,49	-0,09	0,50
IFN-g	-0,04	0,79	-0,17	0,20	-0,23	0,08	0,15	0,27	-0,08	0,53	-0,17	0,20	-0,27	0,05
IFN-11	0,25	0,07	0,01	0,95	0,02	0,88	0,09	0,53	-0,09	0,52	-0,16	0,24	-0,15	0,29
IFN-12-3	0,01	0,96	-0,16	0,25	-0,14	0,30	-0,03	0,82	-0,18	0,19	-0,20	0,14	-0,11	0,43

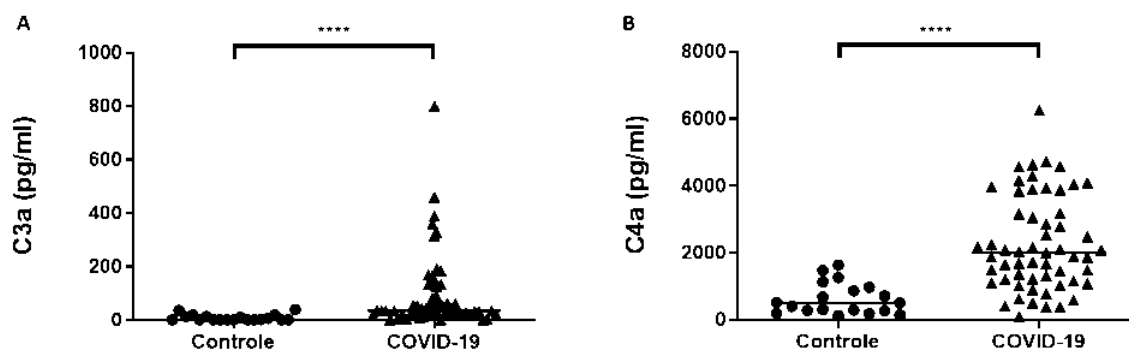
Legenda: Correlação avaliada por meio do teste de correlação de Spearman. $P \leq 0,05$. Fonte: autora

5.3 Avaliação dos níveis séricos das anafilotoxinas por citometria de fluxo

5.3.1 Alteração de C3a e C4a dos pacientes diagnosticados com COVID-19.

Além da avaliação dos níveis de citocinas, também realizamos a quantificação e avaliação das anafilotoxinas C3a e C4a nos pacientes diagnosticados com COVID-19 e comparamos com os voluntários que não possuíam a infecção. Sendo possível identificar aumento importante nos níveis de C3a (34,77; 107,5- 23,26; $p < 0,0001$) e C4a (1997, 3506-1178; $p < 0,0001$) quando comparado ao grupo controle (Figura 19).

Figura 19 – Quantificação dos níveis séricos de anafilotoxinas em pacientes portadores do SARS-CoV-2

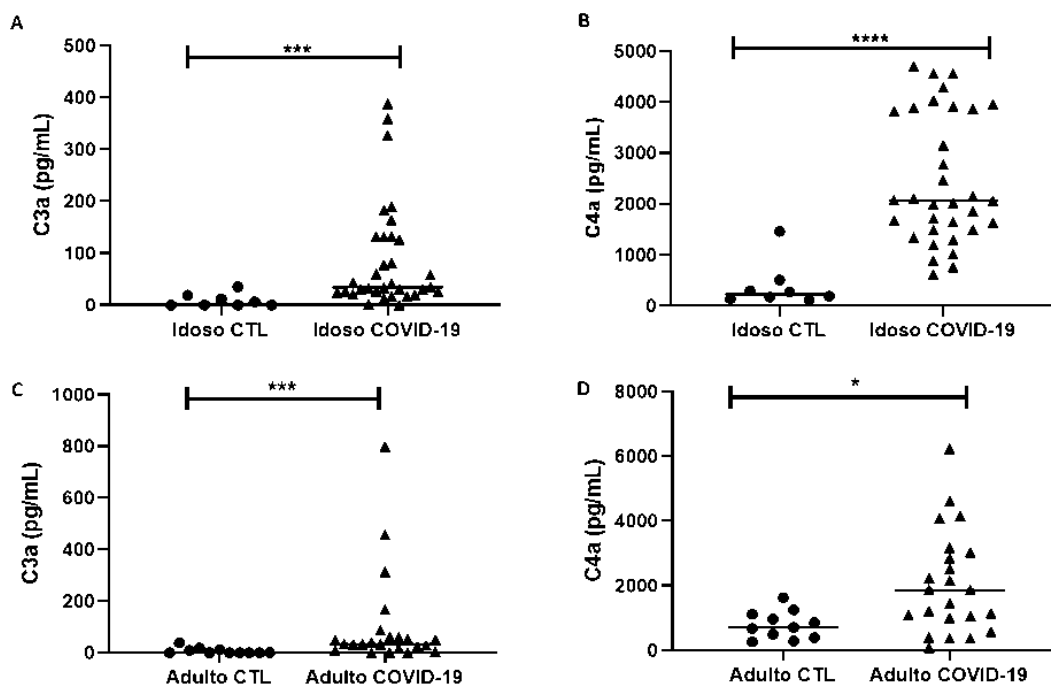


Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das anafilotoxinas C3a (A) e C4a (B) em pacientes diagnosticados com COVID-19 quando comparado com voluntários controle. Grupo controle: N 19; Grupo COVID-19: N 25; Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. **** $p < 0,0001$. Fonte: autora

5.3.2 C3a e C4a encontram-se alterados nos pacientes adultos e idosos com a infecção por SARS-CoV-2

Em seguida realizamos a avaliação dos níveis de C3a e C4a nos pacientes diagnosticados com COVID-19, a partir do agrupamento por idade. Novamente dividimos os pacientes em dois grupos, grupo idoso onde foram alocados os pacientes que possuíam idade igual ou superior a 60 anos, e o grupo adulto, pacientes de 18 a 59 anos de idade. Inicialmente foi efetuado a avaliação entre idosos controles em comparação com pacientes com a COVID-19 e pertencentes a mesma faixa etária, onde foi possível perceber a elevação nos níveis de C3a (34,77; 132,4- 25,79; $p = 0,0002$) e C4a (2073; 3885-1495; $p < 0,0001$) nos pacientes com a COVID-19 (Figura 20 A e B). O próximo passo foi a análise dos pacientes adultos com e sem a COVID-19, e novamente obtivemos níveis significativamente mais elevados de C3a (34,85; 62,69-17,86; $p = 0,0004$) e C4a (1870; 3041-1008; $p = 0,0107$) nos pacientes adultos com a COVID-19 (Figura 20 C e D).

Figura 20 – Avaliação dos níveis séricos das anafilotoxinas em pacientes dos diagnosticados com COVID-19, de acordo com a idade.

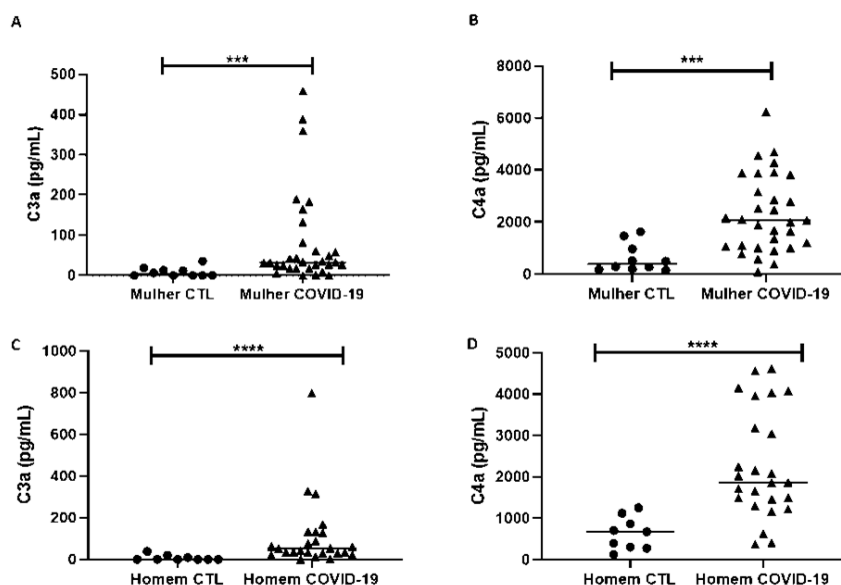


Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das anafilotoxinas C3a (A) e C4a (B) em pacientes diagnosticados com COVID-19 de acordo com a idade (Idosos COVID e Adultos COVID), comparados com seus respectivos controles (Idosos CTL e Adultos CTL). Grupo Idoso CTL: N 8; Grupo Idoso COVID-19: N 33; Grupo Adulto CTL: N 12; Grupo Adulto COVID-19: N 23 Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. * $p=0,0107$; *** $p<0,0005$; **** $p<0,0001$. Fonte: autora

5.3.3 Alteração das anafilotoxinas nos pacientes do sexo feminino e masculino diagnosticados com COVID-19.

Seguindo a avaliação das características demográficas dos pacientes e como estas estariam afetando o padrão das anafilotoxinas, decidimos avaliar o impacto do sexo sobre a produção de C3a e C4a. Encontramos aumento significativo de C3a (32,59; 82,41- 17,86; $p=0,0004$) e C4a (2073; 3832-1079; $p=0,0001$) nos pacientes do sexo feminino com COVID-19 quando comparado ao grupo controle (Figura 21 A e B). O mesmo padrão foi encontrado ao avaliarmos o sexo masculino, os pacientes com COVID-19 apresentaram aumento expressivo nos níveis de C3a (52,11; 129,4- 29,77; $p<0,0001$) e C4a (1870; 3571- 1383; $p<0,0001$) (Figura 21 C e D).

Figura 21 – Avaliação dos níveis séricos das anafilotoxinas em pacientes dos sexos feminino e masculino diagnosticados com COVID-19.

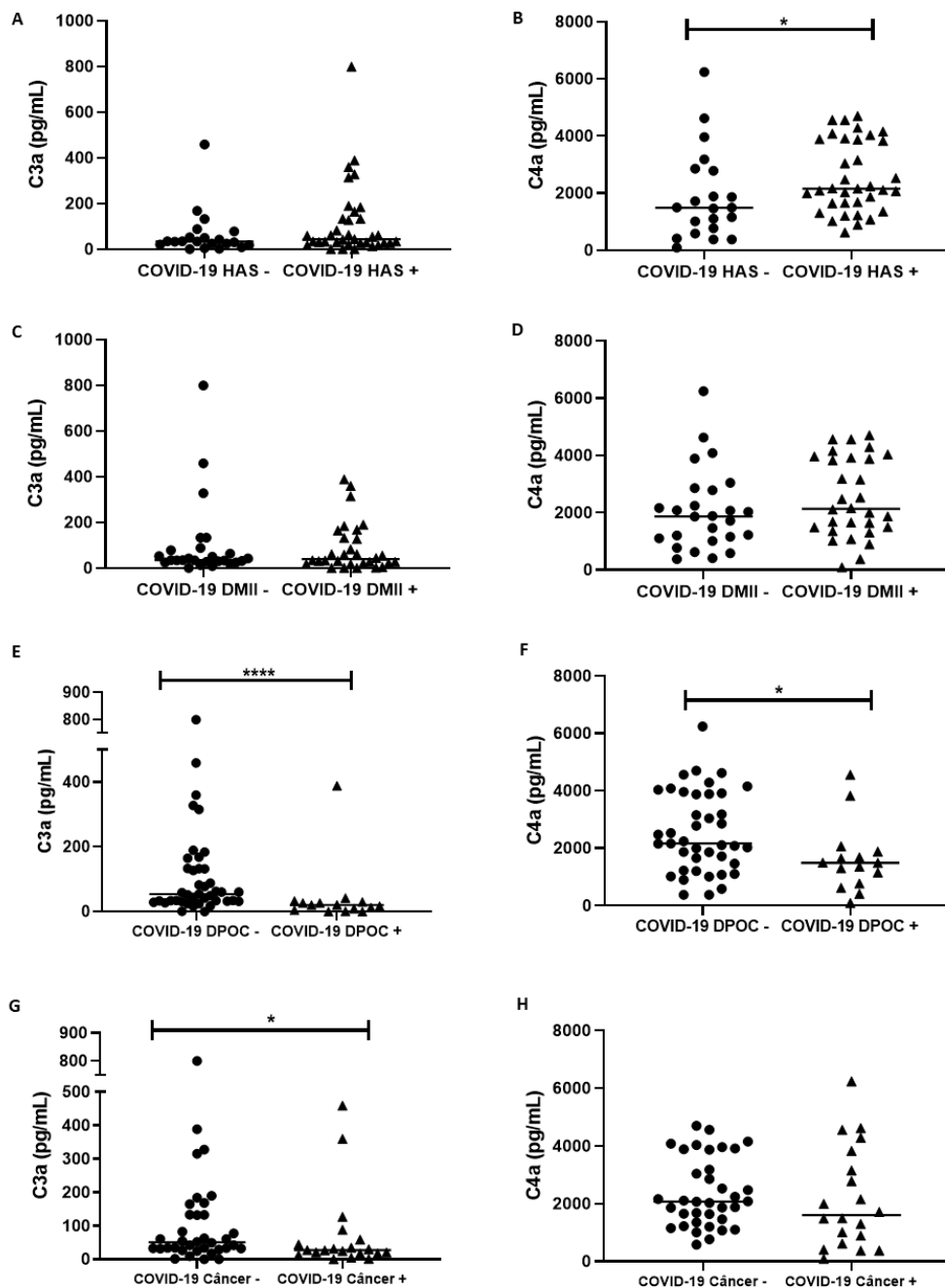


Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das anafilotoxinas C3a (A) e C4a (B) em pacientes diagnosticados com COVID-19 do sexo feminino e masculino comparados com seus respectivos controles (CTL). Grupo mulher CTL: N 10; Grupo mulher COVID: N 31; Grupo Homem CTL: N 9; Grupo Homem COVID: N 25. Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$. Fonte: autora

5.3.4 Alteração dos níveis séricos das anafilotoxinas analisadas quando avaliado o impacto da presença de comorbidades nos pacientes com COVID-19.

Separámos os pacientes diagnosticados com a COVID-19 em grupos distintos de acordo com a presença das seguintes comorbidades: HAS, DMII, DPOC e câncer. Iniciamos a avaliação pelo impacto da HAS na quantificação das anafilotoxinas e podemos observar que C4a (2155; 3893-1643; $p = 0,0233$) possui aumento significativo em seus níveis nos pacientes com a HAS (HAS+) quando comparado com o grupo sem a comorbidade (HAS-) (Figura 22 B). Em seguida, avaliamos a presença de DMII nos pacientes COVID-19, no entanto, nenhuma alteração foi detectada nas anafilotoxinas avaliadas (Figura 22 C e D). O passo seguinte foi a análise dos grupos com DPOC, nos quais tanto C3a quanto C4a encontravam-se alteradas, podemos observar que há redução em na quantificação C3a (20,29; 30,26-4,980; $p < 0,0001$) e C4a (1492; 1883-769,2; $p = 0,0169$) nos pacientes COVID-19 com DPOC (DPOC+) quando comparados com o grupo COVID-19 sem a comorbidade (DPOC-) (Figura 22 E e F). Por último investigamos o impacto que o câncer apresentaria sobre o padrão de anafilotoxinas nos pacientes positivos para SARS-CoV-2, e podemos detectar que apenas C3a (27,20; 54,94-17,55; $p = 0,0350$) teve redução significativa, quando comparado com o grupo COVID-19 sem câncer (Câncer -) (Figura 22 G e H).

Figura 22 – Análise dos níveis séricos das anafilotoxinas em pacientes diagnosticados com COVID-19, correlacionada com a presença de comorbidades.

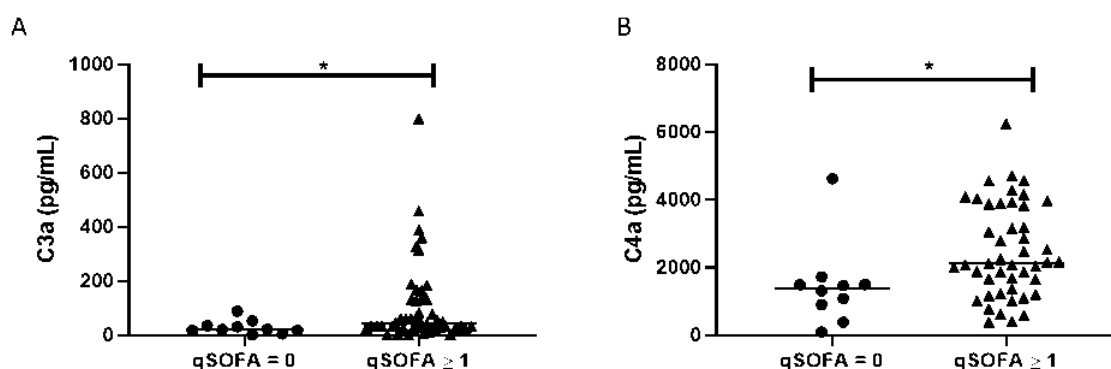


Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das anafilotoxinas C3a (A) e C4a (B) em pacientes diagnosticados com COVID-19 com comorbidades como HAS, DM, DPOC e Câncer, comparado com pacientes sem as comorbidades citadas. Grupo HAS+: N 35; Grupo HAS-: N 21; Grupo DMII+: N 30; Grupo DMII-: N 26; Grupo DPOC+: N 15; Grupo DPOC-: N 4; Grupo Câncer -: N 36; Grupo Câncer +: N 20. Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$. Fonte: autora

5.3.5 Avaliação da alteração nos níveis séricos das anafilotoxinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 de acordo com o escore qSOFA.

Assim como para as citocinas, avaliamos o perfil das anafilotoxinas a partir do estadiamento do critério clínico qSOFA. Dividimos novamente os pacientes com COVID-19 em dois grupos, aqueles que apresentaram qSOFA=0 e os que obtiveram pontuação igual ou maior que 1. Diante desta análise, obtivemos elevação dos níveis séricos de C3a (43,03; 132,9-27,31; $p=0,0209$) (Figura 23 A) e C4a (2133; 3881-1324; $p=0,0162$) (Figura 23 B) nos pacientes que possuíam qSOFA alterado quando comparados ao grupo qSOFA=0.

Figura 23 – Análise dos níveis de anafilotoxinas em pacientes com COVID-19 de acordo com o escore qSOFA.

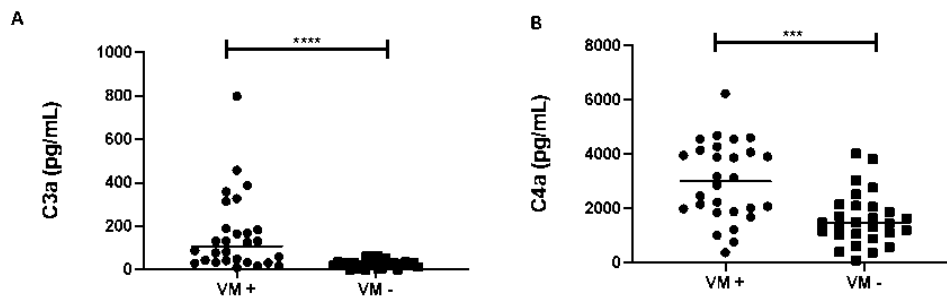


Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das anafilotoxinas C3a (A) e C4a (B) em pacientes diagnosticados com COVID-19 de acordo com a pontuação obtida no escore SOFA, Grupo qSOFA 0: N 10; Grupo qSOFA ≥1: 46; Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. $*p<0,05$. Fonte: autora

5.3.6 Utilização de ventilação mecânica altera o perfil de expressão de C3a e C4a em pacientes com COVID-19.

Em pacientes que desenvolvem a COVID-19 com maior grau de severidade, comumente é utilizado a VM como forma de terapêutica com objetivo de melhorar os parâmetros respiratórios. Diante disso, estabelecemos a necessidade da avaliação dos níveis séricos das anafilotoxinas nos pacientes que fizeram uso dessa terapia. Com isso, podemos perceber uma alta nos níveis de C3a (107,5; 188,2-35,89; $p<0,0001$) e C4a (3006; 4136-1912; $p=0,0001$) em pacientes que utilizaram a VM (VM+) quando comparado ao grupo controle (VM-) (Figura 24 A e B).

Figura 24 – Avaliação das anafilotoxinas em pacientes diagnosticados com COVID-19 submetidos ou não à ventilação mecânica (VM).

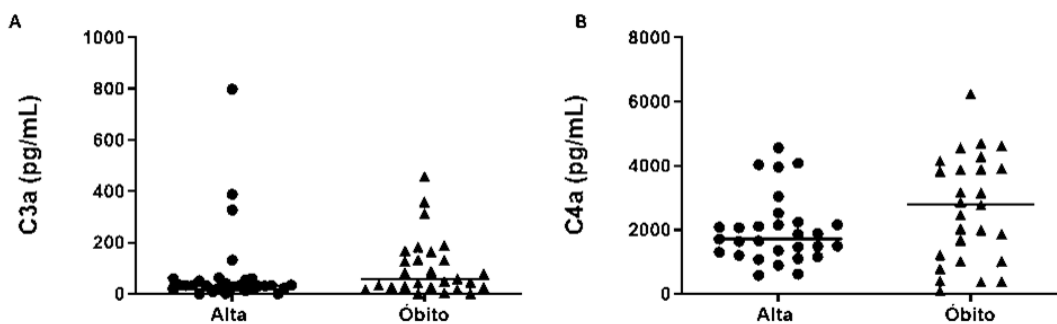


Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das anafilotoxinas C3a (A) e C4a (B) em pacientes diagnosticados com COVID-19 que utilizaram ventilação mecânica (VM+) em comparação com o grupo que não fez uso desta terapêutica (VM-). Grupo VM+: N 28; Grupo VM-: N 28; Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. *** $p=0,0001$; **** $p<0,0001$. Fonte: autora

5.3.7 Avaliação das anafilotoxinas nos pacientes com COVID-19 de acordo com o desfecho clínico.

Como forma de avaliar o impacto das anafilotoxinas sobre o prognóstico dos pacientes com COVID-19, optamos por ver a relação estatística com o desfecho clínico dos pacientes. Dividimos estes em dois grupos, os pacientes que obtiveram alta hospitalar e os pacientes que foram a óbito durante o período da pesquisa. Ao realizarmos as análises estatísticas não encontramos alterações significativas nas anafilotoxinas correlacionadas com o desfecho (Figura 25).

Figura 25 – Avaliação dos níveis séricos de anafilotoxinas em pacientes diagnosticados com COVID-19, agrupados de acordo com o desfecho clínico.



Legenda: Quantificação por citometria de fluxo das anafilotoxinas C3a (A) e C4a (B) em pacientes diagnosticados com COVID-19 comparados pelo desfecho clínico entre alta e óbito. Grupo alta: N 29; Grupo óbito: N 27; Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. Fonte: autora

5.3.8 Correlação dos parâmetros laboratoriais e os níveis séricos de C3a e C4a em pacientes diagnosticados com COVID-19.

Assim como para as citocinas, decidimos verificar a correlação entre os parâmetros laboratoriais dos pacientes infectados com o vírus SARS-CoV-2, como contagem de plaquetas, neutrófilos, leucócitos, linfócitos, hemoglobina e ferritina, com a quantificação das anafilotoxinas. De todos os parâmetros avaliados apenas a ferritina apresentou correlação positiva com C3a e C4a, em outras palavras, quanto maior a contagem de ferritina nos pacientes com COVID-19 maiores os níveis séricos de C3a e C4a. (Tabela 3).

Tabela 3 - Correlação dos níveis de anafilotoxinas com parâmetros laboratoriais em pacientes diagnosticados com COVID-19

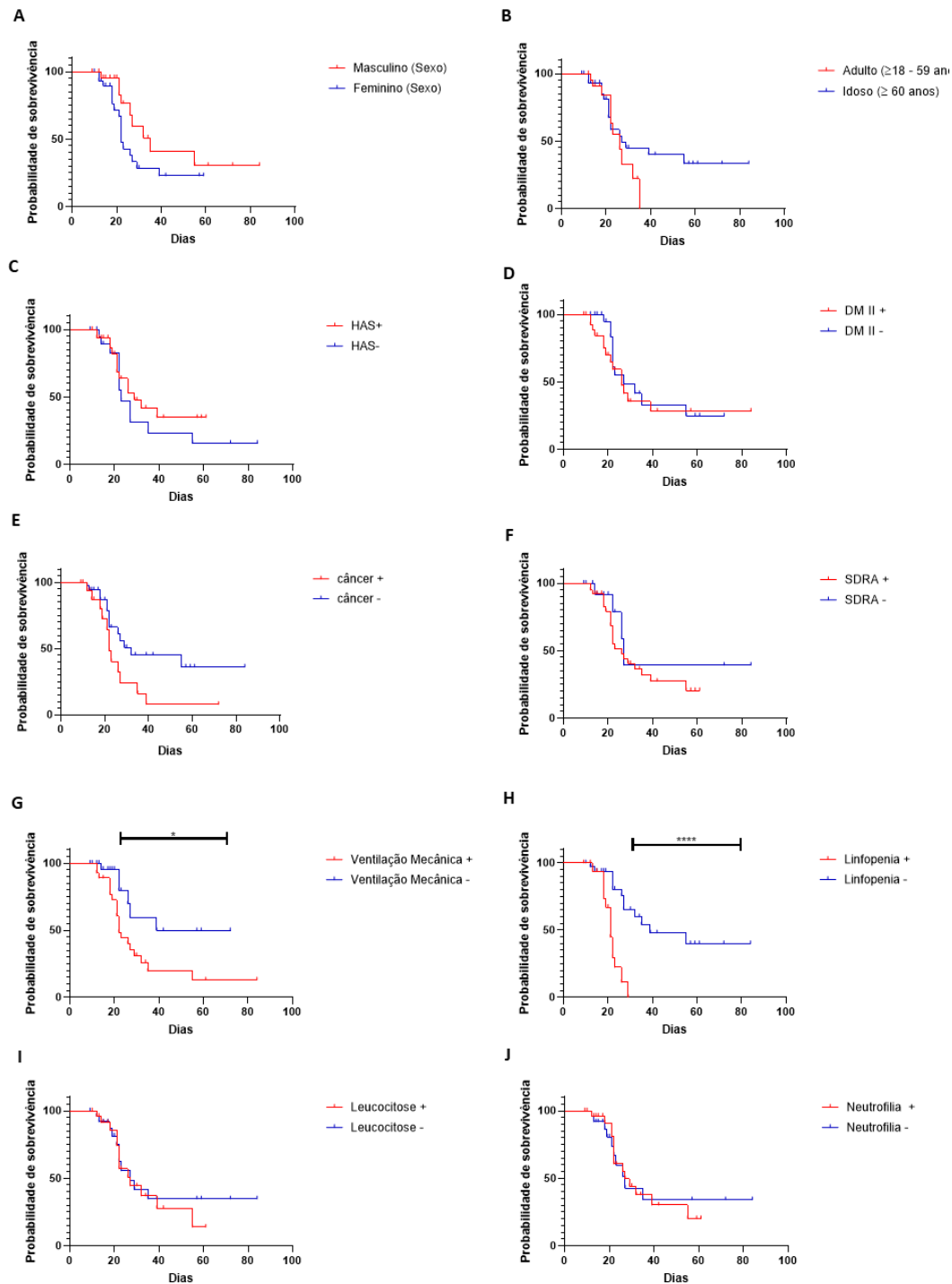
	C3a		C4a	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Plaquetas	0,004512	0,9737	-0,06757	0,6207
Neutrófilos	0,06275	0,6459	0,008613	0,9498
Leucócitos	0,07042	0,606	-0,01846	0,8926
Linfócitos	-0,1119	0,4114	-0,1949	0,15
Hemoglobina	0,1461	0,2825	0,1482	0,2757
Proteína C reativa	0,004341	0,9747	0,07797	0,5679
Ferritina	0,4012	** 0,0032	0,3101	* 0,0253

Legenda: Correlação avaliada por meio do teste de correlação de Spearman. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$. Fonte: autora

5.4 Avaliação da probabilidade de sobrevivência de pacientes com COVID-19

Para avaliação da probabilidade de sobrevivência foi realizado o teste estatístico da curva de sobrevivência. Selecionamos dez parâmetros para mensurar seu impacto sobre a sobrevivência dos pacientes, os quais são sexo, idade, HAS, DMII, câncer, SDRA, VM, linfopenia, leucocitose e neutrofilia. Observamos que os pacientes que fizeram uso de VM (HR=2,805; $p=0,0193$) durante o período de hospitalização possuem menor probabilidade de sobrevivência, quando comparado com o grupo que não utilizou tal terapêutica (Figura 26 G). Dentre as alterações dos componentes sanguíneos, a linfopenia (HR=4,240; $p=0,0004$) apresentou redução significativa na probabilidade de sobrevivência dos pacientes, quando comparado com aqueles que não possuíam a linfopenia (Figura 26 H).

Figura 26 – Avaliação da curva de sobrevivência dos pacientes diagnosticados com COVID-19.



Legenda: Avaliação da chance de sobrevida dos pacientes diagnosticados com SARS-Cov-2, considerando o tempo de início dos sintomas até o desfecho clínico (óbito ou alta). Avaliação do impacto de características como sexo: Masculino e feminino (Sexo) (A) e idade: Adulto ($\geq 18 - 59$ anos) e idoso (≥ 60) (B); impacto de comorbidades como Hipertensão arterial sistêmica – HAS (C), Diabetes mellitus II - DMII (D), Câncer: (E), Síndrome do desconforto respiratório agudo SDRA (F). Análise do impacto do uso de ventilação mecânica (VM) como terapêutica (G). E alterações em componentes sanguíneos como linfopenia (H), leucocitose (I) e neutrofilia (J) foram avaliados. Análise estatística realizada pelo teste de hipótese Gehan-Breslow Wilcoxon, e risco relativo calculado a partir do teste Logrank (Mantel-Cox). * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$. Fonte: autora

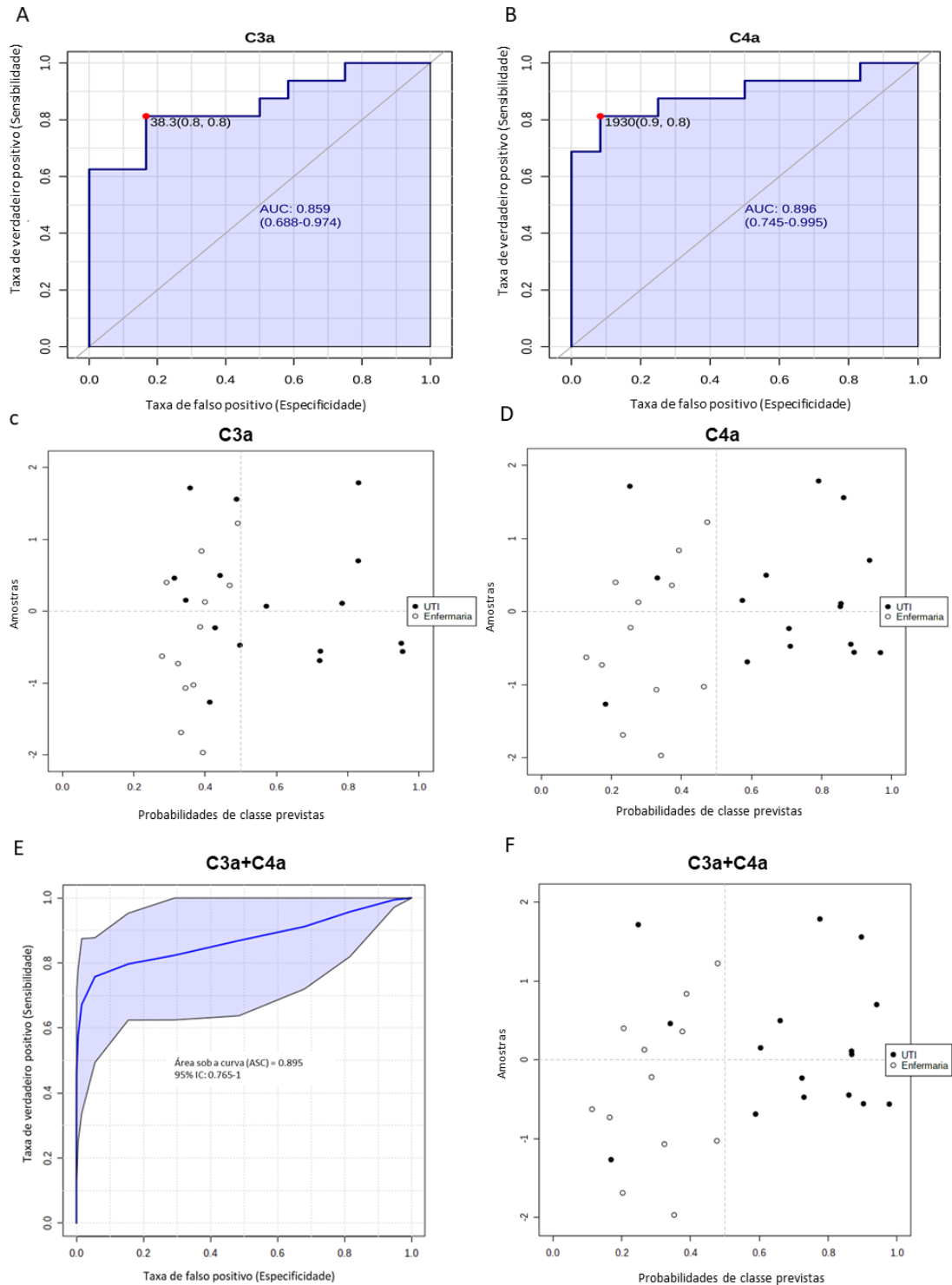
5.5 Avaliação do potencial da quantificação de anafilotoxinas como teste preditor do diagnóstico e da severidade para a COVID-19

Para a avaliação do poder do teste de quantificação das anafilotoxinas C3a e C4a, devemos possuir a capacidade para distinguirmos o teste “positivo” de um teste “negativo” para isso utilizamos a curva de característica de operação do receptor (ROC), que irá permitir criarmos os limites de corte para os testes.

É imprescindível entendermos o princípio deste teste, desta forma quando há a criação da curva ROC temos descritos no gráfico a sensibilidade do teste, que se refere a taxa de testes verdadeiro positivos, localizada no eixo y e obtemos a especificidade do teste, que irá representar a taxa de falsos positivos, localizada no eixo x do gráfico. Quando há a formação da curva, o teste nos fornece o valor da área sobre a curva ROC (AUC), que será uma medida da capacidade do teste permitir predizer se a condição avaliada está presente ou não. Desta forma quando a AUC é menor que 0,5 dizemos que o teste não apresenta capacidade de predição e quando AUC é igual ou próxima a 1,0 isso significa que o teste possui um alto poder de predição.

A partir disso, iniciamos nossas análises para avaliação do potencial da quantificação de C3a e C4a em predizer o grau de severidade dos pacientes já diagnosticados com a infecção por SARS-CoV-2. Para isso separamos os participantes de acordo com o gravidade da doença no momento da internação, dividimos em dois grupos o primeiro contendo os pacientes que deram entrada na enfermaria e o segundo grupo estavam alocados os pacientes hospitalizados diretamente na UTI. A partir a aplicação da curva ROC, podemos observar que o teste de C3a isolada obteve uma AUC= 0.859, com sensibilidade de 50% e uma especificidade de 100% (Figura 27 A), permite distinguir todos os pacientes do grupo enfermaria, sendo 100% específica quando buscamos compreender quais os pacientes desenvolveriam uma COVID-19 moderada, conforme demonstrado na matriz de confusão (Figura 27 C). Quando avaliamos a molécula de C4a de forma isolada obtivemos uma AUC de 0.896, com sensibilidade de 69% e especificidade de 92% (Figura 27 B). E por fim, analisamos a quantificação de C3a + C4a para a predição do prognóstico dos pacientes com COVID-19, no qual encontramos uma AUC igual a 0.895, com sensibilidade de 81% e especificidade de 100% para avaliação do prognóstico destes pacientes (Figura 27 E). Diante disso, encontramos um alto potencial do teste utilizando a quantificação de C3a+C4a para predizer o grau de severidade da COVID-19 e quais os pacientes necessitariam ou não de cuidados mais intensivos.

Figura 27 – Avaliação do poder preditivo de C3a e C4a no prognóstico dos pacientes diagnosticados com COVID-19.



Legenda: Avaliação do poder preditivo de prognóstico para pacientes portadores da COVID-19 por meio da análise dos níveis séricos das anafilotoxinas C3a (A e C) , C4a (B e D) e C3a em associação com C4a (E e F) . Teste preditivo por meio da análise de curva ROC (A, B e E). Matriz de confusão dos testes representada em C, D e F. AUC: area under the curve ou área sob a curva. IC: intervalo de confiança= 95%. Fonte: autora

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, objetivamos identificar possíveis biomarcadores ao analisarmos a resposta imunológica dos pacientes contra a infecção por SARS-CoV-2, por meio de avaliação do perfil de citocinas e anafilotoxinas no plasma de pacientes diagnosticados com a COVID-19. Durante a progressão da COVID-19, há o consenso que está ocorrendo uma resposta imune inadequada, onde se tem elevação nos níveis de citocinas, quimiocinas e responsáveis por causar graves danos pulmonares e em outros órgãos alvos (MORTAZ, et.al.2020).

Nesse contexto, iniciamos nosso estudo a partir da observação do perfil de citocinas nos pacientes diagnosticados com COVID-19. Onde observamos que esses pacientes apresentam redução significativa nos níveis de GM-CSF quando comparado ao grupo de voluntários controle. Ao avaliarmos a literatura, foi visto que níveis reduzidos de GM-CSF foram identificados em pacientes com COVID-19 quando comparados ao grupo controle saudável (PATTERSON, et.al. 2021). Sabe-se que essa citocina exerce papel importante no processo de homeostase dos macrófagos alveolares e na inflamação pulmonar na infecção por SARS-CoV-2 e a sua deficiência, em condições homeostáticas, está relacionada com falha na remoção do surfactante pulmonar, resultando em proteinose alveolar pulmonar (MU, et.al. 2021). No entanto, em contradição com nossos resultados, outros estudos enfatizaram aumento de GM-CSF nos pacientes com COVID-19 quando comparado a grupos controles (HUANG, et.al. 2020; TAGHILOO, et.al. 2021). É evidenciado na literatura que a elevação nos níveis broncoalveolares de GM-CSF pode estar associada indiretamente com o desenvolvimento da SDRA, devido a supressão da apoptose de neutrófilos, que contribui para o dano pulmonar (MU, et. al. 2020), no entanto quando realizamos a correlação entre os níveis plasmáticos de GM-CSF e a contagem de neutrófilos não obtivemos relevância estatística, assim como ao realizarmos o teste da curva de sobrevivência para a avaliação da presença de neutrofilia, essa não correlacionou-se com um pior prognóstico dos pacientes com COVID-19. No entanto, precisamos ressaltar que os níveis basais dos nossos controles são mais altos do que os encontrados em controles saudáveis (CHATZIGEORGIOU, et.al. 2010; PATTERSON, et.al. 2021; TAGHILOO, et.al. 2021), visto que possuem comorbidades como hipertensão arterial sistêmica ou DMII, doenças as quais são conhecidas por apresentar níveis mais elevados de GM-CSF (PARISSIS, et al. 2002; CHATZIGEORGIOU, et.al. 2010; ALNEK, et.al. 2015).

Observamos redução significativa nos níveis plasmáticos da citocina IL-12p70. Corroborando com nossos resultados, um estudo que avaliou os níveis séricos de diferentes

citocinas identificou redução de IL-12 nos pacientes com COVID-19 quando comparados ao grupo controle (OSMAN, et.al. 2020). No entanto, Tjan e colaboradores (2021) mostraram IL-12p70 aumentada nos pacientes que apresentam a COVID-19 de forma assintomática ou leve, quando comparado com controles sem a doença. Já Huang e colaboradores (2020) não encontraram diferenças. Em nosso caso, alguns poucos pacientes controles apresentaram níveis muito elevados dessa citocina, o que pode ser explicado por características de suas comorbidades prévias, e esses pacientes elevaram a mediana em relação ao grupo COVID-19. Também não podemos deixar de observar a grande variação nos resultados dessa citocina, sendo que nesses três estudos diferentes, o padrão foi amplamente distinto e mais estudos precisam ser realizados para um maior entendimento do papel dessa citocina na COVID-19. Até porque informações sobre a atuação de IL-12p70 na progressão da COVID-19 são escassas na literatura, até o presente momento (Moll-Bernardes, et.al. 2021).

Características como idade avançada e a presença de comorbidades são associados com admissão em UTI e chances aumentada de ter óbito como desfecho clínico em decorrência do agravamento da COVID-19, sendo atribuídos como potenciais fatores de risco para essa doença (ZHOU, et. al. 2020). Foi constatado, por meio de um modelo logístico de regressão que a presença de hipertensão está correlacionada com casos mais severos de COVID-19, (LI, Xu, YU et.al. 2020), e nossas análises evidenciaram que a IL-12p70 também está reduzida nos pacientes com COVID-19 que possuíam HAS como comorbidade, assim como foi encontrado aumento de IL-6 nesses pacientes. Estudos mostraram que há aumento nos níveis de IL-6 em pacientes que desenvolveram a COVID-19 com maior gravidade (LI, Xu, YU et.al. 2020) e que pacientes hipertensos com COVID-19, que utilizaram anti-hipertensivos apresentaram redução nos níveis de IL-6 no sangue periférico, assim como menores taxas de agravamento da COVID-19 (MENG, et.al. 2020). Em adição, nossos estudos mostram que os níveis de IL-6 também estão elevados em pacientes com aumento no escore qSOFA, o qual é utilizado para avaliar os níveis de dano aos órgãos durante uma infecção. E já é conhecido que o aumento no escore qSOFA é um fator de risco para um pior prognóstico da COVID-19 (ZHOU, et. al. 2020), evidenciando a forte correlação da citocina IL-6 com casos mais graves da COVID-19 em pacientes hipertensos e também associação com maior dano em diferentes órgãos durante a progressão da COVID-19. No contexto da IL-12p70, quando avaliamos na literatura o perfil dessa citocina em pacientes hipertensos com COVID-19, Moll-Bernardes e colaboradores (2021) encontram por meio da análise do plasma sanguíneo desses pacientes, que aqueles com maior gravidade da doença possuíam níveis aumentados de diversas citocinas, dentre elas IL-

IL-12p70 e IL-10, quando comparados com os pacientes sem a doença na forma grave. Vale ressaltar que em nossas análises não separamos nossos pacientes de acordo com a gravidade da COVID-19, apenas agrupamos pela existência ou não de HAS como uma comorbidade pré-existente. E que ao investigarmos os níveis de citocinas relacionados ao desfecho clínico, observamos aumento expressivo nos níveis de IL-12p70 e IL-10 nos pacientes diagnosticados com COVID-19 que foram a óbito em decorrência da doença. Ainda sobre a IL-10, resultado similar foi encontrado em estudo realizado por Munitz e colaboradores (2021), onde puderam observar elevação acentuada de IL-10 em pacientes com a COVID-19 moderada/grave. Em outro estudo comparativo entre pacientes com COVID-19 que sobreviveram a doença e os que vieram há óbito, houve aumento significativo nos níveis de IL-10 nos pacientes que vieram a óbito (LI, Xu, et.al. 2020). Mostrando que há associação dessas citocinas com pior prognóstico dos pacientes com COVID-19.

Além da HAS, foi identificado que a hiperglicemia correlaciona-se com o óbito nos pacientes graves de COVID-19 a partir da análise de sobrevivência desses pacientes, onde a hiperglicemia pode estar associada com DMII e a utilização de corticosteróides (LI, Xu, YU et.al. 2020). Em nossos resultados identificamos unicamente aumento de TNF- α nos pacientes COVID-19 e que possuíam DMII como comorbidade. Em consonância com o resultado encontrado, Zheng e colaboradores (2021) também identificaram aumento nos níveis séricos de TNF- α nos pacientes que possuíam DM e COVID-19, quando comparados aos pacientes que possuíam alteração apenas na glicemia de jejum, mas sem DM. E o aumento dessa citocina foi constatado em pacientes com COVID-19 mais severa (LI, Xu, YU et.al. 2020; ALOSAIMI, et.al. 2021), demonstrando que o TNF- α pode estar agravando a COVID-19 nos pacientes com DM diagnosticada.

Como destacado anteriormente, a idade avançada, assim como as comorbidades, são tidas como fatores de risco para um pior prognóstico da COVID-19 (GONG, et.al. 2020). Um estudo realizado *in vivo* utilizando camundongos jovens e idosos, analisou a produção de citocinas após inoculação do vírus SARS-CoV, identificando diferentes citocinas significativamente aumentadas em camundongos idosos, entre elas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-10 e IL-23 α , indicando que o vírus pode causar tempestade de citocinas mais graves nos idosos (YAO et al. 2020). Baseando-se nesse cenário, quantificamos os níveis de citocinas de acordo com a idade dos nossos pacientes diagnosticados com COVID-19. Podemos observar redução de IL-12p70 nos indivíduos adultos e aumento de IFN- λ 1 em idosos quando

comparados ao grupo controle. Já estudo realizado por Angioni e colaboradores (2020) ao analisar o perfil de citocinas apresentados por pacientes hospitalizados com COVID-19, identificou diferentes citocinas, como a CXCL-8, IL-10, IL-15, IL-27 e TNF- α positivamente correlacionado com idades mais avançadas, assim como maior tempo de hospitalização e agravamento da COVID-19. Novamente, o fato desses estudos terem utilizado controles saudáveis e, nossos controles com comorbidades apresentarem níveis basais maiores dessas citocinas por conta de suas comorbidades, evidencia novamente que precisamos separar o que é uma resposta específica do vírus ou da comorbidade prévia do paciente.

Dentre as características observadas no estudo temos a diferença entre o sexo dos pacientes. Em nosso estudo encontramos aumento nos níveis de GM-CSF, IFN- α 2 e IFN- λ 2-3 nas mulheres com COVID-19 quando comparamos com os pacientes do sexo masculino. Diante disso, percebemos que as mulheres possuem aumento na resposta antiviral, marcada pela acentuação nos níveis de IFNs. Similarmente, Arulkumaran e colaboradores (2021) encontraram níveis elevados de IFNs nos pacientes com COVID-19 quando comparados ao controle, mas sem correlação com o sexo feminino. No entanto, outros estudos reportaram o contrário, como resposta deficiente dos IFNs durante a infecção por SARS-CoV-2 (BLANCO-MELO, et.al. 2020) e de que os coronavírus possuem a capacidade de interferir na produção de IFNs, reduzindo sua quantidade geral (PARK, et.al. 2020). No comparativo entre os sexos, um estudo identificou que pacientes com a COVID-19 do sexo masculino apresentaram níveis mais elevados de IL-8 e IL-18, quando comparados com o sexo feminino (TAKAHASHI et al. 2021). Ainda, um estudo retrospectivo com pacientes hospitalizados por COVID-19 em Wuhan na China, mostrou que os pacientes do sexo masculino apresentaram reação inflamatória exacerbada, com aumento na quantificação de IL-10 e TNF- α quando comparados com mulheres, ajustadas de acordo com idade e comorbidades, sendo esse excesso relacionada com a severidade da infecção por SARS-CoV-2 nos homens (QIN, et.al. 2020). Esse mesmo trabalho observou que os homens apresentaram maior taxa de mortalidade do que as mulheres (QIN, et.al. 2020). No nosso estudo, ao realizarmos a curva de sobrevivência comparativa entre os sexos não encontramos diferença significativa associada com a redução de sobrevivência desses pacientes.

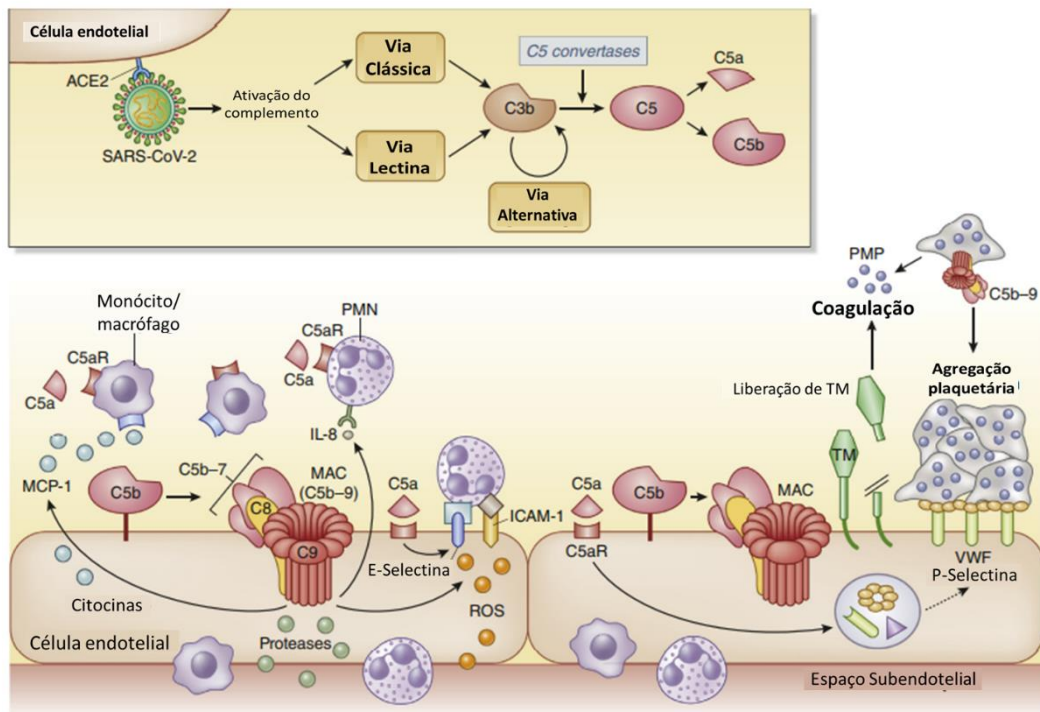
Nesse sentido as variantes genéticas do hospedeiro influenciam na gravidade durante infecções, na replicação de vírus e até mesmo na resposta imunológica e inflamação produzida (DEBNATH, et.al. 2020; OVSYANNIKOVA, et.al. 2020). Diante disso, um estudo de revisão

que evidenciou a frequência de variantes alélicas em genes de diferentes citocinas que são correlacionadas com desenvolvimento de “tempestade de citocinas” e trombose venosas em diferentes populações, entre elas IL-1R1, IL-6, IL17A, onde concluem que essas variantes genéticas podem afetar a suscetibilidade à COVID-19 e suas complicações (FRICKE-GALINDO; FALFÁN-VALENCIA, 2021). Mediante as informações acima citadas, ao avaliarmos a literatura, podemos observar que estudos que analisaram o perfil de citocinas nos pacientes com COVID-19, em países como China, Irlanda e Canadá, obtiveram respostas diferentes (HAN, et.al. 2020; MCELVANEY, et.al. 2020; OSMAN, et.al. 2020). Mostrando assim, que as diferenças encontradas em nosso estudo em comparação com dados prévios da literatura, durante a avaliação das características demográficas, podem ser justificadas pelas variações genética encontradas nas populações.

Outro fator associado com maior agravamento da COVID-19 é a necessidade de utilização de ventilação mecânica como modalidade terapêutica, visto que para doenças respiratórias críticas, a ventilação mecânica é um tratamento essencial e eficaz (LI, LIN, et.al. 2020). Em nossos pacientes, verificamos que a utilização de VM estava associada a níveis elevados de IL-8, assim como foi um fator importante na redução da sobrevida dos pacientes diagnosticados com COVID-19. Até o momento, poucos estudos mostram associação da VM com os níveis de citocinas, mas já foi observada correlação positiva entre o tempo de utilização da VM e os níveis de IL-10 e GM-CSF, mas nada foi encontrado entre os níveis dessas citocinas e o prognóstico da COVID-19 (BLOT, et. al. 2020), como encontramos em nosso estudo. Outro fator correlacionado com a redução da sobrevida dos pacientes foi a presença de linfopenia. Consonantemente, Moll-Bernardes e colaboradores (2021) mostraram presença de linfopenia em pacientes com COVID-19 na forma grave. Ao ser avaliada a carga de RNA viral no plasma de pacientes infectados, houve associação inversa entre a carga viral e a contagem de linfócitos, monócitos e saturação de O₂, mostrando que quanto maior a carga viral, maior o grau de linfopenia desses pacientes e maior necessidade de oxigenoterapia (BERMEJO-MARTIN, et al. 2020). Desta forma, entendemos que o aumento da carga viral possui correlação com a manifestação de linfopenia e baixa saturação nos pacientes com COVID-19 sendo associado com provável agravamento do quadro clínico, assim como destacamos no presente estudo, onde o uso de ventilação mecânica e a presença de linfopenia reduz a chance de sobrevivência desses pacientes.

Outra importante face do sistema imunológico durante infecções virais abrange a ativação do sistema complemento. Deste modo, o organismo passa por um processo de inflamação, e as anafilotoxinas produzidas são responsáveis por recrutar células fagocíticas para o local da infecção (ALOSAIMI, et.al. 2021). Nesse sentido, realizamos a avaliação comparativa dos níveis de anafilotoxinas entre pacientes diagnosticados com COVID-19 e controles saudáveis. É importante citar como uma limitação do nosso estudo que C5a não foi detectada nem na curva de padronização e em nenhuma amostra utilizada, indicando assim que essa anafilotoxina não se encontrava funcionando no Kit utilizado. No entanto, encontramos importantes resultados de C3a e C4a no pacientes com COVID-19. Consistente com nosso estudo, já foi mostrada ativação maior do sistema complemento na maior parte dos pacientes diagnosticados com COVID-19 durante hospitalização (HOLTER, et.al. 2020). Análise do plasma sanguíneo de pacientes com COVID-19 demonstrou elevação das anafilotoxinas C3a e C5a nos pacientes com COVID-19, sendo observado uma resposta exacerbada dessas anafilotoxinas principalmente em pacientes com maior gravidade da doença (LAFON et al. 2021), mostrando similaridade com nossos resultados de C3a. Na literatura, a associação da anafilotoxina C4a durante a infecção por SARS-CoV-2 é escassa, reforçando o ineditismo dos nossos resultados com a avaliação dessa anafilotoxina. Deste modo, pode se afirmar que as anafilotoxinas são importantes na patogênese da COVID-19, podendo inclusive contribuir para o surgimento da hipercitocinemia, trombozes e possível agravamento do quadro clínico desses pacientes (Figura 28).

Figura 28 – Ativação do sistema complemento desencadeia liberação de citocinas, inflamação e coagulação.



Legenda: Esquema representativo da ativação do sistema completo resultando em liberação de citocinas e coagulação. Após a ligação do vírus SARS-CoV-2 no receptor ACE2 de células endoteliais, ocorre a ativação do sistema complemento por suas diferentes vias (Clássica, Lectina e Alternativa). Após ativação os produtos do sistema complemento permite que haja infamação, onde a anafilotoxina C5a recruta monócitos/macrófagos e a infiltração de leucócitos produz proteases, citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS) que contribuem para inflamação e lesões vasculares. Além disso a anafilotoxina C5a e o complexo de ataque a membrana (MAC), induzem a liberação de P-selectina e fator de von Willebrand (VWF), promovendo adesão plaquetária e a liberação de trombomodulina (TM), iniciando a casaca de coagulação. Adaptado de NORIS, et.al 2020.

Durante as avaliações dos dados demográficos, encontramos repetidamente elevação de C3a e C4a nos pacientes com COVID-19, independente de idade e sexo, sendo evidenciado esse aumento tanto nos adultos quando em idosos com a COVID-19. Menciona-se na literatura que a infecção pelo vírus SARS-CoV-2 proporciona ao pacientes um estado tromboinflamatório disseminado (CHAUHAN, et.al. 2020) e que os níveis aumentados dos componentes gerados durante ativação do sistema complemento está fortemente correlacionado com complicações tromboembólicas (SINKOVITS, et.al. 2021). Nesse contexto, as evidências apontam que uma hiperativação do sistema complemento durante a COVID-19 está associada com a hiperinflamação e microangiopatias trombóticas nos pacientes diagnosticados com essa doença

(HENRY, et.al. 2021). Diante disso, correlacionamos C3a e C4a com moléculas ligadas a alterações no processo de coagulação como a ferritina, e obtivemos correlação positiva com ambas anafilotoxinas. Um padrão similar foi obtido por Sinkovits e colaboradores (2021), que encontraram correlação positiva na quantificação de ferritina com os níveis de C3a. Os mesmos autores também identificaram associação positiva dessa anafilotoxina com a PCR. A ferritina tem sido associada com complicações trombóticas em pacientes com COVID-19, sendo consistentemente mais elevada nesses pacientes do que nos pacientes sem complicações trombóticas ou hemorrágicas, sendo inclusive considerada um fator preditivo do agravamento da COVID-19 durante o processo de hospitalização (AL-SAMKARI et al., 2020).

No contexto de agravamento da COVID-19, Holter e colaboradores (2020) avaliando moléculas produzidas durante ativação do sistema complemento em pacientes hospitalizados com COVID-19, concluíram que essa ativação estaria associada com o desenvolvimento de insuficiência respiratória (IR) nesses pacientes. Em nossos resultados, observamos que os níveis de C3a e C4a encontraram-se aumentados nos pacientes que utilizaram ventilação mecânica durante o tratamento. Desse modo, observamos possível associação dessas moléculas com o desenvolvimento de IR e redução de funções pulmonares na COVID-19, no qual os pacientes necessitam fazer uso de oxigenioterapia. Como já citado anteriormente, o escore qSOFA relaciona-se à deterioração do estado clínico do paciente e em nosso estudo encontramos aumento das anafilotoxinas C3a e C4a nos pacientes cujo qSOFA encontra-se alterado. Reafirmando a relação entre o aumento nos níveis dessa anafilotoxinas com o agravamento da COVID-19.

Interessantemente, níveis elevados de C3a e C5a nos pulmões de pacientes infectados por MERS-CoV foram descritos, sendo associados com a gravidade da doença e maior taxa de letalidade nos pacientes infectados (HAMED, et.al. 2021). Sabendo que o MERS-CoV possui alta similaridade estrutural e genômica com o SARS-CoV-2 e diante dos resultados obtidos em relação às anafilotoxinas, foi realizada a análise de C3a e C4a em relação ao prognóstico clínico dos pacientes com a infecção por SARS-CoV-2. No entanto, não encontramos alterações significativas nos níveis dessas anafilotoxinas nos pacientes que vieram a óbito em comparação aos pacientes que receberam alta hospitalar, resultado este que nos surpreendeu, visto que na literatura resultados divergentes são encontrados, onde Alosaimi e colaboradores (2021), apontam que ocorre aumento nos níveis das anafilotoxinas C3a e C5a nos pacientes que não sobreviveram a COVID-19. Fang e colaboradores (2020) identificaram que há aumento no

consumo da molécula C3 nos pacientes que vieram a óbito em decorrência da COVID-19 quando comparado com os sobreviventes. E outro estudo identificou redução de C4 nos pacientes que vieram a óbito em decorrência da COVID-19 (ZHAO, et.al. 2020).

Diante dos resultados obtidos por meio da avaliação dos níveis séricos das anafilotoxinas e sua possível relação com agravamento da COVID-19, decidiu-se por realizar o aprofundamento nas análises para entender se essas moléculas poderiam ser utilizadas como marcadores preditivos de diagnóstico e/ou severidade da COVID-19. Nesse contexto, realizamos os testes de curva ROC, onde encontramos que a avaliação conjunta de C3a e C4a possui alta especificidade e sensibilidade para prognóstico de severidade dos pacientes que foram diagnosticados com COVID-19. Outros estudos mostraram associação dos níveis elevados de C3a e da razão de C3a/C3 com maior gravidade da COVID-19, mas não encontraram diferenças significativas na quantificação de C4a (HENRY, et.al. 2021). Corroborando com esses dados, o estudo realizado por Sinkovits e colaboradores (2021) mostrou por meio do modelo de Cox que a anafilotoxina C3a e o aumento excessivo do consumo de C3, obtido pela avaliação da proporção C3a/C3, são medidas preditoras de mortalidade dos pacientes hospitalizados com COVID-19. Desta forma, destacamos a importância da avaliação das anafilotoxinas ainda no momento de admissão dos pacientes com a COVID-19, sendo utilizado como um biomarcador preditivo de prognóstico.

7. CONCLUSÕES

- Características como sexo, idade e comorbidades possuem diferenças de secreção de citocinas específicas para cada variável e que podem identificar diferenças fisiopatológicas da COVID-19 nesses grupos.
- A IL-12p70 e a IL-10 aumentadas podem ser biomarcadores preditivos de óbito.
- As análises das anafilotoxinas C3a e C4a permitem predizer o grau de severidade dos pacientes no momento da internação. Essas dosagens possibilitariam tratamento adequado em tempo mais rápido para redução de possíveis complicações, reduzindo tempo de internação e, provavelmente, poderiam contribuir para redução de custos hospitalares e do número de óbitos em decorrência da COVID-19.

8.REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K et al. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 8ª ed. 2015.
- ACKERMAN, S. J.; BOCHNER, B. S. Mechanisms of Eosinophilia in the Pathogenesis of Hypereosinophilic Disorders. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 27, n. 3, p. 357–375, 2007.
- AFSHAR-KHARGHAN V. The role of the complement system in cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, p. 780–789, 2017.
- AGGARWAL, B. B.; GUPTA, S. C.; KIM, J. H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. **Blood**, v. 119, n. 3, p. 651–665, 2012.
- AKKAYA, M.; KWAK, K.; PIERCE, S. K. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 4, p. 229–238, 2020.
- ALFARO, C. et al. Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up. **Cancer Treatment Reviews**, v. 60, p. 24–31, 2017.
- ALI, M. G. et al. Recent advances in therapeutic applications of neutralizing antibodies for virus infections: an overview. **Immunologic Research**, v. 68, n. 6, p. 325–339, 2020.
- ALNEK, K. et al. Increased blood levels of growth factors, proinflammatory cytokines, and Th17 cytokines in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–16, 2015.
- ALOSAIMI, B. et al. Complement Anaphylatoxins and Inflammatory Cytokines as Prognostic Markers for COVID-19 Severity and In-Hospital Mortality. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 1–13, 2021.
- AL-SAMKARI, H. et al. COVID-19 and coagulation: bleeding and thrombotic manifestations of SARS-CoV-2 infection. **Blood**, v. 136, n.4, p. 489–500, 2020.
- ANDO, M. et al. Memory T cell, exhaustion, and tumor immunity. *Immunological Medicine*, v. 43, n. 1, p. 1–9, 2020.
- ANGIONI, R. et al. Age-severity matched cytokine profiling reveals specific signatures in Covid-19 patients. **Cell Death and Disease**, 2020.
- AOSHI, T. et al. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. **Current Opinion in Virology**, v. 1, n. 4, p. 226–232, 2011.
- ARAUJO, D. B. et al. SARS-CoV-2 isolation from the first reported patients in Brazil and establishment of a coordinated task network. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, n. 12, p. 1–8, 2020.
- ARULKUMARAN, N. et al. Defining Potential Therapeutic Targets in Coronavirus Disease 2019: A Cross-Sectional Analysis of a Single-Center Cohort. **Critical Care Explorations**, v. 3, n. 8, 2021.
- ASSIRI, A. et al. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease. **Lancet infect**, p. 19–21, 2013.

- AXTELL, R. C.; RAMAN, C.; STEINMAN, L. Interferon- β exacerbates Th17-mediated inflammatory disease. **Trends in immunology**, v. 32, p. 272–277, 2011.
- AZKUR, A. K.; et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. **Allergy**, v. 75, n. 7, p. 1564–1581, 2020.
- BALKWILL, F. TNF- α in promotion and progression of cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 3, p. 409–416, 2006.
- BARDHAN, M.; KAUSHIK, R. Physiology, Complement Cascade. **StatPearls**, 2020.
- BECHER, B.; TUGUES, S.; GRETER, M. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. **Immunity**, v. 45, n. 5, p. 963–973, 2016.
- BEDKE, T. et al. Title: IL-10-producing T cells and their dual functions. **Seminars in Immunology**, v. 44, 2019.
- BELOUZARD, S. et al. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. **Viruses**, v. 4, n. 6, p. 1011–1033, 2012.
- BENT, R. et al. Interleukin-1 beta—A friend or foe in malignancies? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, 2018.
- BERMEJO-MARTIN, J. F. et al. Viral RNA load in plasma is associated with critical illness and a dysregulated host response in COVID-19. **Critical Care**, v. 24, p. 1–13, 2020.
- BIE, Y. et al. The Crucial Role of CXCL8 and its receptors in colorectal liver metastasis. **Disease Markers**, 2019.
- BLANCO-MELO, D.; et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. **Cell**, v.181, n. 5, p. 1036–1045.e9, 2020.
- BLOT, M. et al. The dysregulated innate immune response in severe COVID-19 pneumonia that could drive poorer outcome. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, p. 1–14, 2020.
- BOEHM, T.; SWANN, J. B. Origin and evolution of adaptive immunity. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 2, p. 259–283, 2014.
- BONILLA, F. A.; OETTGEN, H. C. Adaptive immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S33–S40, 2010.
- BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. 2. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2, p. 460–475, 2003.
- BRASIL, Ministério da saúde. Boletim epidemiológico especial: Doença pelo Coronavírus COVID-19 – Semana epidemiológica 29. **Boletim Epidemiológico**. V.23, p 1-56, 2020. ISSN 9352-7864
- BRIARD, B.; PLACE, D. E.; KANNEGANTI, T. D. DNA sensing in the innate immune response. **Physiology**, v. 35, n. 2, p. 112–124, 2020.
- BRILLAND, B. et al. Complement alternative pathway in ANCA-associated vasculitis: Two decades from bench to bedside. **Autoimmunity Reviews**, v. 19, n. 1, p. 102424, 2020.
- BROWN, M. A.; HURAL, J. Functions of IL-4 and control of its expression. **Critical Reviews in Immunology**, v. 37, n. 2–6, p. 181–212, 2017.

- BRUMMELMAN, J.; PILIPOW, K.; LUGLI, E. The Single-Cell Phenotypic Identity of Human CD8 + and CD4 + T Cells. **International review of cell and molecular biology**, v. 341, p. 63–124, 2018.
- BURGESS, A. W.; METCALF, D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. **Blood**, v. 56, p. 947–958, 1980.
- CANEDO-MARROQUÍN, G. et al. SARS-CoV-2: Immune Response Elicited by Infection and Development of Vaccines and Treatments. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1–19, 2020.
- CARTY, M.; GUY, C.; BOWIE, A. G. Detection of Viral Infections by Innate Immunity. **Biochemical Pharmacology**, v. 183, p. 114316, 2021.
- CAVALCANTE-SILVA, L.; et al. Neutrophils and COVID-19: The road so far. **International immunopharmacology**, v.90, 2021.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Severe respiratory illness associated with a novel coronavirus--Saudi Arabia and Qatar, 2012. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v.61, n.40 , p.820, 2012.
- CHAFEKAR, A.; FIELDING, B. C. MERS-CoV: Understanding the latest human coronavirus threat. **Viruses**, v. 10, n. 2, 2018.
- CHAN, Y. K.; GACK, M. U. Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing. **Nature reviews. Microbiology**, v.14, n. 6, p. 360–373, 2016.
- CHANG, C.; HOU, M.H.; CHANG, C.F.; HSIAO, C.D.; HUANG, T. The SARS coronavirus nucleocapsid protein – Forms and functions. **Antiviral Research**, v. 103, p. 39–50, 2014.
- CHAPMAN, N. M.; BOOTHBY, M. R.; CHI, H. Metabolic coordination of T cell quiescence and activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 1, p. 55–70, 2020.
- CHATZIGEORGIOU, A. et al. The pattern of inflammatory/anti-inflammatory cytokines and chemokines in type 1 diabetic patients over time. **Annals of Medicine**, v. 42, n. 6, p. 426–438, 2010.
- CHAUHAN, A. J.; WIFFEN, L. J.; BROWN, T. P. COVID-19: A collision of complement, coagulation and inflammatory pathways. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 9, p. 2110–2117, 2020.
- CHEN, K.; KOLLS, J. K. Interleukin-17A (IL17A). **Gene**, v. 614, n. 412, p. 8–14, 2017.
- CHEN, N. et al. RNA sensors of the innate immune system and their detection of pathogens. **IUBMB Life**, v. 69, n. 5, p. 297–304, 2017.
- 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. Aging in COVID-19: Vulnerability, immunity and intervention. **Ageing research reviews**, v. 65, 2021.
- CHUSID, M. J. Eosinophils: Friends or Foes? **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 6, n. 5, p. 1439–1444, 2018.
- CLERKIN, K. J. et al. COVID-19 and Cardiovascular Disease. **Circulation**, v. 2019, p. 1648–1655, 2020.

- CONWAY, E. M.; PRYZDIAL, E. L. G. Is the COVID-19 thrombotic catastrophe complement-connected? **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 11, p. 2812–2822, 2020.
- COPERCHINI, F.; CHIOVATO, L.; CROCE, L.; MAGRI, F.; ROTONDI, M. The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 53, p. 25–32, 2020.
- CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature microbiology**, v. 5, p. 536–544, 2020.
- CORSE, E.; MACHAMER, C. E. The cytoplasmic tails of infectious bronchitis virus E and M proteins mediate their interaction. **Virology**, v. 312, n. 1, p. 25–34, 2003.
- CROW J. F. Population genetics. *American journal of human genetics*, v.13, p.137–150, 1961.
- CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature reviews. Microbiology**, v. 17, p. 181–192, 2019.
- DEBNATH, M.; BANERJEE, M.; BERK, M. Genetic gateways to COVID-19 infection: Implications for risk, severity, and outcomes. **FASEB Journal**, v. 34, n. 7, p. 8787–8795, 2020.
- DEDIEGO, M. L. et al. A Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus That Lacks the E Gene Is Attenuated In Vitro and In Vivo. **Journal of Virology**, v. 81, n. 4, p. 1701–1713, 2007.
- DI GENNARO, F.; et al. Coronavirus Diseases (COVID-19) Current Status and Future Perspectives: A Narrative Review. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 8, 2020.
- DINARELLO, C. A. Historical Review of Cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. Suppl 1, p. S34–S45, 2007.
- DOUGAN, M.; DRANOFF, G.; DOUGAN, S. K. GM-CSF, IL-3, and IL-5 Family of Cytokines: Regulators of Inflammation. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 796–811, 2019.
- EBENBICHLER, C. F; et al. Human immunodeficiency virus type 1 activates the classical pathway of complement by direct C1 binding through specific sites in the transmembrane glycoprotein gp41. **The Journal of experimental medicine**, v.174, p. 1417–1424, 1991.
- ESLAM, M.; GEORGE, J. Targeting IFN-λ: therapeutic implications. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 20, n. 12, p. 1425–1432, 2016.
- FANG, S.; et al. Decreased complement C3 levels are associated with poor prognosis in patients with COVID-19: A retrospective cohort study. **International immunopharmacology**, v. 89, 2020.
- FENIMORE, J.; YOUNG, H. A. Regulation of IFN-γ expression. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 941, p. 1–19, 2016.
- FLOSS, D. M.; MOLL, J. M.; SCHELLER, J. IL-12 and IL-23-Close Relatives with Structural Homologies but Distinct Immunological Functions. **Cells**, v. 9, n. 10, p. 1–24, 2020.

- FORNI, D. et al. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 35–48, 2017.
- FRICKE-GALINDO, I.; FALFÁN-VALENCIA, R. Genetics Insight for COVID-19 Susceptibility and Severity: A Review. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 1–11, 2021.
- GABAY, C.; LAMACCHIA, C.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 4, p. 232–241, 2010.
- GAFFEN, S. L.; LIU, K. D. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. **Cytokine**, v. 28, n. 3, p. 109–123, 2004.
- GALANOPOULOS, M. et al. COVID-19 pandemic: Pathophysiology and manifestations from the gastrointestinal tract. **World Journal of Gastroenterology**, v. 26, n. 31, p. 4579–4588, 2020.
- GARCIA, B. L.; ZWARTHOFF, S. A.; ROOIJAKKERS, S. H.; GEISBRECHT, B. V. Novel Evasion Mechanisms of the Classical Complement Pathway. **Journal of immunology**, v. 197, p. 2051–2060, 2016.
- GEE, K. et al. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. **Inflammation and Allergy - Drug Targets**, v. 8, n. 1, p. 40–52, 2009.
- GERRITSEN, B.; PANDIT, A. The memory of a killer T cell: Models of CD8+ T cell differentiation. **Immunology and Cell Biology**, v. 94, n. 3, p. 236–241, 2016.
- GIBBERT, K. et al. IFN- α subtypes: Distinct biological activities in anti-viral therapy. **British Journal of Pharmacology**, v. 168, n. 5, p. 1048–1058, 2013.
- GISONDI, P. et al. Cutaneous manifestations of SARS-CoV-2 infection: a clinical update. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 34, n. 11, p. 2499–2504, 2020.
- GONG, J. et al. Correlation analysis between disease severity and inflammation-related parameters in patients with COVID-19: a retrospective study. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–7, 2020.
- GONZÁLEZ-NAVAJAS, J. M.; LEE, J.; DAVID, M.; RAZ, E. Immunomodulatory functions of type I interferons. **Nature reviews. Immunology**, v. 12, p. 125–135, 2012.
- GORIELY, S.; NEURATH, M. F.; GOLDMAN, M. How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 1, p. 81–86, 2008.
- GU, C.; WU, L.; LI, X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. **Cytokine**, v. 64, p. 477–485, 2013.
- GUILLIAMS, M.; MILDNER, A.; YONA, S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. **Immunity**, v. 49, n. 4, p. 595–613, 2018.
- HAMED, M. E. et al. Elevated Expression Levels of Lung Complement Anaphylatoxin, Neutrophil Chemoattractant Chemokine IL-8, and RANTES in MERS-CoV-Infected Patients: Predictive Biomarkers for Disease Severity and Mortality. **Journal of Clinical Immunology**, v. 41, n. 7, p. 1607–1620, 2021.

- HAMMING, I. et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **Journal of Pathology**, v. 203, n. 2, p. 631–637, 2004.
- HAMZA, T.; BARNETT, J. B.; LI, B. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 3, p. 789–806, 2010.
- HAN, H. et al. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, p. 1123–1130, 2020.
- HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. **Trends in immunology**, v. 41, p. 1100–1115, 2020.
- HASHIMOTO, M. et al. Cytokine-mediated regulation of CD8 T-cell responses during acute and chronic viral infection. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 2019.
- HEMANN, E. A.; GALE, M.; SAVAN, R. Interferon lambda genetics and biology in regulation of viral control. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.
- HENRY, B. M. et al. Complement levels at admission as a reflection of coronavirus disease 2019 (COVID-19) severity state. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 9, 2021.
- HIRAHARA, K.; NAKAYAMA, T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: Beyond the Th1/Th2 paradigm. **International Immunology**, v. 28, n. 4, p. 163–171, 2016.
- HISCOX, J. A. et al. The Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Nucleoprotein Localizes to the Nucleolus. **Journal of Virology**, v. 75, n. 1, p. 506–512, 2001.
- HO, I. C.; MIAW, S. C. Regulation of IL-4 Expression in Immunity and Diseases. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 941, p. 31–77, 2016.
- HOEK, L. et al. Identification of a new human coronavirus. **Nature Medicine**, v. 10, n. 4, p. 368–373, 2004.
- HOEK, L.; PYRC, K.; BERKHOUT, B. Human coronavirus NL63, a new respiratory virus. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 5, p. 760–773, 2006.
- HOFMANN, H. et al. S Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus Mediates Entry into Hepatoma Cell Lines and Is Targeted by Neutralizing Antibodies in Infected Patients. **Journal of Virology**, v. 78, n. 12, p. 6134–6142, 2004.
- HOLERS, V. M. Complement and its receptors: New insights into human disease. **Annual Review of Immunology**, v. 32, p. 433–459, 2014.
- HOLTER, J. C. et al. Systemic complement activation is associated with respiratory failure in COVID-19 hospitalized patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 40, p. 25018–25025, 2020.
- HU, B.; HUANG, S.; YIN, L. The cytokine storm and COVID-19. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 1, p. 250–256, 2021.

- HUANG et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. January, p. 497–506, 2020.
- HULSWIT, R. J.; DE HAAN, C. A.; BOSCH, B. J. Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. **Advances in virus research**, v. 96, p. 29–57, 2016.
- HUNTER, C. A.; JONES, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nature Immunology**, v. 16, n. 5, p. 448–457, 2015.
- IWAKURA, Y. et al. Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members. **Immunity**, v. 34, n. 2, p. 149–162, 2011.
- JACOBS, S. R.; DAMANIA, B. NLRs, inflammasomes, and viral infection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 3, p. 469–477, 2012.
- JAKIMOVSKI, D. et al. Interferon β for Multiple Sclerosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 8, n. 11, p. 1–19, 2018.
- JENSEN, S.; THOMSEN, A. R. Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. **Journal of virology**, v. 86, n. 6, p. 2900–2910, 2012.
- KAECH, S. M.; CUI, W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. **Nature reviews. Immunology**, v. 12, n.11, p. 749–761, 2012.
- KAK, G.; RAZA, M.; TIWARI, B. K. Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. **Biomolecular Concepts**, v. 9, n. 1, p. 64–79, 2018.
- KAPLAN, A. et al. Direct Antimicrobial Activity of IFN- β . **Journal of immunology**, v. 198, p. 4036–4045, 2017.
- KAUR, B. P.; SECORD, E. Innate Immunity. **Pediatric Clinics of North America**, v. 66, n. 5, p. 905–911, 2019.
- KEEGAN, C. et al. Mycobacterium tuberculosis Transfer RNA Induces IL-12p70 via Synergistic Activation of Pattern Recognition Receptors within a Cell Network. **Journal of immunology**, v.200, p. 3244–3258, 2018.
- KOYAMA, S. et al. Innate immune response to viral infection. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 336–341, 2008.
- KRYSTEL-WHITTEMORE, M.; DILEEPAN, K. N.; WOOD, J. G. Mast cell: A multi-functional master cell. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1–12, 2016.
- KUBA, K. et al. Trilogy of ACE2: A peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 128, n. 1, p. 119–128, 2010.
- KUMAR, B. V; CONNORS, T.; FARBER, D. L. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. v. 48, n. 2, p. 202–213, 2018.
- LAFON, E. et al. Potent SARS-CoV-2-Specific T Cell Immunity and Low Anaphylatoxin Levels Correlate With Mild Disease Progression in COVID-19 Patients. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 1–14, 2021.

- LAI, M. M.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in virus research**, v.48, p. 1–100, 1997.
- LAZEAR, H. M.; NICE, T. J.; DIAMOND, M. S. Interferon- λ : Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond. **Immunity**, v. 43, n. 1, p. 15–28, 2015.
- LAZEAR, H. M.; SCHOGGINS, J. W.; DIAMOND, M. S. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. **Immunity**, v.50, p. 907–923, 2019.
- LEE, G. R. The balance of th17 versus treg cells in autoimmunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 1–14, 2018.
- LI, F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. **Annual Review of Virology**, v. 3, p. 237–261, 2016.
- Li, Q., Xu, W., Li, W. X., Huang, C. L., & Chen, L. Dynamics of cytokines and lymphocyte subsets associated with the poor prognosis of severe COVID-19. **European review for medical and pharmacological sciences**, v.24, n.23, p.12536–12544, 2020.
- LI, W.; LIN, F.; DAI, M.; CHEN, L.; HAN, D.; CUI, Y.; PAN, P. Early predictors for mechanical ventilation in COVID-19 patients. **Therapeutic advances in respiratory disease**, v.14, p. 1-14, 2020.
- Li, X., Xu, S., Yu, M., Wang, K., Tao, Y., Zhou, Y., Shi, J., Zhou, M., Wu, B., Yang, Z., Zhang, C., Yue, J., Zhang, Z., Renz, H., Liu, X., Xie, J., Xie, M., & Zhao, J. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v.146, n.1, p. 110–118, 2020.
- LI, Y.; ZHOU, W.; YANG, L.; YOU, R. Physiological and pathological regulation of ACE2, the SARS-CoV-2 receptor. **Pharmacological research**, 157, 2020.
- LIN, J. X.; LEONARD, W. J. Fine-Tuning Cytokine Signals. **Annual review of immunology**, v. 37, p. 295–324, 2019.
- LING, M.; MURALI, M. Analysis of the Complement System in the Clinical Immunology Laboratory. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 39, n. 4, p. 579–590, 2019.
- LIONGUE, C.; JOHN, L. B.; WARD, A. C. Origins of adaptive immunity. **Critical Reviews in Immunology**, v. 31, n. 1, p. 61–71, 2011.
- LIU, D. X.; et al. Coronavirus envelope protein: A small membrane protein with multiple functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 16, p. 2043–2048, 2007.
- LIU, X.; DIEDRICHS-MÖHRING, M.; WILDNER, G. The Role of IFN- α in Experimental and Clinical Uveitis. **Ocular Immunology and Inflammation**, v. 27, n. 1, p. 23–33, 2019.
- LIU, G. Q.; et al. Distinct and Orchestrated Functions of RNA Sensors in Innate Immunity. **Immunity**, v. 53, n. 1, p. 26–42, 2020.
- LIU, Y. C.; KUO, R. L.; SHIH, S. R. COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. **Biomedical Journal**, v. 43, n. 4, p. 328–333, 2020.
- LUCKHEERAM, R. V. et al. CD4 +T cells: Differentiation and functions. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

- MA, Z.; NI, G.; DAMANIA, B. Innate Sensing of DNA Virus Genomes. **Annual review of virology**, v. 5, n.1, 341–362, 2018.
- MAHAJAN, A.; MANCHIKANTI, L. Value and validity of coronavirus antibody testing. **Pain Physician**, v. 23, n. 4, p. S381–S390, 2020.
- MALEK, T. R. The biology of interleukin-2. **Annual Review of Immunology**, v. 26, p. 453–479, 2008.
- MALONEY, B. E.; PERERA, K. D.; SAUNDERS, D.; SHADIPENI, N.; FLEMING, S. D. Interactions of viruses and the humoral innate immune response. **Clinical immunology**, v. 212, p. 1-26, 2020.
- MANDAL, A.; VISWANATHAN, C. Natural killer cells: In health and disease. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, v. 8, n. 2, p. 47–55, 2015.
- MARCEAU, F.; LUNDBERG, C.; HUGLI, T. E. Effects of the anaphylatoxins on circulation. **Immunopharmacology**, v. 14, n. 2, p. 67–84, 1987.
- MARKOWITZ, C. E. Interferon-beta: Mechanism of action and dosing issues. **Neurology**, v. 68, n. 24, p. 2–7, 2007.
- MAROOF, A.; KAYE, P. M. Temporal regulation of interleukin-12p70 (IL-12p70) and IL-12-related cytokines in splenic dendritic cell subsets during *Leishmania donovani* infection. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 1, p. 239–249, 2008.
- MASTRANGELI, R. et al. *In vitro* biological characterization of IFN- β -1a major glycoforms. **Glycobiology**, v. 25, n. 1, p. 21–29, 2015.
- MATHERN, D. R.; HEEGER, P. S. Molecules great and small: The complement system. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 9, p. 1636–1650, 2015.
- MCBRIDE, R.; VAN ZYL, M.; FIELDING, B. C. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. **Viruses**, v. 6, n. 8, p. 2991–3018, 2014.
- MCELVANEY, O. J. et al. Characterization of the inflammatory response to severe COVID-19 illness. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 202, n. 6, p. 812–821, 2020.
- MEHAFFEY, E.; MAJID, D. S. A. Tumor necrosis factor- α , kidney function, and hypertension. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 313, n. 4, p. F1005–F1008, 2017.
- MEHTA, H. M.; MALANDRA, M.; COREY, S. J. G-CSF and GM-CSF in Neutropenia. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 4, p. 1341–1349, 2015.
- MEHTA, O. P. et al. Coronavirus Disease (COVID-19): Comprehensive Review of Clinical Presentation. **Frontiers in Public Health**, v. 8, n. January, p. 1–9, 2021.
- MENG, J. et al. Renin-angiotensin system inhibitors improve the clinical outcomes of COVID-19 patients with hypertension. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 757–760, 2020.
- MIN, Y. Q.; MO, Q.; WANG, J.; DENG, F.; WANG, H.; NING, Y. J. SARS-CoV-2 nsp1: Bioinformatics, Potential Structural and Functional Features, and Implications for Drug/Vaccine Designs. **Frontiers in microbiology**, v. 11, 2020.

- MIOSSEC, P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 5, p. 625–630, 2009.
- MITTRÜCKER, H. W.; VISEKRUNA, A.; HUBER, M. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 62, n. 6, p. 449–458, 2014.
- MOLL-BERNARDES, R. et al. IL-10 and IL-12 (P70) Levels Predict the Risk of Covid-19 Progression in Hypertensive Patients: Insights From the BRACE-CORONA Trial. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 8, p. 1–10, 2021.
- MORTAZ, E.; TABARSI, P.; VARAHRAM, M.; FOLKERTS, G.; ADCOCK, I. M. The Immune Response and Immunopathology of COVID-19. **Frontiers in immunology**, v.11, 2020.
- MU, X. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an immunotarget for sepsis and COVID-19. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 18, n. 8, p. 2057–2058, 2021.
- MUNITZ, A. et al. Rapid seroconversion and persistent functional IgG antibodies in severe COVID-19 patients correlates with an IL-12p70 and IL-33 signature. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021.
- NAQVI, A.; et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. **Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease**, v. 1866, 2020.
- NEUMAN, B. W. et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. **Journal of Structural Biology**, v. 174, n. 1, p. 11–22, 2011.
- NEUMAN, B. W.; BUCHMEIER, M. J. Supramolecular Architecture of the Coronavirus Particle. **Advances in virus research**, v. 96, p. 1–27, 2016.
- NICHOLSON, L. B. The immune system. **Essays in Biochemistry**, v. 60, n. 3, p. 275–301, 2016.
- NORIS, M.; BENIGNI, A.; REMUZZI, G. The case of complement activation in COVID-19 multiorgan impact. **Kidney international**, v. 98, n. 2, p. 314–322, 2020.
- OLIVEIRA, W. K. DE et al. Como o Brasil pode deter a COVID-19. **Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Único de Saúde do Brasil**, v. 29, n. 2, 2020.
- OSMAN, M. et al. Impaired natural killer cell counts and cytolytic activity in patients with severe COVID-19. **Blood Advances**, v. 4, n. 20, p. 5035–5039, 2020.
- OUYANG, W.; O’GARRA, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 871–891, 2019.
- OVSYANNIKOVA, I. G. et al. The role of host genetics in the immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 susceptibility and severity. **Immunological Reviews**, v. 296, n. 1, p. 205–219, 2020.
- OWEN, D. L.; SJAASTAD, L. E.; FARRAR, M. A. Regulatory T Cell Development in the Thymus. **The Journal of Immunology**, v. 203, n. 8, p. 2031–2041, 2019.

- OŻAŃSKA, A.; SZYMCZAK, D.; RYBKA, J. Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 92, n. 1, p. 1–13, 2020.
- PALLADINO, M. A. et al. Anti-TNF- α therapies: The next generation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 9, p. 736–746, 2003.
- PALOMO, J. et al. The interleukin (IL)-1 cytokine family - Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. **Cytokine**, v. 76, n. 1, p. 25–37, 2015.
- PANDEY, P.; AGARWAL, S.; RAJKUMAR. Lung Pathology in COVID-19: A Systematic Review. **International journal of applied & basic medical research**, v. 10, n.4, p. 226–233, 2020.
- PARISSIS, J. T. et al. Plasma profiles of peripheral monocyte-related inflammatory markers in patients with arterial hypertension. Correlations with plasma endothelin-1. **International Journal of Cardiology**, v. 83, n. 1, p. 13–21, 2002.
- PARK, A.; IWASAKI, A. Type I and Type III Interferons - Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. **Cell host & microbe**, v. 27, n. 6, p. 870–878, 2020.
- PARKIN, J., COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**, v. 357, p. 1777–1789, 2001.
- PATTERSON, B. K. et al. Immune-Based Prediction of COVID-19 Severity and Chronicity Decoded Using Machine Learning. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. June, p. 1–13, 2021.
- PEIRIS, J. S. et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. **Lancet**, v. 361, p. 1319–1325, 2003.
- PEIRIS, J. S. M.; YUEN, K.Y.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; STÖHR, K. The Severe Acute Respiratory Syndrome. **New England Journal Of Medicine**, v. 349 n. 25, p. 2431- 244, 2003. (a)
- PHELAN, A. L.; KATZ, R.; GOSTIN, L. O. The Novel Coronavirus Originating in Wuhan, China: Challenges for Global Health Governance. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 8, p. 709–710, 2020.
- PIEPER, K.; GRIMBACHER, B.; EIBEL, H. B-cell biology and development. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 4, p. 959–971, 2013.
- QIN, L. et al. Gendered effects on inflammation reaction and outcome of COVID-19 patients in Wuhan. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 11, p. 2684–2692, 2020.
- RABAAN, A. A. et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: A comparative overview. **Infezioni in Medicina**, v. 28, n. 2, p. 174–184, 2020.
- RAJ, V. S.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A.; HAAGMANS, B. L. MERS: emergence of a novel human coronavirus. **Current opinion in virology**, v. 5, p. 58–62, 2014.
- RAMANI, T.; et al. Cytokines: The Good, the Bad, and the Deadly. **International journal of toxicology**, v.34, p.355–365, 2015.
- REHWINKEL, J.; GACK, M. U. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 9, p. 537–551, 2020.

- RIGONI, A.; COLOMBO, M. P.; PUCILLO, C. Mast cells, basophils and eosinophils: From allergy to cancer. **Seminars in Immunology**, v. 35, p. 29–34, 2018
- RODRIGUES-DIEZ, R. R. et.al. Interleuquina-17A: posible mediador y diana terapéutica en la hipertensión. **Nefrologia**, v. 41, p. 244–257, 2021.
- ROMAGNANI, S. Lymphokine production by human T cells in disease states. **Annual review of immunology**, v. 12, p. 227–257, 1994.
- ROMO, R. M. et.al. Innate immunity in vertebrates: an overview. **Immunology**, v. 148, p. 125–139, 2016.
- ROSE-JOHN, S. Interleukin-6 family cytokines. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2018.
- ROSENBERG, H. F.; FOSTER, P. S. Eosinophils and COVID-19: diagnosis, prognosis, and vaccination strategies. **Seminars in Immunopathology**, v. 43, n. 3, p. 383–392, 2021.
- ROSENBLUM, M. D.; WAY, S. S.; ABBAS, A. K. Regulatory T cell memory. **Nature reviews. Immunology**, 16(2), 90–101, 2016.
- ROSOWSKI, E. E. Determining macrophage versus neutrophil contributions to innate immunity using larval zebrafish. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 13, n. 1, 2020.
- RUNZA, V. L.; SCHWAEBLE, W.; MÄNNEL, D. N. Ficolins: Novel pattern recognition molecules of the innate immune response. **Immunobiology**, v. 213, n. 3–4, p. 297–306, 2008.
- RUSSO, R. C. et al. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 10, n. 5, p. 593–619, 2014.
- SAEEDI-BOROJENI, A. et al. COVID-19: A Case for Inhibiting NLRP3 Inflammasome, Suppression of Inflammation with Curcumin? **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 128, n. 1, p. 37–45, 2021.
- SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 745–763, 2004.
- SAMUDRALA, P. K.; et al. Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. **European journal of pharmacology**, v. 883, (2020).
- SARMA, J. V.; WARD, P. A. The complement system. **Cell and Tissue Research**, v. 343, n. 1, p. 227–235, 2011.
- SATTLER, S. Cardiovascular Immunology. Chapter 1: The role of the immune system beyond the fight against infection. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1003, n. Figure 1, p. 3–14, 2017.
- SCHOEMAN, D.; FIELDING, B. C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. **Virology journal**, V. 16, n. 69, p. 1-22, 2019.
- SCHRODER, K. et al. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 163–189, 2004.
- SHEERVALILOU, R. et al. COVID-19 under spotlight: A close look at the origin,

transmission, diagnosis, and treatment of the 2019-nCoV disease. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 12, p. 8873–8924, 2020.

SHIBABAW, T. et al. Role of ifn and complements system: Innate immunity in sars-cov-2. **Journal of Inflammation Research**, v. 13, p. 507–518, 2020.

SIMS, A. C. et al. SARS-CoV replication and pathogenesis in an in vitro model of the human conducting airway epithelium. **Virus Research**, v. 133, n. 1, p. 33–44, 2008.

SINKOVITS, G. et al. Complement Overactivation and Consumption Predicts In-Hospital Mortality in SARS-CoV-2 Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

SONG, P. et al. Cytokine storm induced by SARS-CoV-2. **Clinica Chimica Acta**, v. 509, n. January, p. 280–287, 2020.

SOY, M. et al. Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. **Clinical Rheumatology**, v. 39, n. 7, p. 2085–2094, 2020.

STAMBAS, J.; LU, C.; TRIPP, R. A. Innate and adaptive immune responses in respiratory virus infection: implications for the clinic. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 14, n. 11, p. 1141–1147, 2020.

STONE, K. D.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v.125, p 1-15, 2010.

SU, S.; WONG, G.; SHI, W.; LIU, J.; LAI, A.; ZHOU, J.; LIU, W.; BI, Y.; GAO, G. F. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. **Trends in microbiology**, v.24, p. 490–502, 2016.

TAEFEHSHOKR, N. et al. Covid-19: Perspectives on Innate Immune Evasion. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1–12, 2020.

TAGHILOO, S. et al. Cytokine profiling in Iranian patients with COVID-19; association with clinical severity. **Iranian journal of immunology : IJI**, v. 18, n. 1, p. 54-64, 2021.

TAKAHASHI, T. et al. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. **Nature**, v.588, n.7837, p. 315–320, 2020.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 6, p. 1–16, 2014.

TANAKA, T. et al. Regulation of IL-6 in immunity and diseases. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 941, p. 79–88, 2016.

TANG, Y. et al. Epidemiology of COVID-19 in Brazil: using a mathematical model to estimate the outbreak peak and temporal evolution. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 1453–1456, 2020.

THEOHARIDES, T. C.; TSILIONI, I.; REN, H. Recent advances in our understanding of mast cell activation - or should it be mast cell mediator disorders?. **Expert review of clinical immunology**, v.15, p. 639–656, 2019.

- TIKELLIS, C.; THOMAS, M. C. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is a key modulator of the renin angiotensin system in health and disease. **International Journal of Peptides**, v. 2012, 2012.
- TISONCIK, J. R. et al. Into the Eye of the Cytokine Storm. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 1, p. 16–32, 2012.
- TJAN, L. H. et al. Early Differences in Cytokine Production by Severity of Coronavirus Disease 2019. **The Journal of infectious diseases**, v. 223, n. 7, p. 1145–1149, 2021.
- V'KOVSKI, P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 155–170, 2021.
- VALENCIA, O. A. et al. Interleukin-2 as immunotherapeutic in the autoimmune diseases. **International Immunopharmacology**, v. 81, p. 106296, 2020.
- VAN DEN BERG, D. F.; TE VELDE, A. A. Severe COVID-19: NLRP3 Inflammasome Dysregulated. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1–6, 2020.
- VENEGAS, C.; HENEKA, M. T. Danger-associated molecular patterns in Alzheimer's disease. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 101, n. 1, p. 87–98, 2017.
- VIGNESH, P. et al. Complement in autoimmune diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 465, p. 123–130, 2017.
- VINCENT, J. L. et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. **Intensive Care Medicine**, v. 22, n. 7, p. 707–710, 1996.
- WALKER, J. A.; MCKENZIE, A. N. J. TH2 cell development and function. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 2, p. 121–133, 2018.
- WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **The New England journal of medicine**, v. 344, n. 14, p. 1058–66, 2001.
- WEISKOPF, D.; WEINBERGER, B.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. The aging of the immune system. **Transplant International**, v. 22, n. 11, p. 1041–1050, 2009.
- WEISS, S. R.; LEIBOWITZ, J. L. Coronavirus pathogenesis. **Advances in Virus Research**, v. 81, p. 85–163, 2011.
- WELLER, P. F.; SPENCER, L. A. Functions of tissue-resident eosinophils. **Nature reviews. Immunology**, v.17, p. 746–760. 2017.
- WIERSINGA, W. J.; et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA**, v.324, n. 8, p. 782–793, 2020.
- WOJNO, E. D.T.; HUNTER, C. A.; STUMHOFER, J. S. The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 851–870, 2019.
- WOO, P. C. Y. et al. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. **Viruses**, v. 2, n. 8, p. 1805–1820, 2010.
- WOO, P. C. et al. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and

betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. **Journal of virology**, v. 86, p. 3995–4008, 2012.

WORD HEALTH ORGANIZATION. Coronavirus disease (COVID-19): Situacion report-144, 2020.

WU, D.; WU, T.; LIU, Q.; YANG, Z. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. **International journal of infectious diseases**, v. 94, p.44–48, 2020.

XU, J. et al. The ACE2/angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis: Pleiotropic roles in cancer. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. MAY, p. 1–8, 2017.

XU, H. et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. **International Journal of Oral Science**, v. 12, n. 1, p. 1–5, 2020.

YAN, Y.; CHANG, L.; WANG, L. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. **Reviews in Medical Virology**, v. 30, n. 3, p. 1–14, 2020.

YANG, Y., DU, L., LIU, C., WANG, L., MA, C., TANG, J., BARIC, R. S., JIANG, S., & LI, F. Receptor usage and cell entry of bat coronavirus HKU4 provide insight into bat-to-human transmission of MERS coronavirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, p. 12516–12521, 2014.

YANG, L. et al. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2020a.

YANG, L. et al. Immune characteristics of severe and critical COVID-19 patients. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, 2020b.

YANG, Q.; SHU, H. B. Deciphering the pathways to antiviral innate immunity and inflammation. **Advances in immunology**, v.145, p.1–36, 2020.

YAO, Y. et al. IL-10-Producing lymphocytes in inflammatory disease. **International Reviews of Immunology**, v. 32, n. 3, p. 324–336, 2013.

YAO, Z. et al. Immune environment modulation in pneumonia patients caused by. **Ageing**, v. 12, n. 9, p. 7639–7651, 2020.

YOON, H. K. et al. The TLR7 agonist imiquimod selectively inhibits IL-4-induced IgE production by suppressing IgG1/IgE class switching and germline ϵ transcription through the induction of BCL6 expression in B cells. **Cellular Immunology**, v. 338, p. 1–8, 2019.

YU, K.; LIEBER, M. R. Current insights into the mechanism of mammalian immunoglobulin class switch recombination. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v.54, p. 333–351, 2019.

ZAHID, A. et al. Molecular and Structural Basis of DNA Sensors in Antiviral Innate Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1–15, 2020.

ZAKI, A. M.; VAN BOHEEMEN, S.; BESTEBROER, T. M.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. **The New England journal of medicine**, v.367, p.1814–1820, 2012.

- ZANONI, I.; GRANUCCI, F.; BROGGI, A. Interferon (IFN)- λ takes the helm: Immunomodulatory roles of type III IFNs. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. NOV, p. 1–8, 2017.
- ZELOVÁ, H.; HOŠEK, J. TNF- α signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances. **Inflammation Research**, v. 62, n. 7, p. 641–651, 2013.
- ZHANG, S. et al. Inborn errors of interferon (IFN)-mediated immunity in humans: insights into the respective roles of IFN- α/β , IFN- γ and IFN- λ in host defense. **Immunological Reviews**, v. 226, p. 29–40, 2008.
- ZHANG, S.; WANG, Q. Factors determining the formation and release of bioactive IL-12: Regulatory mechanisms for IL-12p70 synthesis and inhibition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372, n. 4, p. 509–512, 2008.
- ZHANG, Z. L. et al. Laboratory findings of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 80, n. 6, p. 441–447, 2020.
- ZHAO, N.; DI, B.; XU, L. L. The NLRP3 inflammasome and COVID-19: Activation, pathogenesis and therapeutic strategies. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 61, p. 2–15, 2021.
- ZHAO, Y. et al. Abnormal immunity of non-survivors with COVID-19: predictors for mortality. **Infectious diseases of poverty**, V. 9, p. 1–10, 2020.
- ZHENG, M. et al. The Cytokine Profiles and Immune Response Are Increased in COVID-19 Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **Journal of Diabetes Research**, 2021.
- ZHOU W. The new face of anaphylatoxins in immune regulation. **Immunobiology**, v. 217, p. 225–234, 2012.
- ZHOU, F. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, 2020.
- ZUMLA, A. et al. Coronaviruses-drug discovery and therapeutic options. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 5, p. 327–347, 2016.