



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ELOIZA LOPES DE LIRA TANABE

**ANÁLISE DE POTENCIAIS BIOMARCADORES LIGADOS A RESPOSTA
IMUNOLÓGICA EM PACIENTES COM COVID-19**

MACEIÓ – AL

2023

ELOIZA LOPES DE LIRA TANABE

**ANÁLISE DE POTENCIAIS BIOMARCADORES LIGADOS A RESPOSTA
IMUNOLÓGICA EM PACIENTES COM COVID-19**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Urban Borbely

MACEIÓ – AL

2023

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale CRB-4/ 661

T161a Tanabe, Eloiza Lopes de Lira.

Análise de potenciais biomarcadores ligados a resposta imunológica em pacientes com Covid-19 / Eloiza Lopes de Lira Tanabe. – 2023.
137 f. : il.

Orientador: Alexandre Urban Borbely.

Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 85-119.

Anexos: f. 120-137.

1. COVID-19. 2. Biomarcadores. 3. Resposta citotóxica. 4. SARS-CoV-2. I. Título.

CDU: 616-022.6

À memória de todos os pacientes incluídos neste estudo

e as demais vítimas da COVID-19

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todo aprendizado e conquistas ao longo dessa jornada;

Ao meu orientador, Dr. Alexandre Borbely, pela oportunidade de executar este trabalho e por toda contribuição para minha formação acadêmica, por meio de uma orientação afetuosa e incentivadora;

Aos professores, Dr. Thiago Aquino e Dr^a Ana Catarina Leite, pela submissão e coordenação do projeto “guarda-chuva” no qual esta tese integra e pela relação terna construída durante esta colaboração;

Ao Ministério da Educação, pelo fomento a este trabalho via UFAL;

À Unidade Laboratorial de Análises Clínicas do Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes (HUPAA), pelo estabelecimento do fluxo que oportunizou a obtenção das amostras dos pacientes;

Ao Dr. Thiago Sotero junto das residentes Juliana Leal e Larissa Pinto, pela sinalização das internações e coleta dos dados clínicos e laboratoriais dos pacientes;

Aos familiares dos pacientes, por autorizarem que seus entes queridos participassem deste estudo, mesmo em meio a tanta dor. E aos voluntários que gentilmente aceitaram participar do estudo;

Às minhas parceiras de bancada, carinhosamente chamadas de “sincício”, em especial a Ana Lúcia e Rayane Botelho pelo processamento e armazenamento das amostras coletas e pelo apoio nas citometrias, análises estatísticas, tabulação de dados. A Keyla Nobre por intermediar a obtenção dos TCLEs e apoio nas citometrias. A Camilla Mendes pelo auxílio nas citometrias. E a Lays Xavier pelo auxílio na aquisição e processamento das medidas dos espectros Raman;

À Dr^a Karen Borbely pelo fundamental suporte na organização, execução, aquisição e análise das citometrias;

Aos professores Dr. Eduardo Fonseca e Dr. Samuel Souza, junto com a Dr^a Elaine Cristina da Silva pelas medidas dos espectros Raman;

Ao Jeferson Ursulino pela parceria nas análises estatísticas;

Ao Laboratório de Biologia Celular (LBC) pela concessão de infraestrutura e insumos para realização deste trabalho e de colaborações, que agregaram minha formação acadêmica e científica, e em especial a técnica Juliane Silva que realizou as aquisições no citômetro e sempre deu apoio nas demandas experimentais;

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS/UFAL) pela contribuição para minha formação acadêmica;

À Capes pela concessão de bolsa a partir de março de 2021;

Aos membros da banca de qualificação, Dr. Abelardo Júnior, Dr^a Ana Catarina Leite, Dr^a Luiza Rabelo e Dr. Thiago Fragoso, pelas importantes correções e sugestões que compõe esta versão da tese;

À minha família e amigos pela torcida e apoio para conclusão do doutoramento. Em especial aos meus pais, Valdomiro e Ana Júlia, que por nunca terem hesitado em investir na minha educação, deram-me a oportunidade de sonhar e conquistar meus objetivos. Aos meus irmãos, Euclides e Eloana, pelo amparo e amor ao longo de toda minha jornada acadêmica. E ao meu esposo Ithallo, pelo companheirismo na vida pessoal e acadêmica, e por todo suporte e apoio incondicional para a execução deste trabalho.

RESUMO

A infecção pelo Coronavirus da Síndrome Respiratória Aguda Severa-2 (SARS-CoV-2) gera diferentes desfechos clínicos, podendo levar ao óbito. Uma das hipóteses para essa gama de desfechos pode estar na resposta imune exagerada deflagrada pelo hospedeiro. Estudos anteriores mostraram que em pacientes que apresentam inflamação pulmonar severa ocorre redução no número de linfócitos citotóxicos, além de estarem funcionalmente esgotados. Outrossim, o objetivo do estudo foi investigar o valor prognóstico de alterações plasmáticas e celulares correlacionadas com a resposta imune. Foi realizado um estudo observacional, com 75 participantes, com aprovação pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos (30732120.1.0000.5013). Do total de amostras, 57 foram de pacientes hospitalizados no Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA/UFAL) (grupo COVID-19) e 19 foram de voluntários (grupo Controle) com idade, sexo e comorbidades pareados ao primeiro grupo. Foram realizadas análises hematológicas, bioquímicas, espectroscopia Raman do plasma, dosagem de sFas, sFasL, perforina, granzimas, granzimas (Gzm) A e B, e imunofenotipagem de subpopulações linfocitárias e linfoides. Como resultados, o grupo COVID-19 apresentou vários parâmetros laboratoriais preditivos de severidade e mortalidade. Na espectroscopia Raman foi observada a redução de picos atribuídos a aminoácidos (fenilalanina [$p \leq 0,001$], prolina [$p \leq 0,05$], triptofano [$p \leq 0,01$] e tirosina [$p \leq 0,01$]) e a carotenoides ($p \leq 0,05$), além de aumento em um pico atribuído a lipídeos ($p \leq 0,001$). Os pacientes com COVID-19 tiveram aumento nos níveis de GzmA ($p = 0,04$) e GzmB ($p = 0,01$), contudo a GzmB foi a variável de maior contribuição para discriminação entre os grupos de estudo (covariância 21,43; correlação 0,81). A GzmB também estava mais elevada em idosos ($p = 0,01$) e explica 81,7% da variância entre alta e óbito. Por fim, foi constatado aumento nas porcentagens de células linfoides inatas (ILC)1 e ILC3 ($p \leq 0,05$), e redução de linfócitos T CD4⁺ *naive* e de memória efetor ($p \leq 0,05$), e de linfócitos T CD8⁺ efetor e de memória efetor ($p \leq 0,01$). Com base nos resultados, acreditamos que as granzimas estão atuando em suas funções extracelulares, corroborando com a patogenia da doença e podendo ser utilizadas como marcadores de pior prognóstico para a COVID-19.

Palavras-chave: COVID-19, Marcadores, Resposta Citotóxica, SARS-CoV-2

ABSTRACT

The severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) infection leads to several clinical outcomes, including death. One possible hypothesis for such clinical variations could be due to an exaggerated immune response. Previous studies showed that in patients with severe lung inflammation, the number of cytotoxic T cells is reduced, presenting exhausted phenotypes and impaired functionality. Therefore, we aimed to investigate the prognostic value of plasmatic and cellular changes correlated with the immune response. The study was observational with 75 human subjects, and the approval of the human research ethics committee (30732120.1.0000.5013). From the total amount, 57 samples were from patients admitted to the Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA/UFAL) (COVID-19 group), and 19 donators (Control group) with paired ages, sex, and comorbidities. We conducted hematological and biochemical blood analysis, plasmatic analysis by Raman spectroscopy and by flow cytometry bead assay for sFas, sFasL, perforin, granzysin, and granzymes (Gzm) A and B, and immunophenotyping for lymphocytes and lymphoid cells subpopulations. The results indicated that the COVID-19 group presented several altered hematological and biochemical parameters which were predictive for severity and mortality. In Raman spectroscopy, we observed a reduction in spectra attributed to aminoacids (phenylalanine [$p \leq 0.001$], proline [$p \leq 0.05$], tryptophan [$p \leq 0.01$], and tyrosine [$p \leq 0.01$]) and carotenoids ($p \leq 0.05$), whereas an increase in a single spectrum attributed to lipids was observed as well ($p \leq 0.001$). The COVID-19 group had increased levels of GzmA ($p = 0,04$) and GzmB ($p = 0.01$), although the GzmB was the molecule that most contributed to groups discrimination (21.43 covariance; 0.81 correlation). The GzmB also was elevated in the elderly ($p = 0.01$) and explains 81.7% of the variance between discharge and death. It also detected increased amounts of innate lymphoid cells (ILC)1 and ILC3 ($p \leq 0.05$), and reduction of *naïve* and memory effector T CD4+ cells, and effector and memory effector T CD8+ cells ($p \leq 0.01$). Our results indicate that the granzymes are acting in their extracellular functions corroborating with the course of the disease and that they can be employed as worse prognosis markers for COVID-19.

Keywords: COVID-19, Markers, Cytotoxic response, SARS-CoV-2

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura morfológica e molecular dos vírus pertencentes a família <i>Coronaviridae</i>	8
Figura 2 – Reservatórios virais da subfamília <i>Orthocoronavirinae</i>	10
Figura 3 – Linha do tempo dos principais eventos até o estabelecimento da COVID-19 como pandemia	11
Figura 4 – Ciclo de replicação viral do SARS-CoV-2.....	13
Figura 5 – Principais manifestações clínicas sistêmicas da COVID-19 aguda	14
Figura 6 – Funções das células <i>natural killers</i>	21
Figura 7 – Mecanismos de morte das células-alvo mediado por linfócitos T CD8+.....	26
Figura 8 – Fluxograma de trabalho para obtenção de amostras, dados e análises dos voluntários do estudo	36
Figura 9 – Estratégia de <i>gates</i> e gráficos de pontos representativos de dados de citometria de fluxo de duas amostras.....	41
Figura 10 – Fluxo dos participantes que entraram no estudo	44
Figura 11 - Os espectros Raman médios do grupo COVID-19 frente ao grupo controle	49
Figura 12 – Análise da intensidade dos picos Raman do plasma do grupo COVID-19 frente ao grupo controle.....	50
Figura 13 - Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais - Análise Discriminante (OPLS-DA) da intensidade dos picos Raman do plasma de pacientes diagnosticados com COVID-19 frente ao grupo controle	52

Figura 14 – Comparação entre os níveis séricos de proteínas citotóxicas de pacientes diagnosticados com COVID-19 frente ao grupo controle	53
Figura 15 – Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais - Análise Discriminante (OPLS-DA), do nível sérico de moléculas citotóxicas em pacientes diagnosticados com COVID-19 com grupo controle	54
Figura 16 – Interação entre os fatores sexo (A) e idade (B) com os níveis séricos de moléculas citotóxicas do grupo COVID-19.....	55
Figura 17 – Comparação do nível sérico de moléculas citotóxicas entre o grupo COVID-19 com grupo controle, subdividindo o grupo COVID-19 por período de sintomas.....	56
Figura 18 – Comparação do nível sérico de moléculas citotóxicas em pacientes diagnosticados com COVID-19 com grupo controle, subdividindo o grupo COVID-19 por dias de internação.....	58
Figura 19 – Comparação do nível sérico de moléculas citotóxicas em pacientes diagnosticados com COVID-19 com grupo controle, subdividindo o grupo COVID-19 por local internação	59
Figura 20 - Análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) do nível sérico de moléculas citotóxicas do grupo COVID-19, classificado por desfecho	60
Figura 21 – Imunofenotipagem linfocitária de indivíduos com e sem COVID-19	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos usados para imunofenotipagem	39
Tabela 2 – Dados descritivos do grupo controle e COVID-19	46
Tabela 3 – Medicamentos administrados ao longo da internação dos pacientes	47
Tabela 4 - Os principais picos Raman do plasma dos grupos controle saudável e COVID-19 grave e análise estatística.	51
Tabela 5 - Correlação dos níveis de proteínas citotóxicas com parâmetros de hemograma em pacientes com COVID-19.....	62
Tabela 6 - Correlação dos níveis de proteínas citotóxicas com parâmetros bioquímicos em pacientes com COVID-19.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
APC	Célula apresentadora de antígeno
BSA	Albumina sérica bovina
C9	Componente 9 do sistema complemento
Ca²⁺	Íons de cálcio
CCL4	Proteína inflamatória de macrófagos
CD	Agrupamento de diferenciação
CDS	Sensores de DNA citosólico
CEPh	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
COVID-19	Doença do coronavírus de 2019
CPK	Creatinofosfoquinase
CTL	Linfócito T citotóxico
CXCL10	Proteína indutora de interferon gama
DMII	<i>Diabetes mellitus</i> tipo II
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
dsDNA	DNA de fita dupla
dsRNA	RNA de fita dupla
DVC	Doença cardiovascular existente
E	Proteína de envelope
ECA-2	Receptor enzima conversora da angiotensina 2
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
ERGIC	Retículo Endoplasmático-Golgi
FasL	Proteína ligante de Fas
FHL	Linfocitose hemofagocítica familiar
GNLY	Granulisina
GzmA	Granzima A
GzmB	Granzima B

HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HLA	Antígenos leucocitários humanos
HLH	Linfocitose hemofagocítica
HUPAA-UFAL	Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes (UFAL)
IFN	Interferon
IFN-β	Interferon beta
IFN-α	Interferon alfa
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
ILC	Célula linfóide inata
IRF	Fatores regulador de interferon
KHCO3	Bicarbonato de potássio
LDH	Lactato desidrogenase
LRA	Lesão renal aguda
M	Proteína de membrana
MEC	Matriz extracelular
MERS-CoV	<i>Middle East respiratory syndrome-related coronavirus</i>
mFas	Fas de membrana
mFasL	Fas ligante de membrana
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
mRNA	RNA mensageiro
N	Proteína de nucleocapsídeo
NDUFS3	NADH desidrogenase [ubiquinona] proteína ferro-enxofre 3
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NFκB	Fator nuclear κB
NH4Cl	Cloreto de amônio
NK	Célula <i>natural killer</i>

nsp1-16	Proteínas não estruturais 1-16
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPLS-DA	Projeções ortogonais à análise discriminante de estruturas latentes
PAF	Fator de ativação de plaquetas
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PAR	Receptores ativados por proteases
PAR-2	Receptor ativado por proteinase 2
PBS	Solução tampão de fosfato
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	Proteína C reativa
PD-1	Proteína de morte celular programada
pDCs	Dendríticas plasmocitoides
PFN	Perforina
PLS-DA	Análise discriminante de mínimos quadrados parciais
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RE	Retículo endoplasmático
RLR	Receptor do tipo RIG
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RTC	Complexo de transcrição-replicação viral
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
S	Proteína <i>spike</i>
S1	Subunidade 1 da proteína <i>spike</i>
S2	Subunidade 2 da proteína <i>spike</i>
SARS-CoV	<i>Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus</i>
SARS-CoV-2	Vírus da Síndrome Respiratória Aguda Severa-2
SBF	Soro fetal bovino
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
sFas	Fas solúvel

sFasL	Fas ligante solúvel
qSOFA	Avaliação rápida de falência sequencial de órgãos
ssRNA	RNA de fita simples
STING	Estimulador de genes de interferons
T CD4⁺	Linfócito T auxiliar
T CD8⁺	Linfócito T citotóxico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tfh	Linfócito T auxiliar folicular
TGF-β	Fator transformador de crescimento beta
T_H1	Linfócito T auxiliar tipo 1
T_H17	Linfócito T auxiliar tipo 17
T_H2	Linfócito T auxiliar tipo 2
T_H22	Linfócito T auxiliar tipo 22
T_H9	Linfócito T auxiliar tipo 9
TLR	Receptor do tipo <i>Toll</i>
TMPRSS2	Serina protease transmembranar 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
T_{reg}	Linfócito T auxiliar regulatório
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VIP	Importância das Variáveis para a Projeção
VWF	Fator de Von Willebrand

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2.1 Vírus da Síndrome Respiratória Aguda Severa-2 (SARS-CoV-2)	8
2.1.1 Grupo taxonômico.....	8
2.1.2 Epidemiologia.....	10
2.1.3 Fisiopatologia da infecção.....	12
2.2 Resposta Imunológica Antiviral.....	18
2.2.1 Resposta Imunológica Inata.....	18
2.2.2 Resposta Imunológica Adaptativa.....	22
2.2.3 Imunopatologia da COVID-19 aguda	26
2.3 Grânulos e receptores indutores de <i>killing</i>	28
2.3.1 Granzima A	28
2.3.2 Granzima B	29
2.3.3 Perforina.....	30
2.3.4 Granulisina	31
2.3.5 Fas solúvel (sFas) e ligante Fas solúvel (sFasL)	32
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivos gerais	34
3.2 Objetivos específicos	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Aspectos éticos.....	35
4.2 Amostras.....	35
4.2 Critérios de inclusão e exclusão no estudo.....	36
4.2.1 Critérios de inclusão.....	36
4.2.2 Critérios de exclusão.....	37

4.3 Coleta de sangue.....	37
4.4 Processamento e armazenamento das amostras.....	37
4.5 Dados clínicos e laboratoriais	38
4.6 Dosagem de marcadores citotóxicos	38
4.7 Imunofenotipagem por citometria de fluxo	39
4.7 Medidas e análise de dados do espectro Raman	42
4.9 Análises estatísticas	43
5. RESULTADOS	44
5.1 Participantes do estudo	44
5.2 Dados descritivos clínicos e laboratoriais do grupo COVID-19 e controle	44
5.3 Espectroscopia Raman.....	48
5.4 Dosagem sérica de proteínas envolvidas na resposta citotóxica.....	52
5.5 Populações celulares em pacientes com COVID-19	61
6. DISCUSSÃO	64
7. CONCLUSÕES	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.)	120
ANEXO B – Produtos de Tese (Artigos).....	123
ANEXO C – Produtos de Tese (Livros)	132
ANEXO D – Produtos de Tese (Patentes)	137

1. INTRODUÇÃO

Após as primeiras infecções provocadas pelo SARS-CoV-2, em Wuhan, província de Hubei, na China, em dezembro de 2019, o mundo se deparou com a mais recente emergência de saúde pública global (ZHU, Na *et al.*, 2020). Desde então, esforços são dedicados para a compreensão desta infecção e seus vários desfechos. A doença do coronavírus de 2019 (COVID-19) pode provocar cinco quadros clínicos distintos: assintomáticos, leves, moderados, graves e críticos (DA SILVA *et al.*, 2022). *A priori*, sexo, idade e presença de comorbidades prévias são listados como fatores que contribuem para essa diversidade de manifestações clínicas (MEHMOOD *et al.*, 2021). Contudo, os mecanismos de resposta imunológica ativados ou suprimidos frente à infecção pelo SARS-CoV-2 ainda precisam ser melhor compreendidos.

A resposta imune inata consiste na primeira barreira de defesa contra infecções (MEDZHITOV, R.; JANEWAY C., 2000). Todavia, o número ou virulência desses invasores podem reduzir eficácia dos mecanismos inerentes a essa resposta e desencadear a ativação daqueles mecanismos vinculados à imunidade adaptativa (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015). Cada tipo de resposta possui células especializadas na resolução de infecções virais devido a capacidade de lisar células infectadas (citotoxicidade), sendo elas, as células *natural killers* e os linfócitos T citotóxicos (LOUTEN, 2016). Para deflagrar esse processo citotóxico, as células são munidas de algumas proteínas específicas, como sFas, sFasL, perforina, granzima A e B, as quais vão atuar na abertura de poros na membrana plasmática ou na ativação de vias de morte celular (LOUTEN, 2016).

Desse modo, investigar as subpopulações celulares envolvidas e suas proteínas citotóxicas durante a infecção pelo SARS-CoV-2 é relevante, pois os dados gerados podem conter correlação com marcadores bioquímicos já utilizados na rotina hospitalar, além de potencial poder preditivo de desfecho clínico, o que auxiliaria no manejo de pacientes com COVID-19. Assim, esse estudo emerge com a proposta de avaliar o valor prognóstico tanto de subpopulações de linfócitos e células linfoides, quanto de moléculas vinculadas à resposta citotóxica em pacientes hospitalizados por COVID-19, buscando contribuir para a construção de conhecimento e gerar ferramentas que possam ser utilizadas na clínica para melhorar o poder prognóstico durante a COVID-19.

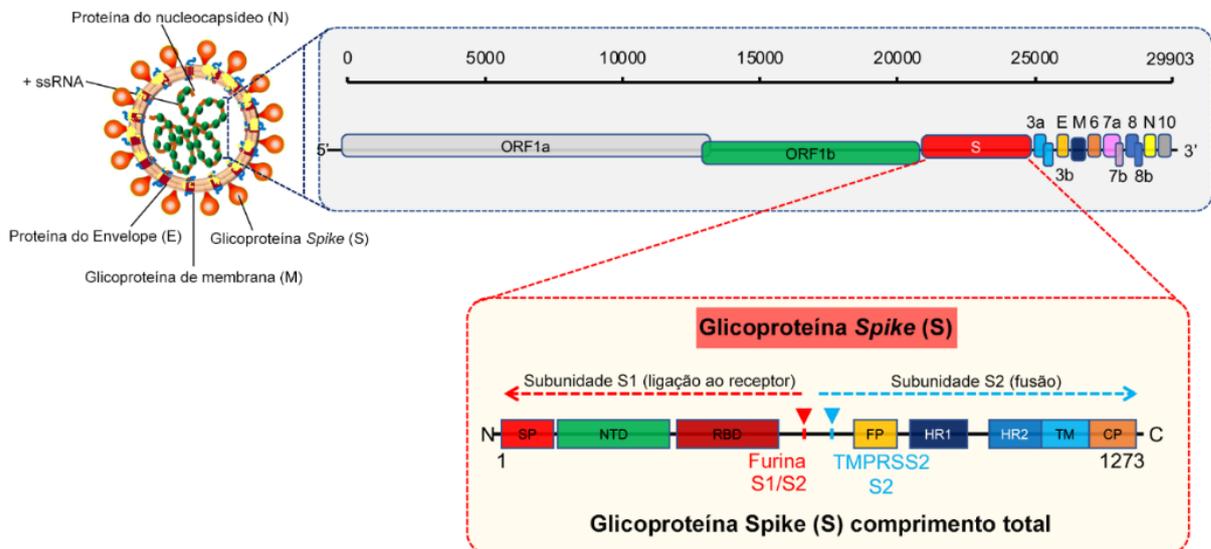
2. REVISÃO

2.1 Vírus da Síndrome Respiratória Aguda Severa-2 (SARS-CoV-2)

2.1.1 Grupo taxonômico

O SARS-CoV-2 pertence à família *Coronaviridae* e, assim como os demais integrantes, é referenciado como um coronavírus devido a organização das suas proteínas de superfície remeterem similaridade a uma coroa. Além disso, os coronavírus são esféricos e envelopados, apresentando o genoma codificado em uma fita simples de RNA, senso positivo, com aproximadamente 30 kb de comprimento (GORBALENYA *et al.*, 2006; HOLMES, 1999; KUMAR, Manoj; AL KHODOR, 2020; MASTERS, 2006) (Figura 1). Este genoma, por sua vez, é responsável por codificar três classes de proteínas virais: (1) estruturais – que compõe a partícula viral; (2) não-estruturais – que participam da replicação viral; (3) e acessórias – que não são essenciais para a estrutura ou replicação viral

Figura 1 - Estrutura morfológica e molecular dos vírus pertencentes a família *Coronaviridae*



Fonte: Adaptado de Kumar e Al Khodor (2020)

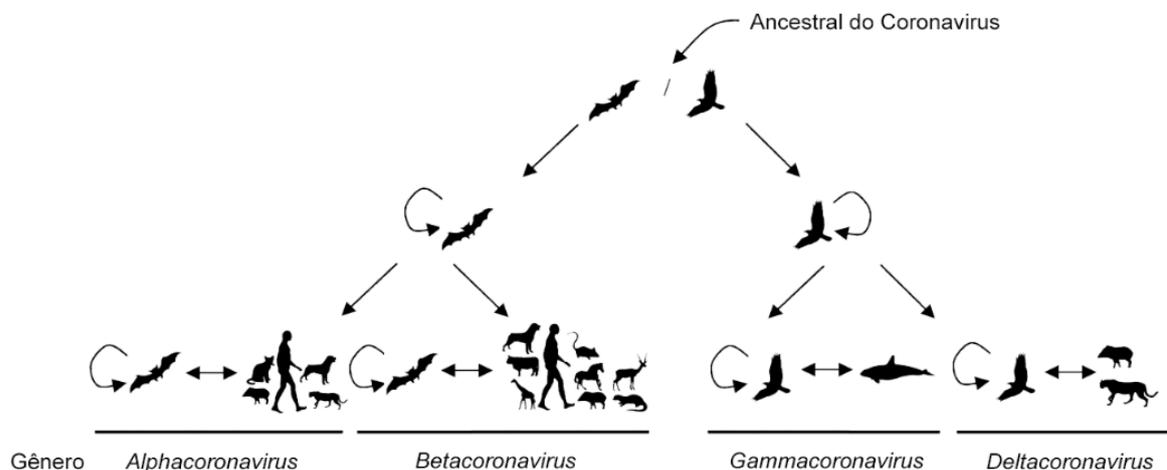
Entre as proteínas estruturais, estão elencadas a proteína de nucleocapsídeo (N) a qual não só forma o nucleocapsídeo, mas também se liga ao genoma viral, atuando na replicação viral e na evasão frente a resposta imunológica do hospedeiro

(CUI *et al.*, 2015). A proteína *spike* (S) consiste em uma glicoproteína de membrana composta por duas subunidades, S1 e S2, e participa da adsorção viral, sendo alvo dos anticorpos neutralizantes do hospedeiro (BOSCH *et al.*, 2003). Além destas, há a proteína de membrana (M), que confere forma ao vírion e tem papel chave na formação de novas partículas virais (NEUMAN *et al.*, 2011). E por fim, a proteína de envelope (E) que está incorporada ao envelope do vírion, e atua na montagem, liberação e patogênese viral (SCHOEMAN; FIELDING, 2019).

Diferente do quantitativo de proteínas estruturais, os coronavírus possuem 16 proteínas não estruturais (nsp1-16), que atuam em processos da replicação viral e em mecanismos de evasão da resposta imunológica do hospedeiro (CHEN, Yu; LIU; GUO, 2020). Somado a estas, existem ainda as proteínas acessórias, as quais variam entre as espécies de coronavírus, e por vezes não são essenciais para a replicação ou estrutura do vírus, atuando na patogenicidade ou disseminação viral (LIU, Ding Xiang *et al.*, 2014; MICHEL *et al.*, 2020).

Ainda, vale mencionar que os coronavírus estão agrupados em duas subfamílias: *Letovirinae*, com o gênero *Alphaletovirus*, encontrado apenas em rãs (*Microhyla fissipes*) (BUKHARI *et al.*, 2018); e *Orthocoronavirinae* (Figura 2), com os gêneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, que possuem como reservatório os morcegos e afetam predominantemente mamíferos (BITTAR *et al.*, 2020; GUAN *et al.*, 2003; KANG *et al.*, 2017; PAN, Y *et al.*, 2017; WANG, Dang; FANG; XIAO, 2016), e os gêneros *Deltacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, que têm como reservatórios os pássaros e acometem pássaros e algumas espécies de mamíferos (BOLEY *et al.*, 2020; FADHILAH *et al.*, 2020; WOO *et al.*, 2012).

Figura 2 – Reservatórios virais da subfamília *Orthocoronavirinae*



Fonte: Adaptado de Woo *et al.* (2012)

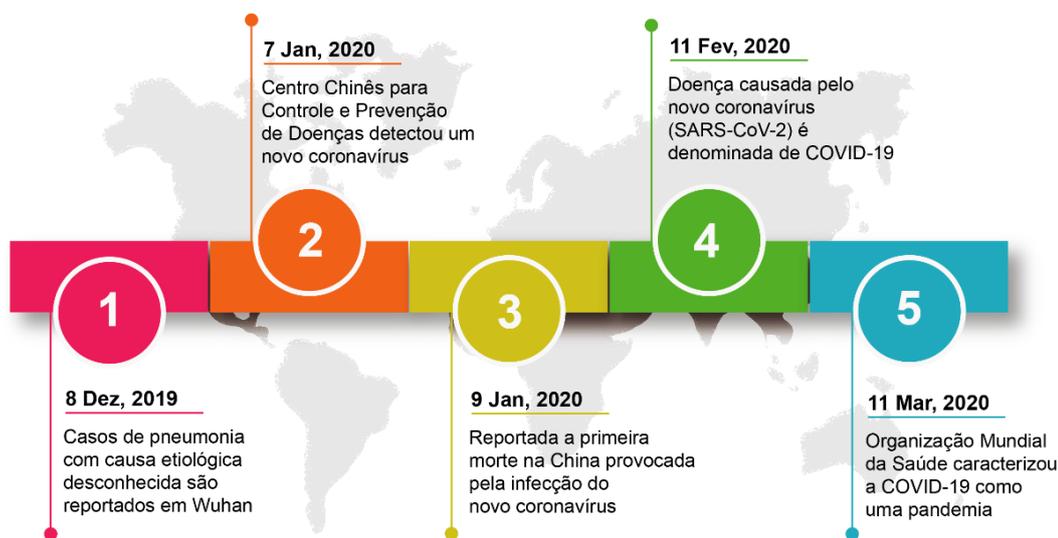
O SARS-CoV-2, por exemplo, pertence ao gênero *Betacoronavirus*, assim como MERS-CoV (*Middle East respiratory syndrome-related coronavirus*) e o SARS-CoV (*Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*). Todos os coronavírus citados infectam seres humanos e possuem grande similaridade genômica entre eles (GORBALENYA *et al.*, 2020; HARRISON; LIN; WANG, 2020; LU *et al.*, 2020). Uma característica singular do SARS-CoV-2 é a alta variabilidade da proteína S, compartilhando menos de 75% dos nucleotídeos frente à mesma proteína do SARS-CoV (WU, Fan *et al.*, 2020; ZHOU, Peng *et al.*, 2020), sendo este um dos fatores corresponsáveis pela pandemia atualmente instalada.

2.1.2 Epidemiologia

Em dezembro de 2019, várias unidades de saúde em Wuhan, província de Hubei, na China, reportaram atendimento a pacientes com pneumonia de causa etiológica desconhecida (ZHU, Na *et al.*, 2020). No mês seguinte, o Centro Chinês para Controle e Prevenção de Doenças detectou um novo coronavírus, além de relatar a primeira morte provocada por este (CHEN, N *et al.*, 2020; MURALIDAR *et al.*, 2020). Todavia, apenas em fevereiro o nome SARS-CoV-2 foi vinculado ao agente etiológico e nomeou-se como doença do coronavírus de 2019 (COVID-19) o conjunto de

sintomas resultantes de sua infecção em humanos (GORBALENYA et al., 2020; WHO, 2020^a) (Figura 3).

Figura 3 – Linha do tempo dos principais eventos até o estabelecimento da COVID-19 como pandemia



Fonte: Adaptado de Muralidar *et al.* (2020)

Por conseguinte, em 11 de março 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) caracterizou a COVID-19 como uma pandemia (WHO, 2020b) (Figura 3) e os números de casos e mortes no mundo cresceram a cada dia. No Brasil, desde a primeira notificação ao Ministério da Saúde, em 26 de fevereiro de 2020 até o final da semana epidemiológica 52 de 2022, foram confirmados 36.331.281 casos, com taxa de mortalidade acumulada de 327,7 óbitos por 100 mil habitantes (LOBO *et al.*, 2020; MS, 2022). Vale mencionar que, para este número total de casos, os coeficientes de incidência (por 100 mil hab.) de COVID-19 acumulado por região foram 25.546,00 (Sul); 25.232,80 (Centro-Oeste); 16.185,70 (Sudeste); 15.207,20 (Norte); e 12.561,40 (Nordeste) (MS, 2022).

Alagoas, por exemplo, teve seu o primeiro caso confirmado em março de 2020 e até o boletim epidemiológico de 28 de fevereiro de 2023, acumulava 337.469 casos confirmados (CIEVS/AL, 2023). Vale ainda ressaltar que as três comorbidades com maior frequência correlacionadas aos óbitos confirmados por COVID-19 no Estado de Alagoas foram diabetes, hipertensão arterial e cardiopatia, e

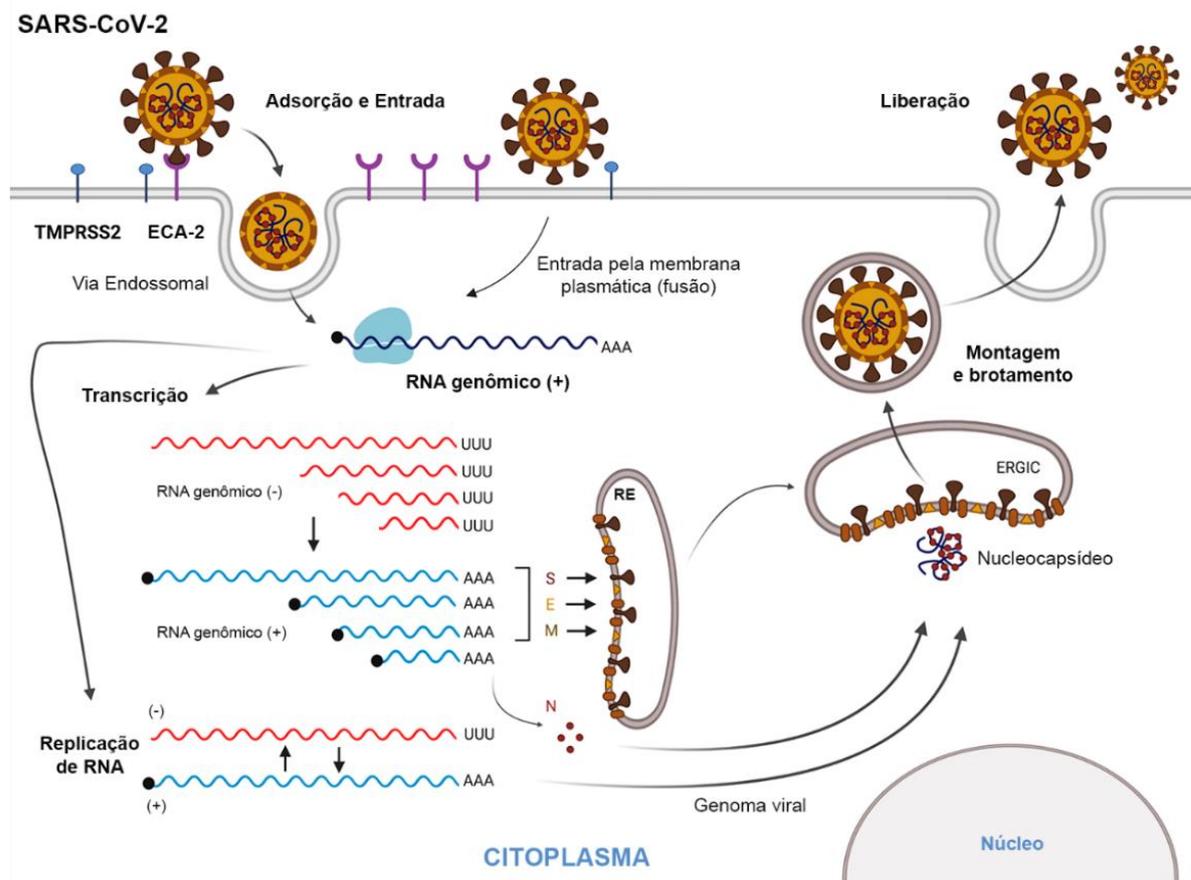
que a faixa etária mais atingida por tal desfecho foi a de indivíduos entre 70 a 79, composta por 55,9% de homens e 44,1% mulheres (CIEVS/AL, 2023).

2.1.3 Fisiopatologia da infecção

O SARS-CoV-2 é transmitido entre humanos por aerossóis e gotículas respiratórias, as quais transportam os vírions até o trato respiratório onde as proteínas virais irão interagir com os receptores das células hospedeiras (RABAAN *et al.*, 2021). A proteína S do vírus é a mais importante no processo de adsorção viral, sendo suas subunidades S1 e S2, responsáveis pela ligação ao receptor da célula hospedeira e fusão da membrana viral com a da célula do hospedeiro, respectivamente (FANG, 2016; HULSWIT; HAAN; BOSCH, 2016). Todavia, para que ocorra a clivagem da proteína S em suas subunidades, o SARS-CoV-2 utiliza a serina protease transmembranar 2 (TMPRSS2) da célula hospedeira (V'KOVSKI *et al.*, 2021).

Esta etapa de clivagem é de extrema importância para promover a interação vírus-célula, por meio do receptor enzima conversora da angiotensina 2 (ECA-2) (Figura 4), que além de ser expresso por células epiteliais nasais e epiteliais alveolares do tipo II, também é encontrado no coração, rins, intestinos, vasos sanguíneos e cérebro, estando associado principalmente a doenças cardiovasculares (DONOGHUE *et al.*, 2000; JIN *et al.*, 2020; KUMAR, M; KHODOR, 2020). Assim, o vírus é internalizado (por via endossomal ou fusão membranar) e libera seu material genômico, o qual se desassocia da proteína N para ser traduzido subsequentemente nas proteínas não estruturais (nsp1–16) que estabelecem o complexo de transcrição-replicação viral no retículo endoplasmático (RE) (Figura 4) (BAGGEN *et al.*, 2021). No geral, a nsp1 desliga a tradução do hospedeiro e promove a degradação do RNA mensageiro (mRNA) desse, enquanto as nsp2-11 modula o ambiente intracelular para favorecer a replicação viral e as nsp12-16 apresentam funções enzimáticas essenciais para a síntese de RNA, como a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp; nsp12) (BAGGEN *et al.*, 2021; DA SILVA *et al.*, 2022).

Figura 4 – Ciclo de replicação viral do SARS-CoV-2



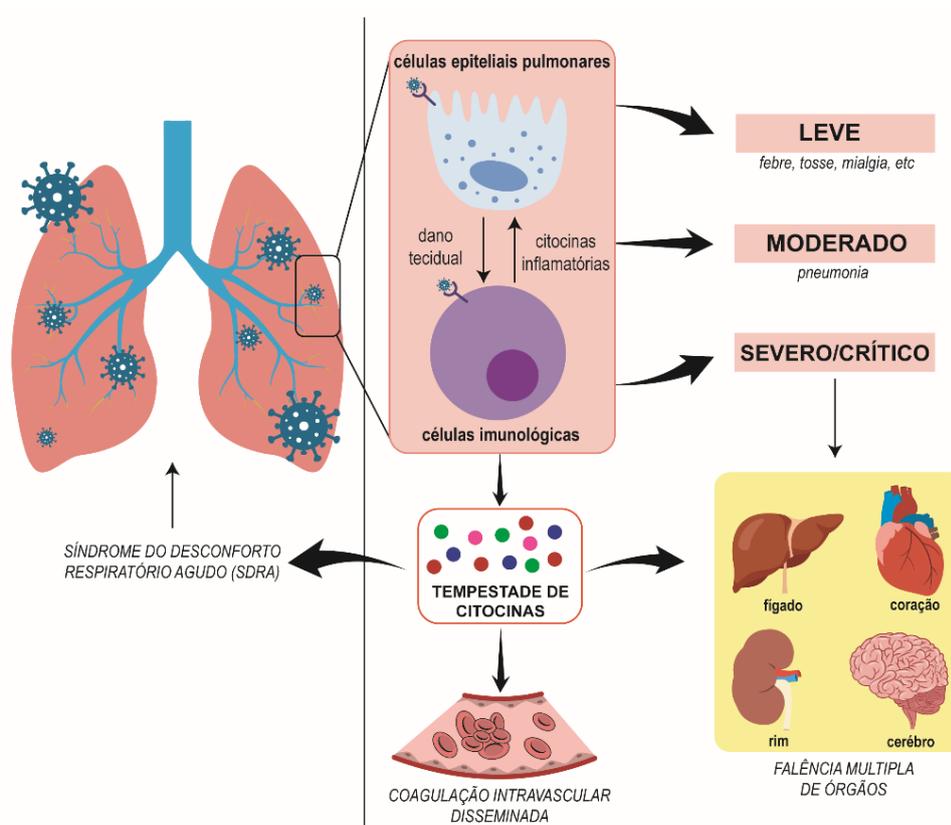
Fonte: Adaptado de Silva *et al.* (2022).

Legenda: TMPRSS2 – serina protease transmembranar 2; ECA-2 – receptor enzima conversora da angiotensina 2; N – proteína do nucleocapsídeo; S – proteína *Spike*; M – proteína de membrana; E – proteína de envelope; ERGIC – compartimento intermediário Retículo Endoplasmático-Golgi.

Após o estabelecimento do complexo de transcrição-replicação viral, cópias de RNA viral genômico senso negativo são produzidas para servirem de molde para novas cópias de RNA viral genômico senso positivo ou para a produção de conjuntos de RNAs subgenômicos utilizados na tradução das proteínas estruturais e acessórias (DA SILVA *et al.*, 2022). Por conseguinte, tanto o RNA genômico revestido pela proteína N quanto demais proteínas estruturais (S, M e E) se reúnem no compartimento intermediário Retículo Endoplasmático-Golgi (ERGIC), onde as novas partículas virais serão montadas e depois conduzidas até a superfície celular para liberação (Figura 4) (STERTZ *et al.*, 2007).

Todo esse processo de replicação viral ocorre inicialmente no trato respiratório superior, principalmente nas células epiteliais ciliadas nasais e através da aspiração de secreção nasal, o SARS-CoV-2 migra para o trato respiratório inferior, onde possui um tropismo maior pelas células da Clara e pneumócitos do tipo II (HOU *et al.*, 2020; HUI *et al.*, 2020; WÖLFEL *et al.*, 2020b). Além disso, uma vez que a infecção está instaurada, a progressão da doença e suas manifestações clínicas (Figura 5) são relativas para cada indivíduo.

Figura 5 – Principais manifestações clínicas sistêmicas da COVID-19 aguda



Fonte: Adaptado de Yang *et al.* (2021).

Em geral, os quadros clínicos da COVID-19 aguda podem ser classificados em: (1) assintomáticos, onde o indivíduo não apresenta sinais clínicos e nem alterações no exame de imagem do tórax; (2) leves, nos quais há o surgimento de sintomas leves como febre, fadiga, tosse, dor de garganta, congestão nasal, dor de cabeça, anorexia, mal-estar, dores musculares e dispneia, mas sem achados anormais no exame de imagem do tórax; (3) moderados, onde há manifestações clínicas do quadro leve,

contudo com indício de pneumonia leve nos exames de imagem do tórax; (4) graves, nos quais os sintomas são atrelados a uma infecção respiratória, com falta de ar e baixa saturação de oxigênio, além do comprometimento dos pulmões ultrapassam 50%; e (5) críticos, que exigem monitoramento e tratamento na unidade de terapia intensiva (UTI), devido ao progresso da infecção estar avançado, resultando em insuficiência respiratória e falência de órgãos (GAO *et al.*, 2021; WIERSINGA *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2021).

É importante destacar que tais quadros e desfechos clínicos de pacientes com COVID-19 estão atrelados a alguns fatores de risco, como as comorbidades. Estas estão presentes em cerca da metade dos indivíduos positivos para SARS-CoV-2, sendo mais prevalentes as doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão e *diabetes mellitus* II (BAJGAIN *et al.*, 2021; MEHMOOD *et al.*, 2021). Ademais, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença renal crônica e câncer também estão incluídas com fator de risco na COVID-19, contudo a grande parte dos casos de mortalidade estão vinculados a indivíduos com doenças cardiovasculares ou *diabetes mellitus* do tipo II, assim como a pessoas portadoras de mais de uma comorbidade (BAJGAIN *et al.*, 2021; MEHMOOD *et al.*, 2021)

Outros fatores também são tidos como de risco, tal como altos valores de idade, índice qSOFA (avaliação rápida de falência sequencial de órgãos), D-dímero e proteína C reativa (PCR), bem como o decréscimo dos níveis de albumina (ROD; OVIEDO-TRESPALACIOS; CORTES-RAMIREZ, 2020). Estes fatores demonstraram ser fortemente consistentes como preditivo de gravidade na COVID-19, contudo, há outros parâmetros que possuem suma importância no desfecho clínico, como a contagem de leucócitos, linfócitos e neutrófilos, e os níveis de alanina aminotransferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH), creatinofosfoquinase (CPK), creatinina, procalcitonina, troponinas cardíacas, tempo de protrombina, ferritina e bilirrubina (IZCOVICH *et al.*, 2020; ZHOU, F *et al.*, 2020).

Todo contexto de manifestações clínicas e indicadores de severidade, também estão atrelados a resposta multissistêmica que a COVID-19 pode desencadear (Figura 5), sendo o sistema respiratório o primeiro a sofrer danos, haja vista que a transmissão do coronavírus é pelas vias aérea (MEYEROWITZ *et al.*, 2021; WÖLFEL

et al., 2020a). Assim, a princípio, o vírus infecta células ciliadas primárias das vias aéreas condutoras e por conseguinte, pode progredir no trato respiratório e infectar os pneumócitos alveolares do tipo II, localizados nos pulmões (MEYEROWITZ *et al.*, 2021; MOSSEL *et al.*, 2008). Estas células são responsáveis pela manutenção da integridade do epitélio pulmonar e pela produção de surfactante, o qual impede o colapso dos alvéolos pulmonares (MASON, 2006; MOSSEL *et al.*, 2008). Desse modo, a injúria tecidual alveolar em consequência de apoptose dos pneumócitos alveolares do tipo II provoca dano alveolar difuso e prejuízo no processo de respiração (troca gasosa) (CHAMS *et al.*, 2020). Este quadro resulta no desenvolvimento da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) (CHAMS *et al.*, 2020; MASON, 2020).

O SARS-CoV-2, ainda, pode induzir complicações no sistema cardiovascular, o que justifica indivíduos com doença cardiovascular existente (DVC) possuírem um risco maior de apresentarem um pior prognóstico da COVID-19 (LI, Bo *et al.*, 2020; XIONG *et al.*, 2020). Isso ocorre porque a ECA-2 é expressa no coração, o que predispõe a uma infecção miocárdica (ZOU *et al.*, 2020). Ainda, o aumento da demanda cardiometabólica pela inflamação sistêmica e o estado de hipóxia resultante da SDRA, podem impactar na oferta-demanda de oxigênio ao miocárdio e resultar em uma lesão aguda (BANSAL, 2020; LONG *et al.*, 2020; ZAIM *et al.*, 2020). Além disso, arritmias provocadas pelo desequilíbrio eletrolítico, oriundo da interação do SARS-CoV-2 com o sistema renina-angiotensina-aldosterona, e o infarto agudo do miocárdio, por ruptura de placa aterosclerótica ou trombose coronariana devido a inflamação sistêmica, também são complicações cardiovasculares comuns em indivíduos com COVID-19 (CHEN *et al.*, 2020; LONG *et al.*, 2020; ZAIM *et al.*, 2020).

Outro sistema que também pode ser afetado nas infecções por SARS-CoV-2 é o renal (Ng *et al.*, 2020; RONCO; REIS; HUSAIN-SYED, 2020). Aproximadamente 20 a 40% dos pacientes internados em UTI apresentam lesão renal aguda (LRA), a qual possui patogênese multifatorial, e é considerada um marcador de gravidade vinculado a um prognóstico de sobrevida negativo (CHENG *et al.*, 2020; RICHARDSON *et al.*, 2020).

Dentre as razões etiológicas para o desenvolvimento de LRA na COVID-19 está a injúria direta por meio da infecção de células renais via receptor da ECA-2, como as células endoteliais, epiteliais tubulares e os podócitos, resultando em disfunção mitocondrial, necrose tubular aguda, glomerulopatia e extravasamento de proteínas pela cápsula de Bowman (LARSEN *et al.*, 2020; VARGA *et al.*, 2020). Há também a azotemia pré-renal, que consiste no aumento das concentrações séricas de ureia, creatinina e outros compostos nitrogenados não-proteicos no sangue, devido a hipovolemia decorrentes de manifestações clínicas da COVID-19 (MOHAMED *et al.*, 2020; NG *et al.*, 2020).

A hipercoagulação também é vista como causa de LRA, por resultar microangiopatia trombótica caracterizada pelos desfechos como microtrombos glomerulares, necrose cortical renal difusa e infarto renal. Outrossim, a desregulação da resposta imunológica frente ao SARS-CoV-2, também promove dano ao sistema renal, por criar um cenário de hiperinflamação que pode levar a uma lesão tubular renal (BIHORAC *et al.*, 2013; HUSAIN-SYED; SLUTSKY; RONCO, 2016).

Não apenas os sistemas cardiovascular e renal são afetados pela COVID-19, como também o sistema gastrointestinal. Isso em razão das células epiteliais do estômago e intestino, e dos cílios das células epiteliais glandulares do trato gastrointestinal, expressarem o receptor ECA-2 (GALANOPOULOS *et al.*, 2020; XIAO *et al.*, 2020). Desse modo, o SARS-CoV-2 pode causar sintomas digestivos por invasão viral direta em células-alvo, como por exemplo anorexia, diarreia, vômitos e dor abdominal (PAN, L *et al.*, 2020). Outro órgão deste sistema que é exposto ao SARS-CoV-2 é o fígado, pois as células da árvore biliar também expressam ECA-2 e, quando infectadas, suportam um modo retrógrado de dano hepático, sendo este caracterizado pela lesão aos hepatócitos (apoptose e necrose) e inflamação lobular (LEE; HUO; HUANG, 2020; ZHANG, C; SHI; WANG, 2020). Somado a isto, a inflamação sistêmica desenvolvida na COVID-19 pode causar ou exacerbar a lesão hepática (GU; HAN; WANG, 2020; ZHANG, C; SHI; WANG, 2020).

Atualmente, além das manifestações clínicas citadas, tem-se reportado sequelas pós-agudas da COVID-19, denominadas de “COVID longa”. Trata-se de uma condição multissistêmica, subsequente a uma infecção por SARS-CoV-2, que

frequentemente compreende a sintomas graves, como doenças cardiovasculares, trombóticas e cerebrovasculares, *diabetes mellitus* do tipo II, síndrome de fadiga crônica, entre outros (DAVIS *et al.*, 2021, 2023). Sua incidência é estimada entre 10 a 30% dos casos não hospitalizados, 50 a 70% dos casos hospitalizados e 10 a 12% dos casos vacinados (DAVIS *et al.*, 2023). Há no momento algumas hipóteses para a patogênese da COVID longa, incluindo reservatórios persistentes de SARS-CoV-2 em tecidos, desregulação imune, coagulação sanguínea microvascular com disfunção endotelial e desregulação da microbiota (DAVIS *et al.*, 2023).

2.2 Resposta Imunológica Antiviral

2.2.1 Resposta Imunológica Inata

A resposta imune inata consiste na primeira barreira de defesa contra microrganismos, sendo composta pelas superfícies epiteliais, moléculas solúveis e células residentes nos tecidos e no sangue (MEDZHITOV, R.; JANEWAY C., 2000). Este processo atua promovendo a manutenção físico-química dos epitélios do trato gastrointestinal e respiratório, impedindo a invasão de microrganismos, bem como o direcionamento e ativação de respostas imunológicas especializadas (BEUTLER, 2004; IWASAKI; MEDZHITOV, 2015; MEDZHITOV, R.; JANEWAY C., 2000). Ainda mais, possui como as principais reações deflagradas a promoção de inflamação e a defesa antiviral (NETEA *et al.*, 2017; THAISS *et al.*, 2016).

Para ativar tal resposta é necessário que seus componentes reconheçam produtos e moléculas de origem microbiana (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; MOGENSEN, 2009). Isso ocorre via receptores de reconhecimento padrão que são expressos no citosol, vesículas fagocíticas e superfícies de vários tipos celulares, e que ao interagirem com padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), ativam vias de transdução que modulam respostas pró-inflamatórias e antimicrobianas (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; MEDZHITOV, Ruslan; JANEWAY, 2000). A respeito dos vírus, os PAMPs que deflagram respostas imunes inatas são estruturas de ácidos nucléicos, como RNA de fita simples e fita dupla (ssRNA e dsRNA), e os receptores com os quais tais padrões interagem são os receptores do tipo *Toll* (TLRs), sensores de DNA citosólico (CDS) e receptores do tipo RIG (RLRs) (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; CARTY; GUY; BOWIE, 2021).

A cerca dos TLRs, estes são glicoproteínas integrais de membrana do tipo I, e entre os 9 TLRs funcionais existentes, os TLR3, TLR7 e TLR8, que são expressos principalmente em membranas endossômicas, atuam na detecção de ácidos nucleicos virais, sendo que o TLR3 interage com dsRNA e TLR7 e TLR8 com ssRNA (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; BOWIE; O'NEILL, 2000). Desse modo, ao ocorrer a interação receptor-PAMPs, as vias de sinalização de TLRs podem ativar principalmente o fator nuclear κ B (NF κ B) e os fatores reguladores de interferon 3 e 7 (IRF3 e IRF7) (BOWIE; O'NEILL, 2000; MORESCO; LAVINE; BEUTLER, 2011). Entretanto vale ressaltar que, com exceção do TLR3, todos os TLRs são capazes de ativar NF κ B (MORESCO; LAVINE; BEUTLER, 2011).

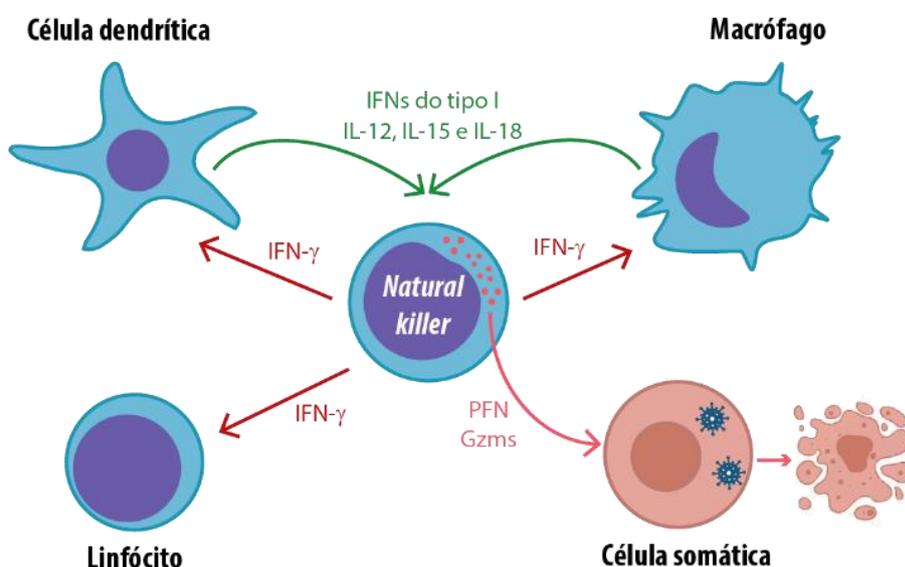
Logo que o NF κ B é ativado, estimula a expressão de genes codificadores de citocinas, quimiocinas, moléculas coestimuladoras e de adesão endotelial, sendo este, peça-chave na indução de resposta inflamatória (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009). Por sua vez, os IRF3 e IRF7 promovem a produção de interferons do tipo I (IFNs) – IFN- α e IFN- β – os quais são fundamentais em respostas inatas antivirais (IVASHKIV; DONLIN, 2013). Todavia, é importante ressaltar que estes fatores de transcrição também podem ser ativados via detecção de ácidos nucléicos no citosol por meio da ligação entre dsRNA e heterocomplexos de RNA-DNA virais aos RLRs e da ligação entre DNA de fita dupla (dsDNA) viral com CDS associados ao estimulador de genes de interferons (STING) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Além disso, há de considerar que tais receptores são expressos em diferentes células residentes teciduais e circulantes, incluindo células que são especializadas para resposta imune inata antiviral (KOYAMA *et al.*, 2008). Entre elas, há as células dendríticas plasmocitoides (pDCs), que produzem de maneira rápida e massiva IFNs do tipo I frente a infecções virais, devido à alta expressão de TLRs endossômicos e CDS (REIZIS, 2019; SWIECKI; COLONNA, 2015). Isto as confere uma dupla função crítica em respostas antivirais: (1) indução de efeito citoprotetor e ativação de células *natural killer* (NKs) (Figura 6); e (2) indução de respostas adaptativas (REIZIS, 2019; SWIECKI; COLONNA, 2015).

O efeito citoprotetor é resultado das ações biológicas que os IFNs do tipo I promovem, após interação com seus receptores na superfície de diversos grupos celulares (DE WEERD; SAMARAJIWA; HERTZOG, 2007; NEGISHI; TANIGUCHI; YANAI, 2018). Isto porque tal sinalização ativa a transcrição de vários genes que

conferem a célula mecanismos para inibição da expressão gênica, síntese proteica e montagem viral, assim como para a degradação do RNA viral, o que justifica o desfecho desta sinalização ser denominado “estado antiviral” (MCNAB et al., 2015).

Os IFNs e outras citocinas produzidos pelas pDCs (IL-12, IL-15 e IL-18), são fundamentais para ativação das células NK. As células NK pertencem ao grupo I de células linfoides inatas (ILCs) e durante a fase inicial das infecções virais, exercem as funções efetoras de lisar células infectadas (citotoxicidade) e produzir citocinas antivirais como o interferon gama (IFN- γ) (Figura 6) (CHIOSSONE *et al.*, 2018a; GRUDZIEN; RAPAK, 2018; WU, Yang; TIAN; WEI, 2017). Esta função citotóxica só é deflagrada após os receptores das células NK não reconhecerem os receptores do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) de classe I, que tem sua expressão silenciada pelos vírus, como mecanismo de evasão aos linfócitos T citotóxicos (KUMAR, Santosh, 2018). Em consequência, há a liberação de grânulos citolíticos contendo perforinas e granzimas, sendo as primeiras responsáveis por permeabilizar a membrana da célula-alvo, a fim de facilitar entrada das granzimas que ativam a via das caspases para indução de morte celular por apoptose (PRAGER; WATZL, 2019). Por sua vez, o IFN- γ derivado das células NK promove a depuração viral através de mecanismos não citolíticos diretos, como maturação e ativação de células dendríticas, macrófagos e polarização dos linfócitos T *naive* em T_{H1} (pró-inflamatórios) (KAK; RAZA; TIWARI, 2018; SCHRODER *et al.*, 2004). Além disso, o IFN- γ estimula mudança de linfócitos B para plasmócitos produtores de IgG capazes de neutralizar partículas virais (KAK; RAZA; TIWARI, 2018; SCHRODER *et al.*, 2004).

Figura 6 – Funções das células *natural killers*



Fonte: Tanabe (2023)

Legenda: IFN - Interferon; PFN - Perforina; Gzms – Granzimas.

O IFN- γ , portanto, atua como elo entre a imunidade inata e adaptativa, sendo que em infecções virais locais (em tecidos), a principal fonte inicial de IFN- γ vem das ILCs do tipo I (ILC1s) (HILDRETH; O’SULLIVAN, 2019; WEIZMAN *et al.*, 2017). Estas células, junto com as ILCs do tipo II e III, são as contrapartes inatas dos linfócitos T e atuam no início da resposta imune, reagindo prontamente a sinais ou citocinas indutores, expressos por células residentes no tecido (ARTIS; SPITS, 2015; VIVIER *et al.*, 2018). Desse modo, as ILC1 espelham aos linfócitos T auxiliares T_H1, reagindo a patógenos intracelulares e a tumores (ARTIS; SPITS, 2015; CHIOSSONE *et al.*, 2018b). Por sua vez, as ILC2 estão envolvidas na imunidade inata a parasitas e em doenças alérgicas, sendo sua expressão de citocinas análoga ao perfil T_H2 de resposta (ARTIS; SPITS, 2015; VIVIER *et al.*, 2018). Já as ILC3 são abundantes em mucosas e além de promoverem respostas imunológicas a fungos e bactérias extracelulares, deflagrando citocinas como as do perfil T_H17, elas desempenham um papel vital na manutenção da integridade e reparo epitelial (ARDAIN *et al.*, 2019; VIVIER *et al.*, 2018). Assim sendo, os mecanismos da imunidade inata são capazes de solucionar de maneira eficiente a invasão de patógenos. Contudo, o número ou

virulência destes invasores podem interferir na eficácia da resposta imune inata, o que desencadeia a ativação das células e mecanismos vinculados a imunidade adaptativa.

2.2.2 Resposta Imunológica Adaptativa

A imunidade adaptativa é caracterizada por ser mediada pelos linfócitos, existindo três populações principais: linfócitos B, linfócitos T auxiliares (T CD4⁺) e linfócitos T citotóxicos (T CD8⁺), os quais induzem a imunidade humoral e imunidade mediada por células, respectivamente (MCCOMB *et al.*, 2019). Além disso, a resposta imunológica adaptativa possui como propriedades principais: (1) especificidade, pois promove a expansão clonal de células específicas para determinado antígeno; (2) diversidade, que resulta da variabilidade dos receptores antigênicos dos linfócitos, permitindo-os reconhecer um grande número de antígenos; (3) memória, por promover respostas imunológicas secundárias mais rápidas, devido a produção de células de memória específicas para o antígeno; e (4) autotolerância, porque os linfócitos são responsivos apenas a antígenos estranhos (não próprios) (MCCOMB *et al.*, 2019).

Direcionando o foco para as infecções contra microrganismos, os dois tipos de resposta imunológica adaptativa atuam de formas distintas, mas complementares. A imunidade humoral, por exemplo, é mediada por anticorpos que reconhecem antígenos microbianos e que possuem a capacidade de neutralizar a infectividade destes patógenos e intermediar a eliminação dos mesmos via fagócitos e sistema complemento (LOUTEN, 2016; OGRA; MORAG; TIKU, 1975). Sendo assim, este mecanismo de defesa se torna o principal para eliminação de microrganismos e toxinas extracelulares. Por sua vez, a imunidade mediada por células atua frente aos microrganismos que alcançaram o ambiente intracelular, promovendo a destruição dos reservatórios tanto dentro dos fagócitos, quanto por indução a apoptose das células infectadas (MCCOMB *et al.*, 2019; TOMAR; DE, 2014).

A integração destes dois mecanismos de defesa pode ser reconhecida pelas fases atribuídas as respostas adaptativas, sendo estas o reconhecimento do antígeno, a ativação do linfócito, a eliminação do antígeno, a homeostasia e a produção de memória, consecutivamente. Dessa maneira, as células apresentadoras de antígenos (APCs) transportam os antígenos de patógenos até os órgãos linfoides, onde os

apresentam aos linfócitos T *naive*, induzindo-os à ativação e expansão clonal (KNIGHT; STAGG, 1993). Concomitantemente, o mesmo antígeno, mas em sua conformação nativa, é apresentado aos linfócitos B *naive* via linfócitos auxiliares ou APCs, induzindo sua ativação e proliferação, com posterior diferenciação em plasmócitos (células que secretam diferentes classes de anticorpos) (ISE; KUROSAKI, 2020). Por conseguinte, ocorrendo a erradicação da infecção, o estímulo para a ativação e proliferação dos linfócitos cessa e os níveis basais dos mesmos são restabelecidos. Contudo alguns se diferenciam em linfócitos T e B de memória, os quais conferem rapidez a resposta imunológica em um contato subsequente com o mesmo patógeno (PENNOCK *et al.*, 2013).

Na resposta imunológica mediada por células, a linhagem dos linfócitos T CD4⁺ efetoras é o elo entre o reconhecimento específico de microrganismos e o recrutamento e ativação de leucócitos especializados em destruí-los (LUCKHEERAM *et al.*, 2012; PENNOCK *et al.*, 2013). Contudo, os leucócitos a serem recrutados e ativados estão atrelados a subpopulação de linfócitos T CD4⁺, sendo as principais as células T_{H1}, T_{H2} e T_{H17}, que se distinguem por produzirem conjuntos de citocinas específicos conforme o fator de transcrição atribuído a cada subpopulação (LUCKHEERAM *et al.*, 2012). A subpopulação T_{H1} é induzida por patógenos que ativam as células dendríticas, macrófagos e células NK, o que resulta na liberação de IL-12 e IFN- γ e ativação dos fatores de transcrição *T-bet*, *STAT1* e *STAT4* característicos dessa subpopulação (AFKARIAN *et al.*, 2002; ROMAGNANI, 1999). Além disso, uma das funções das células T_{H1} é ativar macrófagos via produção de IFN- γ , refletindo em uma atividade microbicida aumentada (HAMIDZADEH *et al.*, 2017). Já a diferenciação em subpopulação T_{H2} ocorre em resposta a helmintos, alérgenos e danos teciduais, que ativam os fatores de transcrição *STAT6* e *GATA-3* (KAPLAN *et al.*, 1996; WALKER; MCKENZIE, 2017; ZHU, Jinfang *et al.*, 2006). Ainda, as células T_{H2} estimulam reações mediadas por IgE, mastócitos, eosinófilos e polarização de macrófagos para o perfil 2 por meio da produção de IL-4, IL-5 e IL-13 (LUCKHEERAM *et al.*, 2012; ROMAGNANI, 1999; WALKER; MCKENZIE, 2017). Por sua vez, a subpopulação T_{H17} se diferencia frente a respostas por bactérias e fungos, que induzem a ativação dos fatores de transcrição *ROR γ t* e *STAT3* (IVANOV *et al.*, 2006; QIN, Hongwei *et al.*, 2009). O resultado é a produção de IL-17 e IL-22 que atuam

no recrutamento de neutrófilo e manutenção da integridade de barreiras epiteliais, respectivamente (AUJLA *et al.*, 2008; KORN *et al.*, 2009).

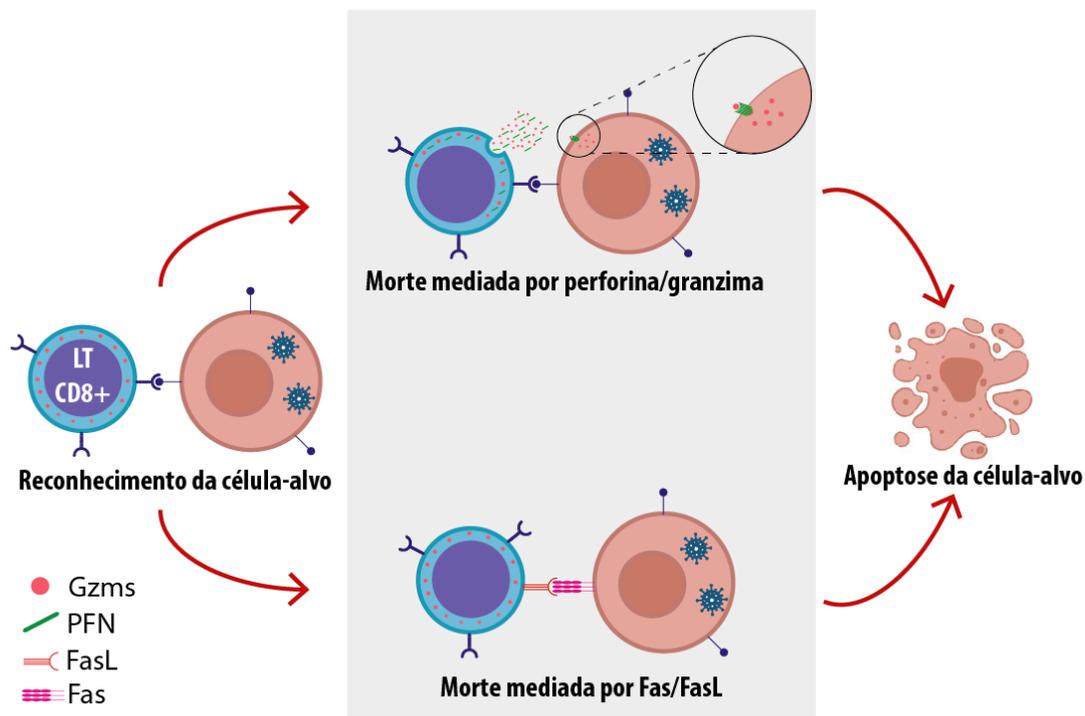
Somada as estas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ há também a subpopulação T_{reg} que desempenha um papel chave tanto na regulação da resposta inflamatória quanto na tolerância imunológica e homeostase, pois tem a capacidade de atuar desde a supressão imunológica até na proliferação e diferenciação de linfócitos T efetores (GÖSCHL; SCHEINECKER; BONELLI, 2019; YAMAGUCHI *et al.*, 2013). A subpopulação T_{H9}, por sua vez, é conhecida por fornecer imunidade antiparasitária e antitumoral, bem como exacerbar a resposta inflamatória de doenças como asma alérgica, artrite reumatoide e esclerose múltipla (LICONA-LIMÓN; ARIAS-ROJAS; OLGUÍN-MARTÍNEZ, 2016; NEURATH; KAPLAN, 2017; RIVERA VARGAS *et al.*, 2017). Já a subpopulação T_{H22} age principalmente sob as barreiras epiteliais da pele, intestino e trato respiratório modulando os processos inflamatórios e protegendo contra danos teciduais (EYERICH *et al.*, 2009; JIA; WU, 2014). Ainda há a subpopulação T_{fh} (linfócitos T auxiliares foliculares) a qual é especializada em fornecer linfócitos T CD4⁺ para os linfócitos B, tornando-se essencial para o desenvolvimento do centro germinativo, maturação de afinidade e desenvolvimento da grande parte dos anticorpos de alta afinidade e de linfócitos B de memória (CROTTY, 2014; SONG; CRAFT, 2019).

Além da aptidão de diferenciação em subpopulações, os linfócitos T CD4⁺ promovem a ativação de linfócitos T CD8⁺ tanto via secreção de citocinas, quanto via aumento da capacidade das APCs em estimularem a diferenciação de tais linfócitos (LUCKHEERAM *et al.*, 2012; ZHANG, Sheng; ZHANG; ZHAO, 2009). Tal diferenciação de linfócitos T CD8⁺ *naive* para linfócito T citotóxico (CTLs) é essencial para resolução de infecções onde o patógeno permanece no citosol da célula hospedeira, como em infecções virais, e a única alternativa de conter a disseminação deste, é a morte da célula infectada (BARRY; BLEACKLEY, 2002). Assim, os CTLs reconhecem o antígeno nas células-alvo – o mesmo que induziu sua diferenciação e proliferação – e desencadeiam a apoptose dessas células, por meio de seus grânulos citoplasmáticos ou interação entre receptores (Figura 7) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; BARRY; BLEACKLEY, 2002). Tais grânulos são os mesmos das células NK: perforina, granulicina, granzimas A, B e C. A perforina consiste em uma molécula

homóloga às proteínas C9 do sistema complemento, que polimeriza e forma poros aquosos na membrana da célula-alvo, a fim de facilitar a entrada das granzimas no citosol (LICHTENHELD *et al.*, 1988; VOSKOBOINIK; WHISSTOCK; TRAPANI, 2015). Outra proteína que atua modificando a permeabilidade da membrana, não só das células alvo, mas também microbianas é a granulicina (DOTIWALA; LIEBERMAN, 2019). Ainda, as granzimas são serinas proteases que ativam as caspases e conseqüentemente a morte celular (LORD *et al.*, 2003; MARTINVALET; ZHU; LIEBERMAN, 2005). Por sua vez, o *killing* independente de grânulos ocorre via interação do receptor Fas das células-alvo, com a proteína ligante de Fas (FasL) expressa pelos CTLs (MALARKANNAN, 2020; ROUVIER; LUCIANI; GOLSTEIN, 1993).

Algumas infecções virais, contudo, podem acarretar o fenômeno de exaustão dos linfócitos T CD8⁺, o que reflete em proliferação diminuída, redução da produção de IFN- γ e da atividade citotóxica (WHERRY; KURACHI, 2015). Isto se dá pela exposição antigênica persistente ou crônica, que desencadeia a expressão de receptores de inibição, sendo o mais conhecido a proteína de morte celular programada 1 (PD-1) (WHERRY; KURACHI, 2015). O PD-1 é uma proteína transmembranar do tipo I, a qual é transcrita por linfócitos T ativados, linfócitos B, células NK e algumas populações de células mieloides, desempenhando uma função importante na manutenção do equilíbrio da resposta imunológica (FREEMAN *et al.*, 2000; SHARPE; PAUKEN, 2017).

Figura 7 – Mecanismos de morte das células-alvo mediado por linfócitos T CD8⁺



Fonte: Adaptado de ABBAS; LICHTMAN; PILLAI (2015)

Legenda: Gzms – Granzimas; PFN – Perforina; FasL – ligante Fas.

Em vista disso, torna-se evidente a importância da resposta imunológica adaptativa na eliminação precisa e específica de patógenos, bem como os componentes celulares e proteicos que integram este contexto, além de compreender os mecanismos de evasão utilizados pelo SARS-CoV-2 e as consequências do sucesso viral.

2.2.3 Imunopatologia da COVID-19 aguda

A imunopatologia desencadeada pelo SARS-CoV-2 e que reflete em quadros clínicos críticos da COVID-19 baseia-se na desregulação das repostas imunes inatas e mediadas por células. A princípio, SARS-CoV-2 infecta as células epiteliais alveolares (pneumócitos do tipo I e II) e como mecanismo de evasão limita a resposta de IFNs (ANKA *et al.*, 2021; LI, Shaohua *et al.*, 2020; PALUDAN; MOGENSEN, 2022). Somado a isto, há a depleção de pDCs reduzindo a resposta

antiviral via eixo TLR7-pDC o que acarreta permissividade a replicação viral e esgotamento dos macrófagos alveolares (LAING *et al.*, 2020; PALUDAN; MOGENSEN, 2022).

Nos alvéolos pulmonares é encontrado então um ambiente hiperinflamatório, inerente ao cenário de morte celular e acúmulo de detritos, com macrófagos derivados de monócitos quimioatraídos e expressando várias quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, CCL4, CXCL10 e TNF- α (LI, Shufen *et al.*, 2020; LIAO *et al.*, 2020; WAUTERS *et al.*, 2021). A IL-8 induz o recrutamento de neutrófilos que, quando ativados, liberam armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) e espécies reativas de oxigênio (ROS), e consequentemente geram apoptose das células epiteliais alveolares e trombose (PALUDAN; MOGENSEN, 2022). Por sua vez a CXCL10 e CCL4 auxiliam no recrutamento de células NK, que adquirem um estado hiperativado e subsequente exibição de marcadores de exaustão e regulação negativa dos genes de citotoxicidade por meio dos altos níveis de IL-6 e IL-10 (MAUCOURANT *et al.*, 2020; PALUDAN; MOGENSEN, 2022; VAN EEDEN *et al.*, 2020). Ainda, as células NK apresentam atividade antifibrótica prejudicada em indivíduos com doença crítica (KRÄMER *et al.*, 2021; PALUDAN; MOGENSEN, 2022).

Em paralelo, os linfócitos T CD4⁺ *naive* se diferenciam em células T_{H1}, que tem atividade antiviral por meio da produção de IFN- γ , e em T_{fh} que auxiliam aos linfócitos B na produção de anticorpos neutralizantes (CHEN, Zeyu; JOHN WHERRY, 2020; SETTE; CROTTY, 2021). Ainda, há a diferenciação em células T_{H17} que fortalecem e ativam a resposta inflamatória dos neutrófilos (CHEN, Zeyu; JOHN WHERRY, 2020; SETTE; CROTTY, 2021). Adicionalmente, os linfócitos T CD4⁺ efetores contribuem para ativação/diferenciação CTLs e a presença destes no curso da infecção está associada a melhores prognósticos (PENG *et al.*, 2020; SETTE; CROTTY, 2021). Contudo, em quadros clínicos críticos da COVID-19 os CTLs expressam receptores de inibição, caracterizando um perfil de exaustão dos mecanismos de citotoxicidade antiviral (ZHENG, Hong Yi *et al.*, 2020; ZHENG, Meijuan *et al.*, 2020), sendo este cenário agravado pelo o quadro de linfopenia, mais persistente e seletivo para os linfócitos T, quando comparado a outras infecções virais do trato respiratório, afetando assim a quantidade de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, somado aos linfócitos B e NKs

(CHEN, Zeyu; JOHN WHERRY, 2020; GIAMARELLOS-BOURBOULIS *et al.*, 2020; KURI-CERVANTES *et al.*, 2020). Este quadro é um dos efeitos indiretos da tempestade de citocinas induzida pela hiperativação dos macrófagos, como mencionado previamente, bem como da própria hiperativação linfócitos T (CHEN; JOHN WHERRY, 2020; HE *et al.*, 2021).

Dessa forma, o desfecho do cenário supracitado consiste em dano alveolar difuso caracterizado por descamação das células alveolares, formação de membrana hialina e edema pulmonar, que diminuem a eficiência das trocas gasosas e promovem um quadro de insuficiência respiratória (GUSTINE; JONES, 2021; PALUDAN; MOGENSEN, 2022; PUROHIT *et al.*, 2021; XU, Zhe *et al.*, 2020^a), o qual ainda é gravado pela formação de microtrombos e fibrose pulmonar oriundas do ambiente hiperinflamatório provocado pela infecção do SARS-CoV-2 (ACKERMANN *et al.*, 2020; GUSTINE; JONES, 2021).

2.3 Grânulos e receptores indutores de *killing*

2.3.1 Granzima A

A granzima A (GzmA) consiste em uma protease, com atividade semelhante a triptase, sendo a granzima K seu homólogo mais próximo entre as granzimas (BOVENSCHEN *et al.*, 2009). Além disso, ela é capaz de ativar vias de morte celular independentes de caspase, como por exemplo, a clivagem da proteína mitocondrial NDUFS3 (NADH desidrogenase [ubiquinona] proteína ferro-enxofre 3), a qual promove a geração ROS (espécies reativas de oxigênio), interrompe o potencial mitocondrial e aciona um complexo de estresse oxidativo associado ao retículo endoplasmático, denominado SET, o qual promove dano nuclear na célula (MARTINVALET *et al.*, 2008; MARTINVALET; ZHU; LIEBERMAN, 2005). Outros substratos da GzmA estão localizados no retículo endoplasmático e no núcleo celular (LIEBERMAN, 2010). Todavia, é interessante mencionar que apesar da correlação entre GzmA e morte celular ser a mais referenciada, seu primeiro substrato identificado foi a pró-interleucina-1 β sugerindo um papel importante na inflamação (IRMLER *et al.*, 1995). Adicionalmente, além das células NK e CTL, células dendríticas, mastócitos e macrófagos podem expressar GzmA, mas não perforina, o

que infere uma função extracelular desta protease (VAN DAALEN; REIJNEVELD; BOVENSCHEN, 2020).

Até o momento foram descritos nove substratos extracelulares para a GzmA e o impacto biológico resultante de sua interação com esses (VAN DAALEN; REIJNEVELD; BOVENSCHEN, 2020). Entre estes, é possível listar três que reforçam o papel de modulação da inflamação por este grânulo: (1) colágeno IV e (2) fibronectina, que catalisados promovem redução da adesão de células epiteliais com a membrana basal celular, além de influenciar na migração celular; e (3) um provável receptor de membrana celular, que ao interagir com a GzmA induz a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8 e TNF- α) por fibroblastos, células epiteliais, monócitos e macrófagos (HIRAYASU *et al.*, 2008; SOWER *et al.*, 1996; VAN DAALEN; REIJNEVELD; BOVENSCHEN, 2020). Os demais substratos são proteoglicanos de membrana basal, proteína básica de mielina, ativador de plasminogênio pró-uroquinase, receptor tipo trombina em neuritos, receptor plaquetário de trombina e receptor ativado por proteinase 2 (PAR-2) (VAN DAALEN; REIJNEVELD; BOVENSCHEN, 2020).

2.3.2 Granzima B

A granzima B (GzmB) é uma serina protease tradicionalmente conhecida por seu papel pró-apoptótico dependente de perforina, por meio da ativação de caspases e correlacionada com a atividade citotóxica das células NK e CTLs (LIEBERMAN, 2003; LORD *et al.*, 2003). Contudo, recentemente foi demonstrado que outras células imunes e não imunes, expressam e secretam GzmB, sendo elas: subpopulações de linfócitos T CD4⁺, monócitos, macrófagos, células dendríticas, mastócitos, basófilos, células musculares lisas, pneumócitos, queratinócitos e condrócitos (BOIVIN *et al.*, 2009; VELOTTI *et al.*, 2020^a).

Esta serina também possui função extracelular (independente de perforina), vinculada a substratos como componentes da matriz extracelular (MEC), citocinas, receptores celulares, proteínas angiogênicas e de coagulação (HIEBERT; GRANVILLE, 2012; VELOTTI *et al.*, 2020^a). Contudo, é importante pontuar que a degradação de substratos vinculados a MEC também promove morte celular, mas independente de perforina, denominada a morte ocorre por *anoikis* (morte celular

dependente da perda de ancoragem) (FRISCH; FRANCIS, 1994). Este tipo de morte celular, em condições não patológicas, atua na prevenção da translocação e fixação celular inadequada durante o processo de renovação tecidual (TADDEI *et al.*, 2012). Assim, é possível encontrar situações em que a GzmB esteja associada a processos de injúria e degradação tecidual, bem como fibrose. Por exemplo, processos inflamatórios onde a GzmB extracelular promove a remodelação anormal da MEC via degradação de proteínas como laminina, fibronectina, vitronectina, e de proteoglicanos como biglicam e decorim, reduzindo a integridade tecidual e aumentando a susceptibilidade de danos (BUZZA *et al.*, 2005; HIEBERT; GRANVILLE, 2012). Tais componentes auxiliam na fixação celular, ancoragem de receptores e armazenamento de fatores de crescimento, regulando a sobrevivência, diferenciação, proliferação e migração celular. Portanto, a remodelação anormal da MEC pode resultar em apoptose por *anoikis* e alterações na diferenciação, proliferação e migração celular (HIEBERT; GRANVILLE, 2012; VELOTTI *et al.*, 2020).

A degradação de proteoglicanos pela GzmB pode também promover a produção desordenada de colágeno e a liberação de fator transformador de crescimento (TGF)- β , induzindo a fibrose (HIEBERT; GRANVILLE, 2012; MENG; NIKOLIC-PATERSON; LAN, 2016). Este estado pro-fibrótico pode ainda ser potencializado pelas citocinas IL-1 α e IL-18, que apresentam suas formas ativas pós-conversão pela GzmB (BORTHWICK, 2016; VELOTTI *et al.*, 2020). Dessa maneira, é evidente que a GzmB regula uma ampla gama de processos biológicos, os quais desempenham um papel no surgimento, progressão e/ou gravidade de doenças inflamatórias.

2.3.3 Perforina

A perforina (PFN) consiste em uma glicoproteína composta por quatro domínios, onde dois deles apresentam regiões análogas as das proteínas do sistema complemento, compondo um domínio hidrofóbico com capacidade de incorporar na membrana lipídica da célula alvo (LICHTENHELD *et al.*, 1988; OSIŃSKA; POPKO; DEMKOW, 2014). Ao ser polimerizada, a perforina forma canais cilíndricos hidrofóbicos, os quais permitem o transporte livre, não seletivo e passivo de íons, água, pequenas moléculas e enzimas (LIU, Chau-Ching; YOUNG; YOUNG, 1996).

Este processo de incorporação e polimerização da PFN na membrana lipídica da célula alvo requer íons de cálcio (Ca^{2+}), pois tais íons são responsáveis por transformar a forma globular inativa da perforina na forma ativa, a qual apresenta capacidade de incorporação à membrana (LICHTENHELD *et al.*, 1988). Além disso, outros fatores como temperatura, pH, fator de ativação de plaquetas (PAF) interferem em ambos os processos supracitados, como por exemplo, a inibição de polimerização da perforina diante de pH baixo e elevada concentração de Ca^{2+} (OSÍNSKA; POPKO; DEMKOW, 2014).

Uma vez que a PFN desempenha este papel, essa torna-se um peça-chave na atividade citotóxica das células NK e CTLs, sendo estas células sua principal fonte (VOSKOBOINIK *et al.*, 2010). Contudo, linfócitos T CD4^+ em cenários onde a citotoxicidade clássica está comprometida, também expressam pequena quantidade de perforina (WILLIAMS; ENGELHARD, 1997). Ainda, falha na secreção de PFN funcional desencadeia uma gama de distúrbios humanos, denominados de perforinopatias, as quais englobam a linfocitose hemofagocítica familiar (FHL) e linfocitose hemofagocítica (HLH) secundária, infecções virais prolongadas e suscetibilidade a malignidades hematológicas (BRENNAN *et al.*, 2010; DE SAINT BASILE; MÉNASCHÉ; FISCHER, 2010; JANKA, 2012; VOSKOBOINIK; WHISSTOCK; TRAPANI, 2015). Assim, no caso de deficiência de perforina frente a uma infecção viral, a resposta antiviral citotóxica será ineficaz e resultará em altos títulos de vírus, somado a produção constante de citocinas pró-inflamatórias (OSÍNSKA; POPKO; DEMKOW, 2014; WILLIAMS; ENGELHARD, 1997). Isso demonstra a importância dessa molécula na efetividade da resposta imune, bem como seu envolvimento na patogênese de algumas doenças.

2.3.4 Granulísina

A granulísina (GNLY) pertence à família de proteínas semelhantes a saposina, que se ligam às membranas lipídicas, e tem sua expressão induzida principalmente pelas citocinas IL-2, IL15 e IL-21, bem como em respostas imunes a exposição a bactérias e a outros microrganismos (CANADAY *et al.*, 2001; DOTIWALA; LIEBERMAN, 2019). A expressão de GNLY ocorre comumente nos CTLs e nas células NK, principalmente em células NK da pele e uterinas ao longo do primeiro

trimestre de gestação (CHUNG *et al.*, 2008; SPARROW; BODMAN-SMITH, 2020; VELJKOVIC VUJAKLIJA *et al.*, 2013).

Assim como a perforina, a GNLY tem a função de alterar a permeabilidade de membranas celulares por meio da formação de poros, contudo o colesterol, que é abundante em membranas plasmáticas eucarióticas, inibe os processos de incorporação e polimerização dessa (BARMAN *et al.*, 2006; THIERY *et al.*, 2011). Somado a isto, um dos fosfolípidios que a GNLY interage para dar seguimento a formação de poros é a cardiolipina, que é encontrado apenas em membranas plasmáticas de microrganismos (bactérias e fungos) e parasitas, e em membranas mitocondriais (LIU, Xing *et al.*, 2016; SCHLAME, 2008). Desse modo, é possível compreender o motivo da GNLY preferencialmente promover a formação de poros em células bacterianas e a PFN em membranas de células do hospedeiro. No entanto, em altas concentrações a GNLY tem atividade sobre outros tipos de membrana, tornando-se citotóxica a organelas de células de mamíferos, como por exemplo mitocôndrias, complexo Golgiense, retículo endoplasmático e lisossomos, uma vez que as membranas mitocondriais se assemelham a membranas bacterianas e as demais organelas apresentam baixo teor de colesterol (DOTIWALA; LIEBERMAN, 2019; SCHLAME, 2008).

Embora a função da GNLY como molécula antimicrobiana foi a mais amplamente estudada (KRENSKY; CLAYBERGER, 2009), os níveis séricos desta proteína já foram consolidados como biomarcadores para rejeição de transplantes e resistência a esteroides em humanos, também sendo associados com o desenvolvimento de pré-eclâmpsia (SARWAL *et al.*, 2001; VELJKOVIC VUJAKLIJA *et al.*, 2012).

2.3.5 Fas solúvel (sFas) e ligante Fas solúvel (sFasL)

O receptor transmembranar Fas consiste em um receptor de morte celular, o qual pertence a superfamília do receptor de TNF, e por meio da interação com o seu ligante (FasL) desencadeia uma via de transdução de sinal que leva a apoptose via caspases (NAGATA, 2003). Esta molécula foi encontrada a primeira vez em soros de pacientes com leucemia linfocítica e linfoma de células NKs (TANAKA *et al.*, 1996), e após isto, níveis elevados de sFasL foram associados a doenças, como artrite

reumatoide, insuficiência cardíaca crônica e quadros de infecção por HIV e sepse, assim como seus níveis reduzidos, à pancreatite e insuficiência hepática (LINKERMANN *et al.*, 2005). O Fas é expresso por várias células, especialmente linfócitos T e B periféricos, células NK, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, enquanto a expressão de FasL é limitada a células do sistema imunológico, como linfócitos T ativados, células NKs e APCs (CHAI *et al.*, 2008; WANG; SU, 2018).

Como previamente mencionado, a interação entre Fas com FasL consiste em parte da maquinaria efetora dos CTLs e das células NKs para a vigilância e depuração de células infectadas ou transformadas por infecções vírus, via morte independente de grânulos (ROUVIER; LUCIANI; GOLSTEIN, 1993). Adicionalmente, a interação entre tal receptor e seu ligante mantém a homeostase dos linfócitos T periféricos, por promover equilíbrio entre a proliferação e morte celular (YAMADA *et al.*, 2017). Isto porque estas moléculas compõe o mecanismo de morte celular induzida por ativação (AICD), que ocorre ao final de uma resposta imunológica com o objetivo de retomar os níveis basais de linfócitos T periféricos (LINKERMANN *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2020b).

Outro ponto importante tanto Fas quanto o FasL apresentam duas formas, uma transmembrana e a outra solúvel, e que podem desempenhar papéis distintos (TANAKA *et al.*, 1995; WANG; FAZ, 2018). O Fas de membrana (mFas) é a forma mais expressa e a interação com seus ligantes resulta em uma indução rápida de apoptose, o que difere para o Fas solúvel (sFas), pois este não interage com o FasL, mas inibe a apoptose induzida por mFas (WANG, Mei; SU, 2018). Além desse cenário, a forma solúvel do Fas ligante (sFasL) é menos capaz de induzir a apoptose, quando comparado a forma ligada a membrana (mFasL) (SUDA *et al.*, 1997). Ainda, o sFaL pode atuar como um quimioatraente para neutrófilos em humanos e ao interagir com Fas, induz a proliferação celular (DALLEGRI *et al.*, 1999; YAMADA *et al.*, 2017). Desse modo, fica evidente a versatilidade dessas proteínas, principalmente quando apresentadas em sua forma solúvel frente a processos inflamatórios e respostas imunológicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Investigar o valor prognóstico de alterações plasmáticas e celulares correlacionadas com a resposta imunológica.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os níveis plasmáticos de sFas, sFasL, granzima A, granzima B, perforina e granulicina;
- Quantificar as subpopulações de células linfoides;
- Investigar os espectros Raman dos pacientes em busca de sinais que indiquem um perfil bioquímico e imunológico em resposta a infecção por SARS-CoV-2.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPh) da Universidade Federal de Alagoas, sob protocolo nº 30732120.1.0000.5013, assim como pelo 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), salvo nos casos em que os indivíduos estavam hospitalizados e o consentimento teve que ser obtido de familiar ou responsável legal, através de ligação telefônica e envio do TCLE via aplicativo de mensagens (WhatsApp) para a sua assinatura eletrônica, seguindo assim os protocolos de biossegurança estabelecidos pelo CEPh a época.

4.2 Amostras

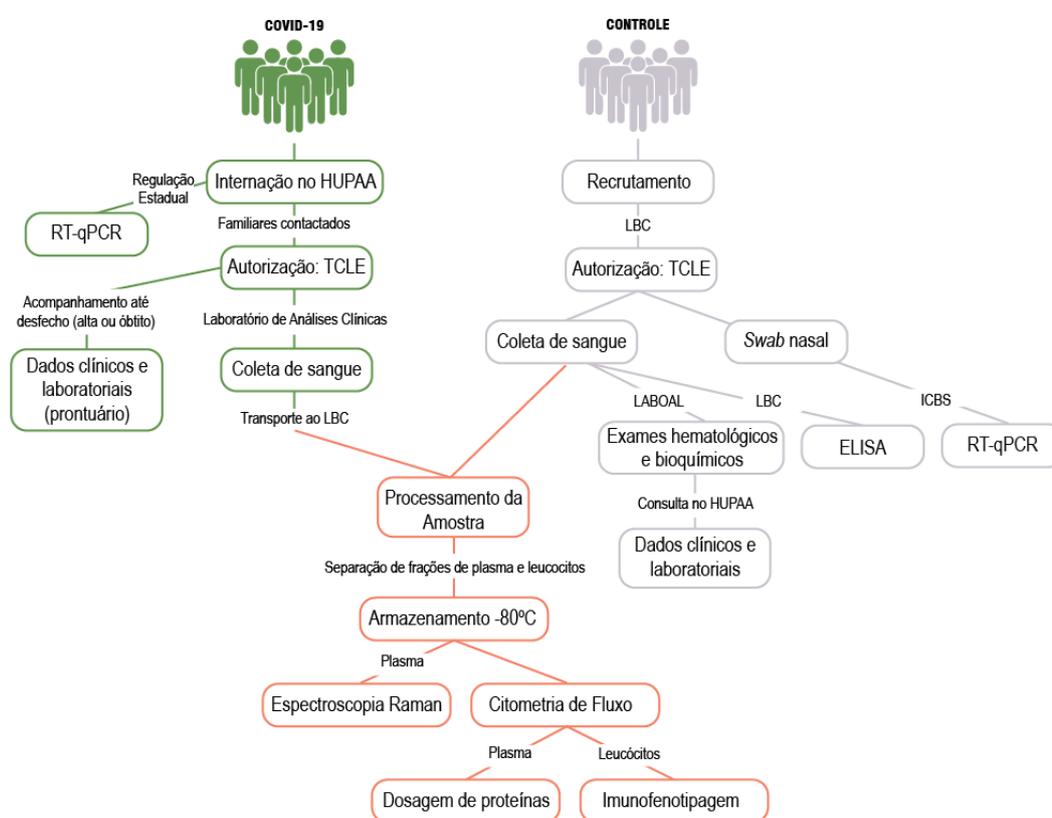
O presente trabalho consiste em estudo observacional, de amostra não probabilística por conveniência, composto por voluntários provenientes do HUPAA-UFAL (grupo COVID-19) e de indivíduos saudáveis (grupo controle). Os voluntários do grupo COVID-19 receberam o diagnóstico previamente ou no momento de internação no HUPAA-UFAL e foram acompanhados até seus desfechos clínicos, de óbito ou alta hospitalar. Já os voluntários do grupo controle realizaram RT-qPCR por meio de parceria com o Prof. Marcelo Duzzioni do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da UFAL, utilizando o kit BIOMOL OneStep/COVID-19 (*IBMP-Brasil*), além de ELISA para detecção dos anticorpos IgA e IgG para SARS-CoV-2 (*EUROIMMUN-Alemanha*; Lot:E200514AS e E200513AG). O grupo controle foi composto por participantes que apresentaram idade, gênero e comorbidades prévias similares aos do grupo COVID-19. O fluxo de trabalho segue sintetizado na figura 8.

4.2 Critérios de inclusão e exclusão no estudo

4.2.1 Critérios de inclusão

Para o grupo COVID-19 foram incluídos no estudo pacientes que deram entrada no HUPAA-UFAL, tanto na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) quanto na Enfermaria, ambas exclusivas para casos de COVID-19, no período de 20 de maio a 04 de agosto de 2020, e que apresentaram testes moleculares positivos para SARS-CoV-2 e sintomatologia clínica para COVID-19. Para o grupo controle, incluiu-se 19 indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 30 e 90 anos, com comorbidades como hipertensão arterial sistêmica e diabetes melito II. Esses participantes também precisaram apresentar ausência de detecção de RNA viral e de anticorpos para SARS-CoV-2.

Figura 8 – Fluxograma de trabalho para obtenção de amostras, dados e análises dos voluntários do estudo



Legenda: HUPAA - Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes; TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; LBC – Laboratório de Biologia Celular; ICBS – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde.

4.2.2 Critérios de exclusão

No grupo COVID-19 foram excluídos os participantes sem confirmação por RT-qPCR. Por sua vez, do grupo controle, foram excluídos aqueles que relataram sintomas gripais (febre, tosse, cefaleia e dispneia) nos 30 dias que antecederam a coleta e no dia da coleta, ou que na amostra coletada tenha sido detectado o genoma viral e/ou anticorpos para SARS-CoV-2. Somado a isto, excluiu-se participantes que possuíam doenças prévias que não as listadas nos critérios de inclusão.

4.3 Coleta de sangue

Todos os indivíduos participantes da pesquisa tiveram cerca de 4mL de sangue total coletados e armazenados em tubos com EDTA, para posterior processamento e separação de plasma e leucócitos, como descrito a seguir. Ressalta-se que as coletas de sangue do grupo COVID-19 foram realizadas pelos técnicos do Laboratório de Análises Clínicas do HUPAA-UFAL, e as do grupo controle foram realizadas por uma enfermeira do nosso grupo de pesquisa, no Laboratório de Biologia Celular (LBC/UFAL), seguindo os protocolos de biossegurança e respeitando as medidas de precaução e prevenção postas pelo Ministério da Saúde na época. Ainda, dos indivíduos do grupo controle foram coletados mais 4 mL de sangue total para a realização de exames hematológicos e bioquímicos pelo Laboratório de Diagnóstico de Alagoas – LABOAL, por este possuir os mesmos equipamentos que o Laboratório de Análises Clínicas do HUPAA-UFAL, sendo o Arquiteto, c8000, (Abbott, Illinois, EUA) para os testes bioquímicos e o Cell-Dyn Ruby, Abbott (Illinois, EUA) para os hematológicos.

4.4 Processamento e armazenamento das amostras

Após a obtenção de sangue total dos indivíduos se processou o material no LBC/UFAL, iniciando com a separação das frações sanguíneas (plasma, leucócitos/plaquetas, hemácias) através de centrifugação a 1000 g por 30 minutos, e finalizando com a separação de alíquotas de plasma e da fração de leucócitos/plasma para armazenamento a -80 °C. O volume de 62,5 µl de plasma foi separado e destinado para análise via Kit LEGENDplex™ Human CD8/NK Panel (13 plex, BioLegend, Reino Unido), assim como outra alíquota de mesmo volume foi separada

e destinada para as medidas do espectro Raman. Por outro lado, a fração de leucócitos/plaquetas foi coletada, fixada em paraformaldeído 4% e homogeneizada com solução de congelamento (dimetilsulfóxido - DMSO + 20% de soro fetal bovino - SBF) para posterior imunofenotipagem.

4.5 Dados clínicos e laboratoriais

As informações clínicas e resultados de exames laboratoriais do grupo COVID-19 foram obtidos via análise dos prontuários eletrônicos, enquanto do grupo controle, por meio de consulta com médico no HUPAA/UFAL e avaliação dos exames realizados no LABOAL. Neste estudo as variáveis analisadas foram: idade, sexo, presença de comorbidades (diabetes *mellitus* tipo II, hipertensão arterial sistêmica, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença renal crônica, obesidade, asma, doenças autoimunes, doença hepática e câncer); sintomas apresentados, duração dos sintomas após admissão; desfecho (óbito ou alta hospitalar); internação de UTI ou enfermaria e a pontuação qSOFA, que abrange o intervalo de 0 (normal) a 4 (maior grau de anormalidade) (VINCENT *et al.*, 1996), utilizada pela equipe médica do HUPAA-UFAL com o intuito de descrever quantitativa e objetivamente o grau de disfunção ou falência de órgãos ao longo do tempo em pacientes. Além disso, foram analisadas informações sobre testes laboratoriais para avaliação de: hemácia, hematócrito, hemoglobina, plaquetas, leucócitos totais e individuais, ferritina, creatinofosfoquinase (CPK), proteína c reativa (PCR), creatinina, ureia, glicose e triglicerídeos.

4.6 Dosagem de marcadores citotóxicos

As alíquotas de plasma foram descongeladas para quantificação de marcadores de citotoxicidade por citometria de fluxo, utilizando o Kit LEGENDplex™ *Huma- CD8/NK Panel* (13 plex - Cat. 740267, Lot B314528, BioLegend). Por meio deste foram quantificadas as proteínas sFas, sFasL, granzima A, granzima B, perforina e granulicina, conforme instruções do fabricante e os dados das aquisições foram analisados e convertidos em pg/mL através do programa Legendplex versão 8.0 (Biolegend).

4.7 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

As frações de leucócitos/plaquetas de alguns pacientes foram descongeladas e submetidas a um protocolo de descoagulação e lise de hemácias, respeitando esta ordem cronológica. Para a descoagulação foi utilizada a solução de tampão de citrato de sódio (0,21 g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$; 100mL de água destilada; pH 6,0), na proporção de 1:10 e incubação a 37°C por 40min. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 5min a 4°C e tiveram o sobrenadante descartado para dar seguimento a próxima etapa, a lise das hemácias. Para tal foi empregada uma solução de lise 1X contendo cloreto de amônio (solução a 10X: 9g de NH_4Cl (0,155M); 1g de KHCO_3 (0,01M); 37mg de EDTA (0,1mM); 100mL de água destilada) na proporção de 1:10 e incubação de 10min em temperatura ambiente. Findado o tempo de incubação as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 5min a 4°C, e ressuspensas em PBS-BSA 0,5% com 0,02% azida sódica.

Em seguida, 2×10^5 de células foram marcadas com os anticorpos listados a seguir (Tabela 1). Para isto, as células foram incubadas por 20 min a 4°C com cada anticorpo e em seguida lavadas com PBS-BSA 0,5% com 0,02% azida sódica e fixada com BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biociências). Por conseguinte, as células foram lavadas com BD Perm/Wash™ (BD Biosciences), centrifugadas e ressuspensas em PBS-BSA 0,5% com 0,02% de azida sódica para medições no FACS Canto II®, utilizando o software FACS Diva. O *Gating*, bem como a análise dos dados foram realizados com o auxílio do software FlowJo® X (BD Biociências).

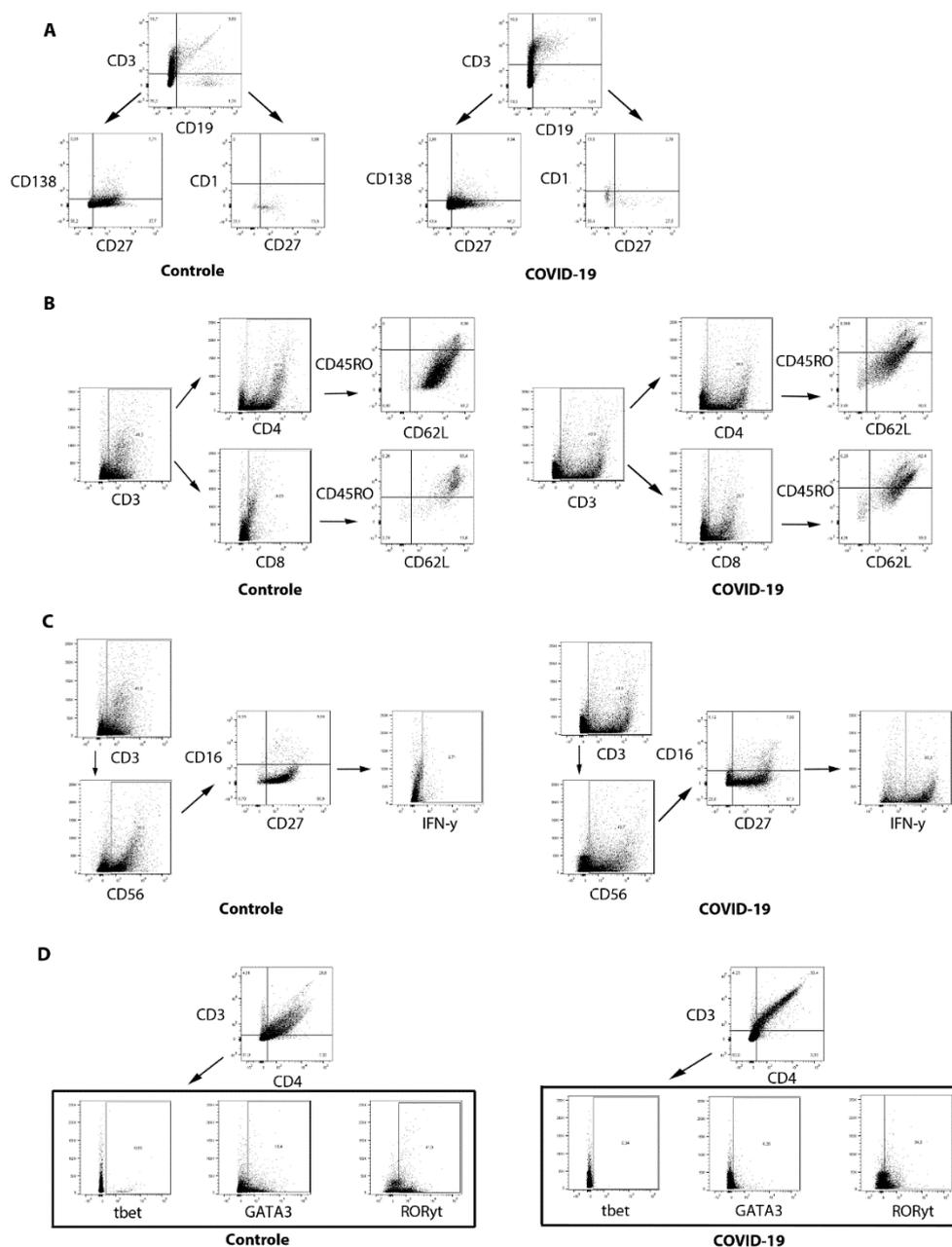
Tabela 1 – Anticorpos usados para imunofenotipagem

Anticorpo	Isotipo	Clone	Catálogo, Fabricante
Anti-CD3-FITC	Mouse IgG1, k	UCHT1	300406, Biolegend
Anti-CD4-PERCPCy5.5	Mouse IgG2b, k	OKT4	317428, Biolegend
Anti-CD8-FITC	Mouse IgG1, k	RPA-T8	555366, BD Biosciences
Anti-CD16-PE	Mouse IgG1, k	B73.1	561313, BD Biosciences
Anti-CD19-PE	Mouse IgG1, k	HIB19	302208, Biolegend
Anti-CD27-PECy7	Mouse IgG1, k	M-T271	560609, BD Biosciences

Anti-CD45RO-APC	Mouse IgG2a, k	UCHL1	559865, BD Biosciences
Anti-CD56-APC	Mouse IgG1, k	HCD56	318310, Biolegend
Anti-CD62L-PECy7	Mouse IgG1, k	DREG-56	304822, Biolegend
Anti-CD138-APC	Mouse IgG1, k	MI15	347193, BD Biosciences
Anti-Tbet-PE	Mouse IgG1, k	O4-46	561268, BD Biosciences
Anti-RORγt-APC	Mouse IgG2b, k	Q21-559	563620, BD Biosciences
Anti-GATA3-PECy7	Mouse IgG1, k	L50-823	560405, BD Biosciences
Anti-IFN-γ-AF488	Rabbit IgG	D3H2	12942S, Cell Signaling

Desse modo, foram avaliadas as frequências das seguintes populações celulares: CD3⁻ CD19⁻ CD138⁺ CD27⁺⁺, CD3⁻ CD19⁺ CD138⁻ CD27⁺, CD3⁻ CD19⁺ CD138⁻ CD27⁻, CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD62L⁺, CD4⁻ CD8⁺ CD45RO⁻ CD62L⁺, CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁺ CD62L⁺, CD4⁻ CD8⁺ CD45RO⁺ CD62L⁺, CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁺ CD62L⁻, CD4⁻ CD8⁺ CD45RO⁺ CD62L⁻, CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD62L⁻, CD4⁻ CD8⁺ CD45RO⁻ CD62L⁻, CD3⁻ CD56^{bright} CD16⁻ CD27⁺ IFN- γ ⁺, CD3⁻ CD56^{dim} CD16⁺ CD27⁻ IFN- γ ⁻, CD3⁻ CD4⁻ Tbet⁺, CD3⁻ CD4⁻ GATA3⁺, CD3⁻ CD4⁻ ROR γ t⁺, CD3⁺ CD4⁺ Tbet⁺, CD3⁺ CD4⁺ GATA3⁺ e CD3⁺ CD4⁺ ROR γ t⁺. A estratégia de *gates* segue sendo representada na figura 9, realizada de acordo com a literatura (GRACILIANO *et al.*, 2022).

Figura 9 – Estratégia de *gates* e gráficos de pontos representativos de dados de citometria de fluxo de duas amostras



Legenda: (A) Células CD3⁻ CD19⁻ e CD3⁻ CD19⁺ foram isoladas para análise de CD138 e CD27. (B) As células CD3⁺ foram posteriormente avaliadas para CD4 ou CD8. As células CD3⁺ CD4⁺ e CD3⁺ CD8⁺ foram isoladas para análise de CD45RO e CD62L. (C) As células CD3 foram avaliadas para CD56. Ambos CD56^{bright} e CD56^{dim} foram posteriormente analisados para a expressão de CD16 e CD27. Células CD3⁻ CD56^{bright} CD16⁻ CD27⁺ foram avaliadas para análise de IFN- γ . (D) CD3⁺ CD4⁺ e CD3⁻ CD4⁻ foram avaliados para Tbet, GATA3 e ROR γ t.

4.7 Medidas e análise de dados do espectro Raman

A espectroscopia Raman consiste em uma técnica que utiliza luz monocromática, muitas vezes na faixa do infravermelho próximo (NIR), visível ou ultravioleta (UV), para explorar os fenômenos de dispersão inelástica, ou efeito Raman, que descreve a excitação de fótons devido à interação da luz com modos vibracionais associados a ligações químicas dentro de uma amostra (BUTLER *et al.*, 2016). Normalmente, as regiões significativas do espectro Raman que são observadas em espécimes biológicos estão dentro de 400 – 2000 cm^{-1} números de onda, associados a vibrações de ligação de proteínas, carboidratos, grupos fosfato do DNA e biomoléculas celulares adicionais (BUTLER *et al.*, 2016).

Os espectros Raman foram medidos usando um espectrômetro XploRA (Horiba, Japão) acoplado a um microscópio óptico (BXFM, Olympus, Japão) e equipado com um laser de 532 nm através de uma objetiva de 100 \times (NA = 0,9). A mesma lente objetiva foi usada para coletar a luz espalhada Raman após interação com a amostra, em uma geometria de retroespalhamento. A calibração da frequência foi feita usando a banda vibracional de 520 cm^{-1} de uma pastilha de silício. Sob as mesmas condições, cinco diferentes aquisições de cada amostra foram medidas na faixa espectral de 600–1800 cm^{-1} . A fim de minimizar o aquecimento induzido pelo laser das amostras, foi utilizada uma irradiação de baixa potência na superfície da amostra, em torno de 5 mW, durante um curto tempo de exposição (3 s de exposição ao laser para 5 acumulações). A rede de difração utilizada tinha 1200 linhas/mm, o que rendeu uma resolução espectral de 1,5 cm^{-1} .

Antes de realizar a análise espectral, todos os espectros foram suavizados, ajustados em segundo plano e normalizados usando um algoritmo implementado no software MatLab (Mathworks, Naticks, MA, EUA). Após a remoção do fundo de fluorescência dos espectros, a Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada para avaliar a variabilidade espectral no conjunto de dados. Cada grupo de células foi submetido a 3D-PCA. Esta análise multivariada foi implementada no software MatLab.

4.9 Análises estatísticas

Os dados do presente estudo não foram submetidos a testes preliminares de normalidade, como preconizado por Rochon, Gondan e Kieser (2012). A fim de caracterizar as amostras foi utilizada a estatística descritiva por medianas/interquartil ou média/desvio padrão para variáveis quantitativas e por porcentagem para as variáveis categóricas.

Por sua vez, para as comparações dos níveis das proteínas envolvidas na resposta citotóxica entre grupos COVID-19 e controle, e entre subgrupos do grupo COVID-19 foram utilizados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis com pós teste de comparações múltiplas de Dunn, quando comparados dois grupos e acima de dois grupos, respectivamente. O teste de Mann-Whitney também foi utilizado para comparar os picos espectrais e frequências das subpopulações de linfócitos correspondentes ao grupo controle e COVID-19. O teste de ANOVA bifatorial com pós teste de comparações múltiplas de Sidak para avaliar fontes de variação. Já para as correlações entre parâmetros laboratoriais e com os níveis das proteínas envolvidas na resposta citotóxica foi utilizado o teste de Spearman. Por fim, todos os dados acima foram analisados usando Graph Pad Prism 8 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, EUA), considerando o intervalo de confiança de 95% e resultado estatístico significativo quando o valor de p foi igual ou menor que 0,05 ($p < 0,05$).

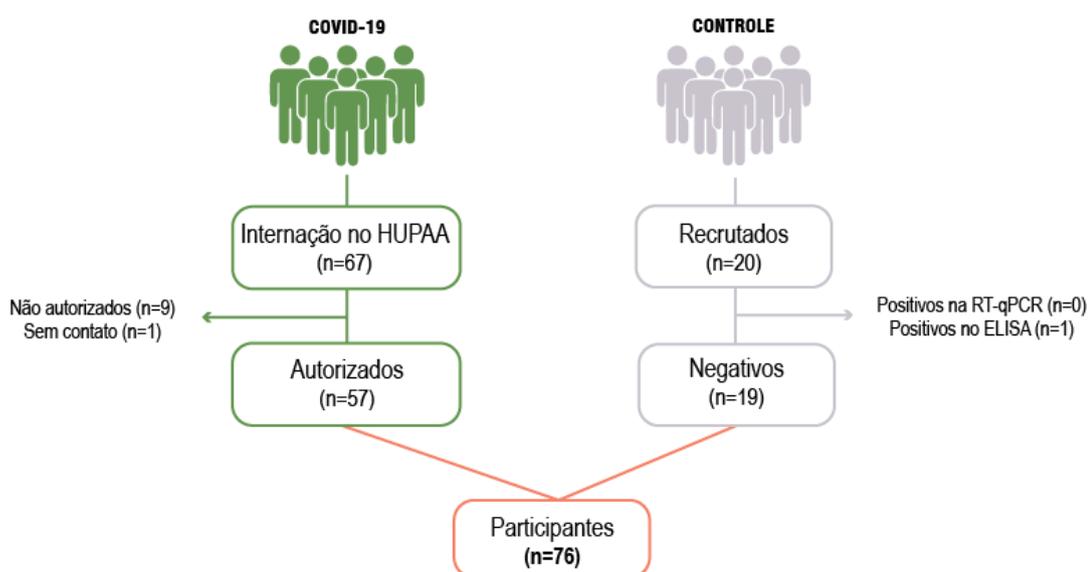
Além disso, a fim de analisar o poder discriminatório dos picos evidenciados nos espectros Raman médios e dos níveis de proteínas dosadas neste estudo, aplicou-se o modelo de projeções ortogonais à análise discriminante de estruturas latente e análise discriminante de mínimos quadrados parcial, através da plataforma online MetaboAnalyst 5.0 (metaboanalyst.ca/). Contudo, a fim de reduzir a interferência da distinção das concentrações séricas entre as proteínas, realizou-se o escalonamento de Pareto usando a mediana (Bradley Worley and Robert Powers*) por meio do programa R-Studio. Ainda, para a análise multivariada espectral foi utilizado o software Matlab.

5. RESULTADOS

5.1 Participantes do estudo

Para compor o grupo COVID-19 (Figura 10) foram contatados familiar ou responsável legal de 67 pacientes hospitalizados no HUPAA-UFAL durante o período de 20 de maio a 04 de agosto de 2020. Destes, 9 não autorizaram a participação do paciente no estudo e 1 não foi possível contatar. Já para o grupo controle foram recrutados 20 indivíduos (Figura 10) com idade, sexo e comorbidades similares ao grupo COVID-19. Após teste de RT-qPCR e ELISA, ambos para SARS-CoV-2, 1 indivíduo foi excluído do estudo por ter sido positivo para IgA. Assim, 76 indivíduos participaram do estudo, sendo 57 do grupo COVID-19 e 19 do grupo controle.

Figura 10 – Fluxo dos participantes que entraram no estudo



5.2 Dados descritivos clínicos e laboratoriais do grupo COVID-19 e controle

Dos 57 indivíduos que integram o grupo COVID-19, 30 deram entrada na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e os demais foram admitidos na enfermaria (Tabela 2). No geral, eles estavam entre 3 a 39 dias de início dos sintomas no momento da coleta e permaneceram internados entre 1 a 71 dias.

Descrevendo os dados epidemiológicos, a média de idade do grupo COVID-19 foi de 64 anos para os que estavam hospitalizados na enfermaria e de 59 anos para os da UTI (Tabela 2). O sexo feminino foi o mais frequente no geral, correspondendo a 56% dos indivíduos, bem como entre os admitidos na UTI (60%) (Tabela 2). Por sua vez, o grupo controle apresentou uma média de idade de 57 anos e uma distribuição por sexo equivalente, com 9 indivíduos do sexo masculino e 10 do sexo feminino (Tabela 2).

A respeito das comorbidades, a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) foi a mais frequente no grupo COVID-19 (61,40%). Dentro deste grupo, 55,56% dos pacientes foram internados na enfermaria e 66,67% dos pacientes na UTI. A segunda mais frequente foi o *diabetes mellitus* tipo II (DMII), com 52,63% dos pacientes. Destes, internações na enfermaria contaram por 51,85% dos casos, enquanto internações na UTI foram de 53,33% (Tabela 2). Também foram incluídos pacientes com câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e doença renal crônica (Tabela 2). No grupo controle, 36,84% dos indivíduos apresentaram HAS e 10,52% apresentaram DMII, enquanto outras comorbidades não foram contempladas.

Com relação aos sintomas, o grupo COVID-19 apresentou a dispneia como o mais predominante (92,98%), seguido de tosse (75,43%), síndrome do desconforto respiratório agudo – SDRA (68,42%) e febre (68,42%), todos com alta prevalência (Tabela 2). Além disso, mialgia, diarreia, anosmia e cefaleia foram os sintomas menos frequentes do grupo COVID-19 (Tabela 2). Somado a isto, 48 indivíduos do grupo COVID-19 apresentaram índice qSOFA superior a 1. Observando apenas o grupo de UTI, todos os indivíduos obtiveram pontuações maiores que 1 no escore qSOFA (Tabela 2), o que agrega as elevadas porcentagens de óbito tanto para os pacientes da enfermaria (44,44%), quanto UTI (53,33%).

Dentre os dados laboratoriais avaliados, observou-se uma redução significativa nos valores de hematócrito no grupo COVID-19, tanto nos internados em UTI ($p \leq 0,05$) quanto nos internados em enfermaria ($p \leq 0,0001$), e na quantidade de hemácias dos pacientes internados na enfermaria ($p \leq 0,01$), quando comparados ao grupo controle (Tabela 2). No leucograma foi observada leucocitose, linfopenia e neutrofilia no grupo COVID-19, independentemente se internados na UTI (leucócitos: $p \leq 0,001$;

linfócitos: $p \leq 0,001$; neutrófilos: $p \leq 0,0001$) ou na enfermaria (leucócitos: $p \leq 0,05$; linfócitos: $p \leq 0,01$; neutrófilos: $p \leq 0,001$) (Tabela 2).

Com relação aos dados bioquímicos, observou-se elevação nos níveis de ferritina e PCR no grupo COVID-19, tanto nos internados na UTI (ferritina: $p \leq 0,0001$; PCR: $p \leq 0,0001$) quanto na enfermaria (ferritina: $p \leq 0,001$; PCR: $p \leq 0,0001$). Somado a isto, apenas os pacientes do grupo COVID-19 da UTI apresentaram aumento nos níveis de ureia e glicose (ambas $p \leq 0,05$) e apenas da Enfermária nos níveis de triglicerídeos ($p \leq 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Dados descritivos do grupo controle e COVID-19

Características	Grupo Controle (n=19)	Pacientes Enfermária (n=27)	Pacientes UTI (n=30)
Idade, Média \pm SD	57,84 \pm 12,76	64,52 \pm 16,93	59,43 \pm 17,67
Sexo, Nº. (%)			
Masculino	9 (47,37)	13 (48,15)	12 (40,00)
Feminino	10 (52,63)	14 (51,85)	18 (60,00)
Comorbidades, Nº. (%)			
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, Nº. (%)			
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)
Desfecho, Nº. (%)			
Alta		15 (55,56)	14 (46,67)
Óbito		12 (44,44)	16 (53,33)
Laboratoriais, Mediana (Q3 – Q1)			
Hemácias	4,69 (4,86 – 4,36)	3,86 (4,6 – 3,3)**	4,34 (4,9 – 3,9)
Hematócrito	41,90 (44,45 – 40,65)	34,75 (38,27 – 28,45)****	38,72 (41,75 – 34,33)*
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)****
Creatinofosfoquinase (CPK)	143 (212,10 – 109,50)	114 (193 – 44)	96 (348 – 69)
Proteína C reativa (PCR)	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)*
Glicose	110 (122 – 100)	120 (241 – 91)	154 (246 – 177)*
Triglicédeos	120 (157 – 103)	301 (473 – 133)*	177 (290 – 124)

Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$

O levantamento dos medicamentos utilizados durante a internação também foi realizado, contudo ressalta-se que no momento da coleta de sangue os pacientes não estavam sob influência desses medicamentos e ainda, que no período de obtenção das amostras do grupo COVID-19 não havia um protocolo de tratamento estabelecido para esta doença (Tabela 3).

Tabela 3 – Medicamentos administrados ao longo da internação dos pacientes

Medicamentos	Enfermaria Nº. (%) <i>(n=27)</i>	UTI Nº. (%) <i>(n=30)</i>
Metilprednisolona	3 (11,11)	17 (56,67)
Cloridrato de dexmedetomidina	18 (66,67)	9 (30,0)
Antibiótico (não informado o tipo)	27 (100,0)	30 (100,0)
Antifúngico (Não informado o tipo)	5 (18,52)	8 (26,67)
Fosfato de oseltamivir	14 (51,85)	20 (66,67)
Azitromicina	22 (81,48)	25 (83,33)
Heparinas de baixo peso molecular	24 (88,89)	21 (70,0)
Heparina Não Fracionada	7 (25,93)	6 (20,0)
Inibidores da enzima conversora de angiotensina	0 (0,0)	2 (6,67)
Bloqueadores de receptores da angiotensina	6 (22,22)	6 (20,0)
Hidroxicloroquina	2 (7,41)	4 (13,33)
Ivermectina	7 (25,93)	4 (13,33)

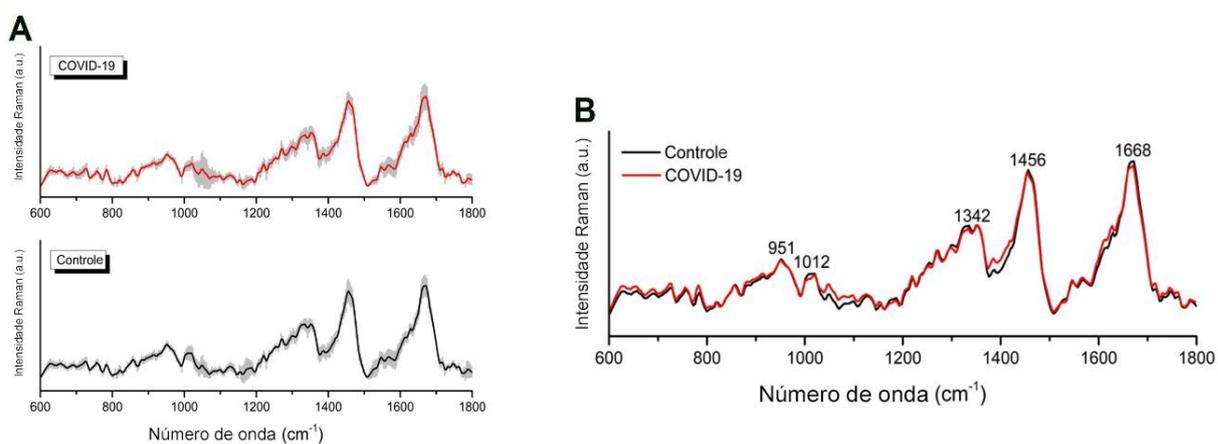
5.3 Espectroscopia Raman

A análise dos dados espectrais Raman do plasma dos indivíduos indicou diferenças importantes entre os grupos controle e COVID-19, sendo possível observar os espectros Raman médios dos dois grupos analisados na figura 11. Além disso, a classificação dos modos vibracionais das posições das bandas Raman em unidades de cm^{-1} foi baseada na literatura publicada (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007) e corresponderam principalmente a vibrações moleculares de aminoácidos, lipídios e carotenoides (Tabela 4).

Aprofundando a análise foi possível observar uma diminuição geral da intensidade de diversos picos identificados no grupo COVID-19 quando comparados ao grupo controle (Figura 12). Entre os picos reduzidos, estão os relacionados à deformação CH de L-fenilalanina e L-prolina (951 cm^{-1}), respiração simétrica do anel aromático de L-fenilalanina (1008 cm^{-1}), interações de ligações fortes de Van der Waals em L-triptofano (1012 cm^{-1}), deformação de COH de lipídios (1168 cm^{-1}), deformação de CH de L-tirosina (1171 cm^{-1}), flexão de CH de L-triptofano (1340 cm^{-1}), vibrações fora do plano em C=C de carotenoides (1528 cm^{-1} e 1532 cm^{-1}), e trecho simétrico C=C de colesterol (1668 cm^{-1}). Contudo, é importante mencionar que um pico que foi atribuído à vibração CH₃ dos lipídios (1383 cm^{-1}), o único aumentado no grupo COVID-19.

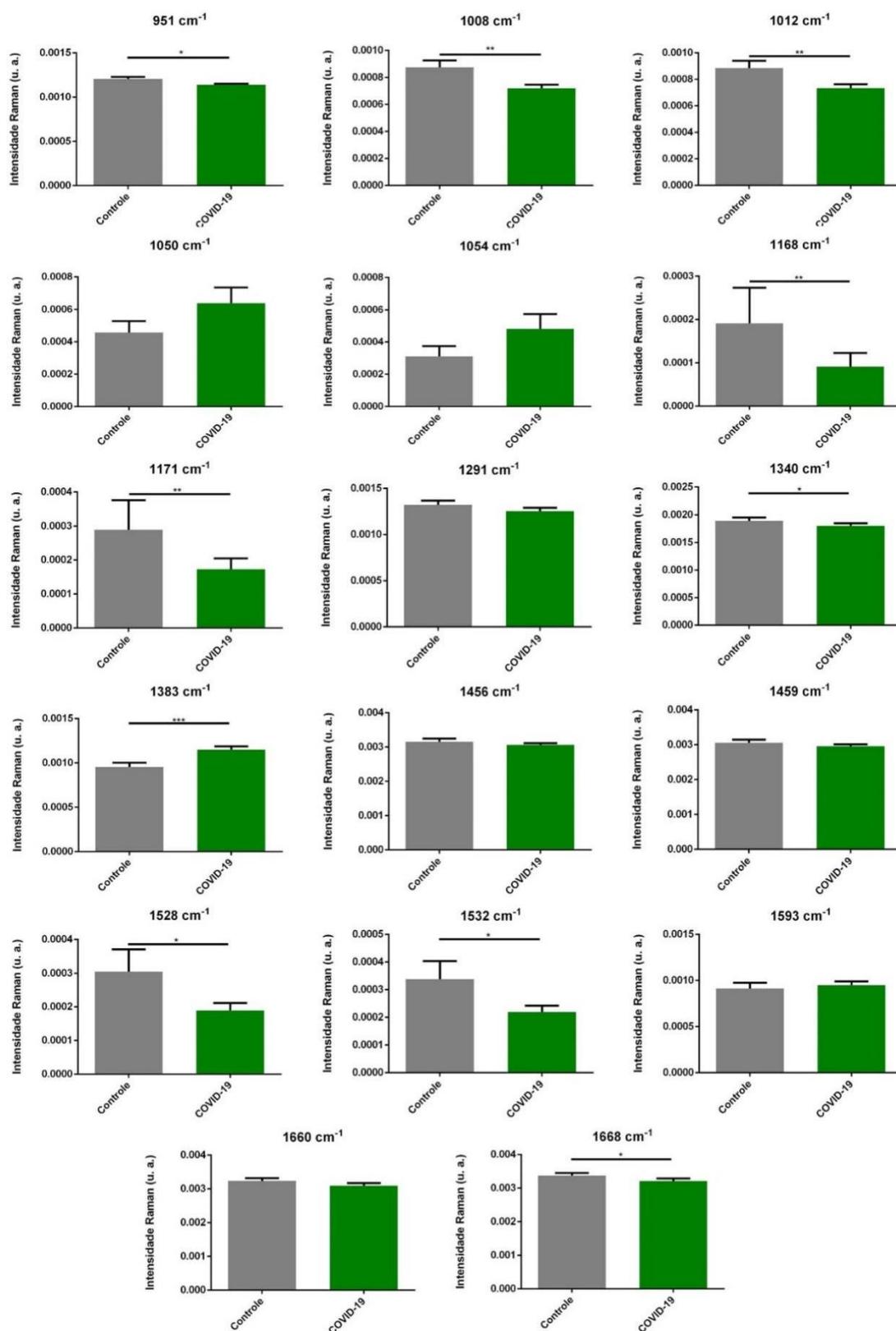
Após análise dos 17 picos (Figura 12), avaliou-se o poder que estes possuem para discriminar os grupos controle e COVID-19 (Figura 13). Assim, o modelo de projeções ortogonais à análise discriminante de estruturas latentes (OPLS-DA) evidenciou que estes 17 picos não possuem poder de discriminação entre os grupos (Q²: p 0,08 e R²_Y: p 0,06), após validação cruzada com teste permutação ($n=2000$) (Figura 12 A). Contudo, a partir deste modelo, obteve-se o gráfico VIP (Importância das Variáveis para a Projeção) que indicou os picos 1528 cm^{-1} , 1054 cm^{-1} , 1168 cm^{-1} , 1340 cm^{-1} , 1532 cm^{-1} como sendo as variáveis mais importantes para discriminação ($\text{VIP}>1,0$) (Figura 13 B).

Figura 11 - Os espectros Raman médios do grupo COVID-19 frente ao grupo controle



Legenda: (A) Os espectros Raman médios do plasma de cada grupo e (B) a sobreposição deles.

Figura 12 – Análise da intensidade dos picos Raman do plasma do grupo COVID-19 frente ao grupo controle



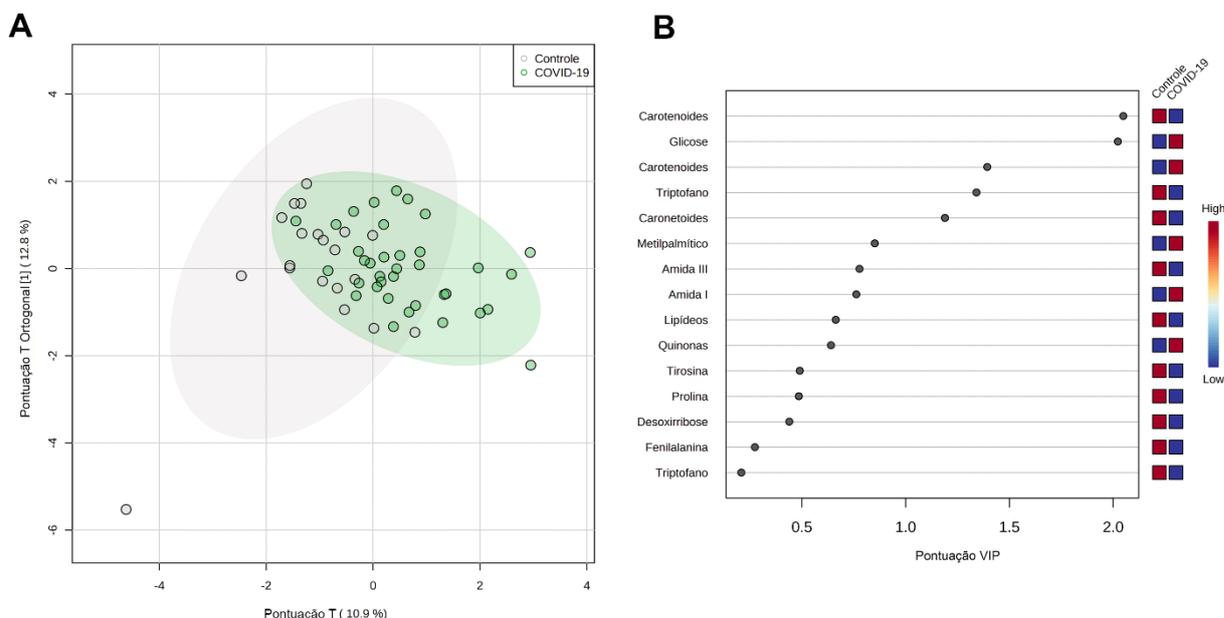
Teste de Mann-Whitney. Legenda: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

Tabela 4 - Os principais picos Raman do plasma dos grupos controle saudável e COVID-19 grave e análise estatística

Picos Raman (cm ⁻¹)	Vibrações	Atribuição	Intensidade Raman (Média ± SD)		P
			Controle	COVID-19	
951	Deformação CH	Fenilalanina e Prolina	0.0012 ± 0.00002	0.0011 ± 0.00001	0.0195, *
1008	Respiração simétrica em anel	Fenilalanina	0.0008 ± 0.00005	0.0007 ± 0.00003	0.0008, ***
1012	Interações de força de Van der Waals fortes	Triptofano	0.0009 ± 0.00005	0.0007 ± 0.00003	0.0012, **
1050	Trecho simétrico de C-C	ácido 15-metilpalmítico	0.0004 ± 0.00007	0.0006 ± 0.0001	0.1997, ns
1054	Trecho simétrico de C-C	Glicose	0.0003 ± 0.00006	0.0005 ± 0.00009	0.2150, ns
1168	C-C	Carotenoides	0.0002 ± 0.00008	0.00009 ± 0.00003	0.0074, **
1171	Deformação de CH	Tirosina	0.0003 ± 0.00009	0.00002 ± 0.00003	0.0061, **
1291	Flexão de CH	Amida III (alfa hélice)	0.0013 ± 0.00004	0.0012 ± 0.00004	0.3255, ns
1340	Flexão de CH	Triptofano	0.0019 ± 0.00006	0.0018 ± 0.00005	0.0454, *
1383	CH ₃	Lipídeos	0.0009 ± 0.00005	0.0011 ± 0.00004	0.0009, ***
1456	Alongamento de CH ₂ e deformação assimétrica de CH ₃	Arginina	0.0031 ± 0.00009	0.0031 ± 0.00005	0,1217, ns
1459	Flexão de CH ₂ e CH ₃	Desoxirribose	0.0030 ± 0.00009	0.0029 ± 0.00005	0.1533, ns
1528	Vibrações planas de C=C	Carotenoides	0.0003 ± 0.00007	0.0002 ± 0.00002	0.0240, *
1532	-C=C-	Carotenoides	0.0003 ± 0.00006	0.0002 ± 0.00002	0.0286, *
1593	alongamento do anel quinoide de C=N e C=C	Quinonas	0.0009 ± 0.00006	0.0009 ± 0.00004	0.4673, ns
1660	Trecho simétrico C=C	Amida I (alfa hélice)	0.0032 ± 0.00008	0.0031 ± 0.00008	0.0660, ns
1668	Trecho simétrico C=C	Colesterol	0.0034 ± 0.00008	0.0032 ± 0.00008	0.0427, *

Teste de Mann-Whitney. Legenda: ns: $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

Figura 13 - Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais - Análise Discriminante (OPLS-DA) da intensidade dos picos Raman do plasma de pacientes diagnosticados com COVID-19 frente ao grupo controle

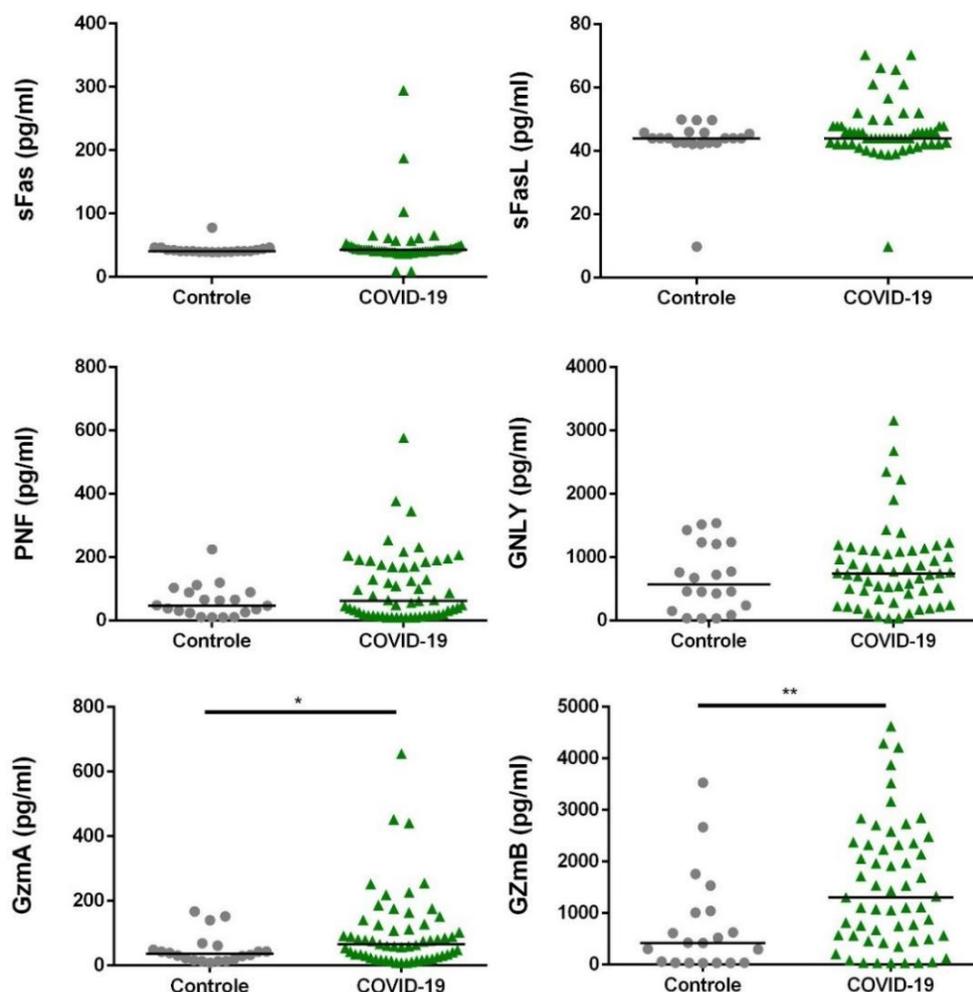


Legenda: Em A, no gráfico de pontuação o plano X consta o componente primeiro preditor e no plano Y o componente último ortogonal. A porcentagem de variância da resposta explicada apenas pela pontuação T [1] e pela pontuação T Ortogonal está indicada entre parênteses. Para o modelo de classificação (gênero), as elipses correspondem a 95% das distribuições normais multivariadas com as covariâncias amostrais. R2X (respectivamente R2Y): 0,39 (p 0,06) – porcentagem de variância do preditor explicada pelo modelo completo. Q2Y: -0,01 (p 0,08) – desempenho preditivo do modelo estimado por validação cruzada. Em B, o gráfico VIP (Importância das Variáveis para a Projeção) da análise ilustrada em A, onde as variáveis mais importantes para discriminação possuem pontuação VIP>1. Grupo COVID-19: n 57; Grupo Controle: n 19.

5.4 Dosagem sérica de proteínas envolvidas na resposta citotóxica

Inicialmente foram analisados os níveis séricos de proteínas envolvidas em respostas citotóxicas dos pacientes diagnosticados com COVID-19. A mediana e interquartis (Q3 – Q1) dos níveis de sFas, sFasL, PNF, GNLY, GzmA e GzmB, foram respectivamente, 43,05 (46,9 – 39,65); 43,95 (47,85 – 42,19); 61,66 (170,69 – 16,31); 743,35 (1103,51 – 427,4); 66,12 (125,85 – 30,09) e 1304,64 (2327,73 – 566). Por sua vez, quando comparado ao grupo controle, os pacientes com COVID-19 demonstraram aumento nos níveis de GzmA (p =0,04) e GzmB (p =0,01) (Figura 14).

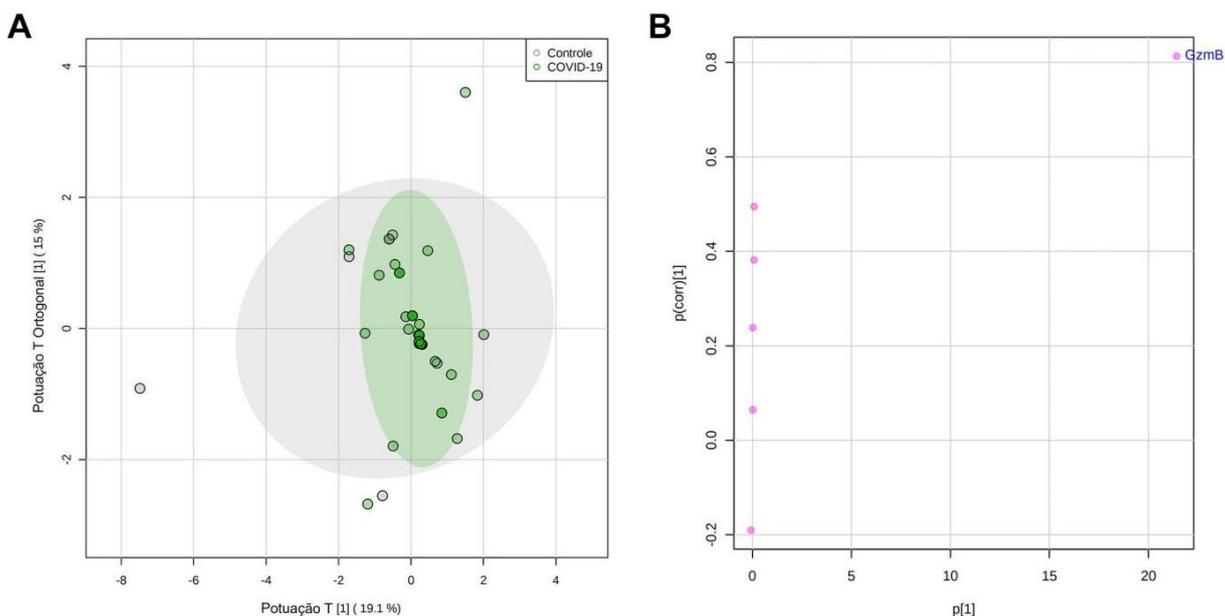
Figura 14 – Comparação entre os níveis séricos de proteínas citotóxicas de pacientes diagnosticados com COVID-19 frente ao grupo controle



Legenda: Fas solúvel (sFAs), ligante Fas solúvel (sFasL), Perforina (PNF), Granulisina (GNLY), Granzima A (GzmA) e Granzima B (GzmB). Grupo COVID-19: n 57; Grupo Controle: n 19. Mediana representada por barra intragrupo. Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$. Valores de p : sFas (0,67), sFasL (0,53), PNF (0,28), GNLY (0,27), GzmA (0,04), GzmB (0,01).

Adicionalmente, foi avaliado o poder que os níveis séricos das proteínas citotóxicas possuem para discriminar os grupos controle e COVID-19 (Figura 15). Assim, após escalonamento, o modelo de projeções ortogonais à análise discriminante de estruturas latentes (OPLS-DA) evidenciou que o conjunto dessas proteínas citotóxicas possuem um baixo poder de discriminação entre os grupos (Q2: p 0,34 e R2Y: p 0,64), após validação cruzada com teste permutação ($n=2000$), embora tenha destacado a GzmB como variável de maior contribuição para tal separação (covariância 21,43; correlação 0,81).

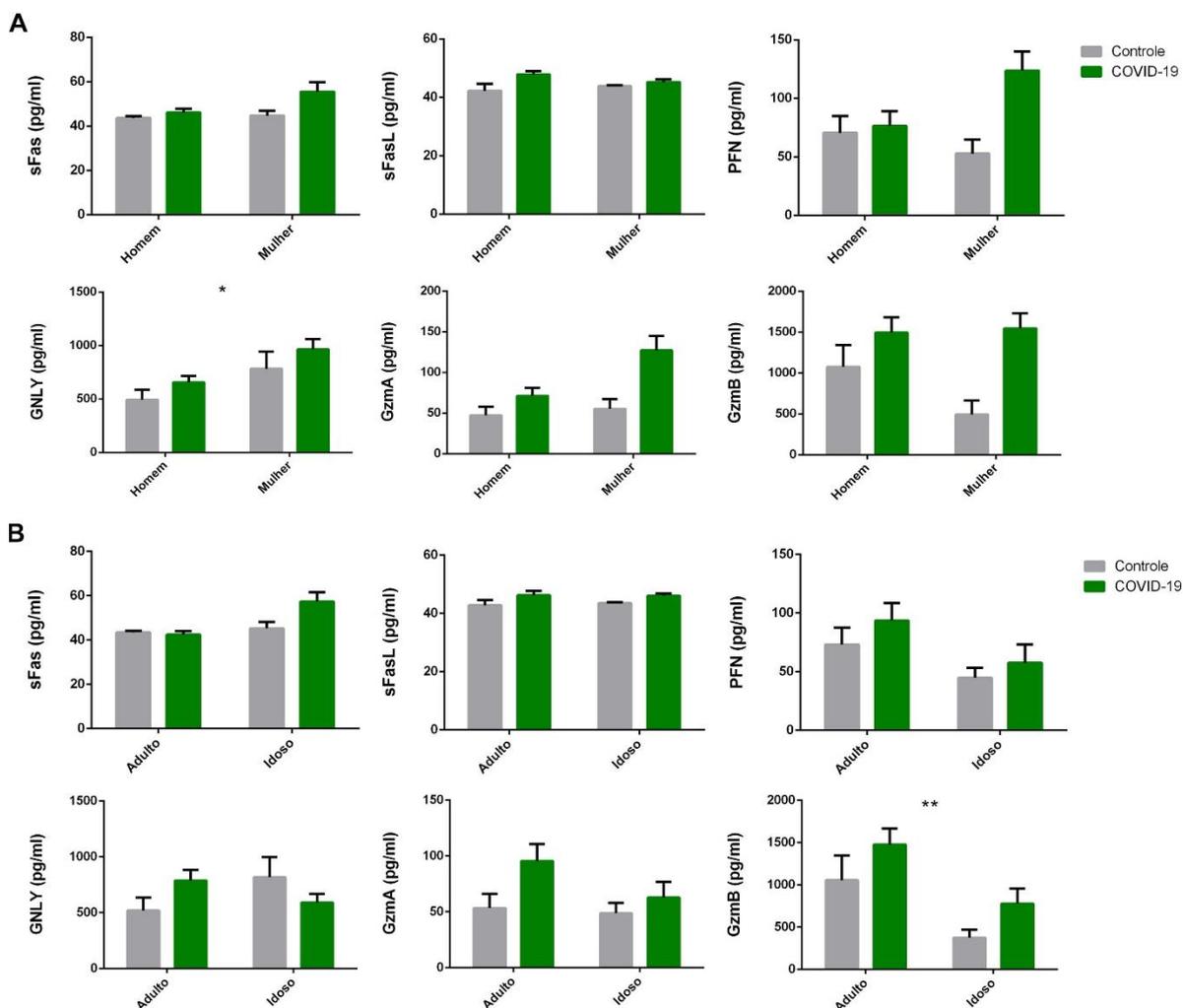
Figura 15 – Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais - Análise Discriminante (OPLS-DA), do nível sérico de moléculas citotóxicas em pacientes diagnosticados com COVID-19 com grupo controle



Legenda: Em A, no gráfico de pontuação o plano X consta o componente primeiro preditor e no plano Y o componente último ortogonal. A porcentagem de variância da resposta explicada apenas pela pontuação T [1] e pela pontuação T Ortogonal está indicada entre parênteses. Para o modelo de classificação (gênero), as elipses correspondem a 95% das distribuições normais multivariadas com as covariâncias amostrais. R2X (respectivamente R2Y): 0,06 (p 0,65) – porcentagem de variância do preditor explicada pelo modelo completo. Q2Y: -0,04 (p 0,32) – desempenho preditivo do modelo estimado por validação cruzada. Em B, O gráfico mostra a influência da variável em um modelo Ortogonal PLS-DA, onde covariância e correlação correspondem respectivamente a $p[1]$ e $p(\text{corr})[1]$. GzmB $p[1]$ 21,43; $p(\text{corr})[1]$ 0,81. Grupo COVID-19: n 57; Grupo Controle: n 19.

Em seguida, avaliou-se a influência da idade e sexo sob os níveis séricos destas proteínas (Figura 16). Após análise, constatou-se que a variável sexo tem efeito sob as concentrações de granulicina ($p < 0,05$) e que a variável idade tem efeito sobre os níveis de GzmB ($p < 0,01$).

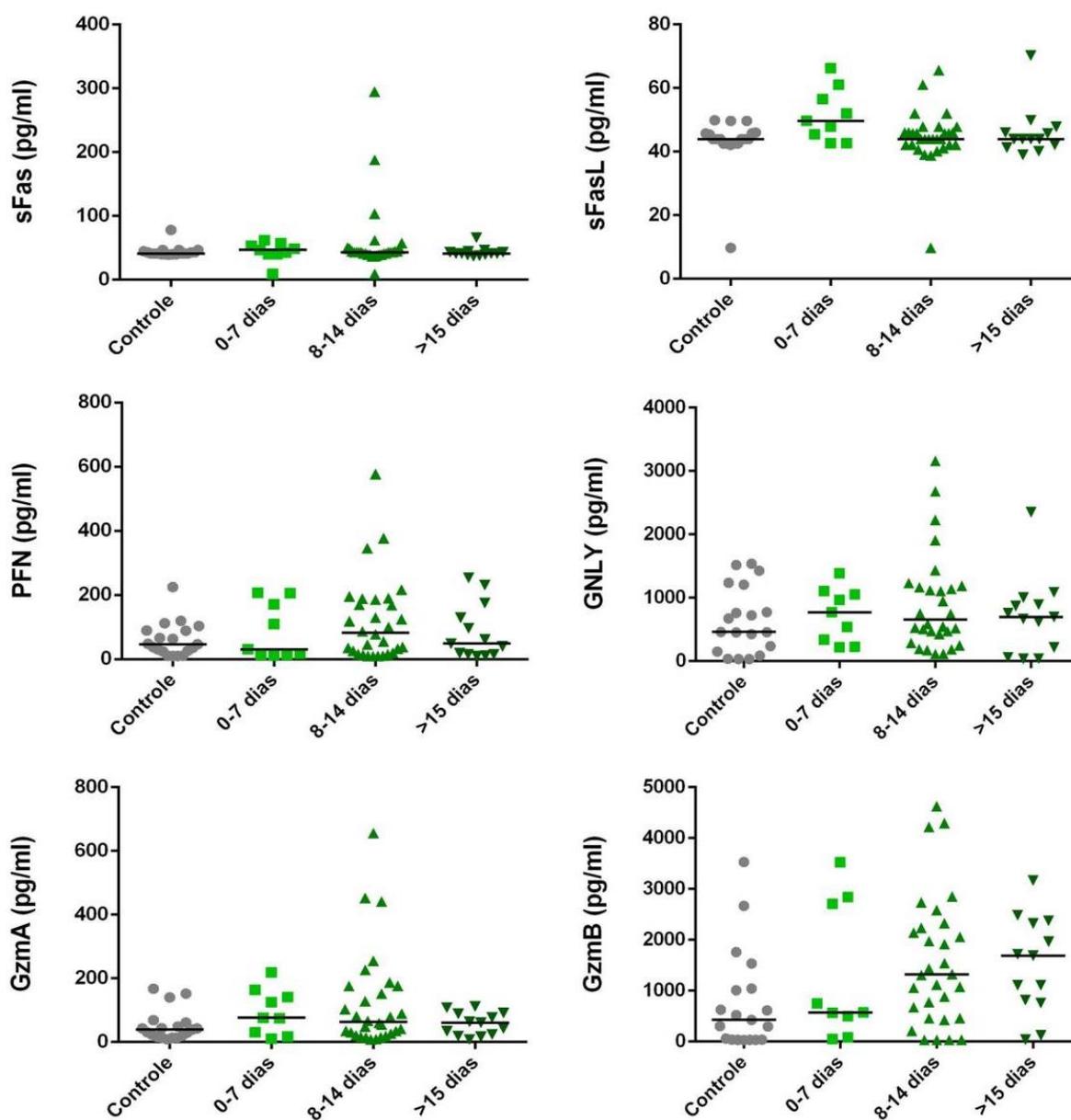
Figura 16 – Interação entre os fatores sexo (A) e idade (B) com os níveis séricos de moléculas citotóxicas do grupo COVID-19



Legenda: Fas solúvel (sFAs), ligante Fas solúvel (sFasL), Perforina (PNF), Granulicina (GNLY), Granzima A (GzmA) e Granzima B (GzmB). Grupo COVID-19: n 57, Grupo Controle. n 19. teste de ANOVA bifatorial com pós teste de comparações múltiplas de Sidak para avaliar fontes de variação. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.

Verificou-se, ainda, a existência de distinção dos níveis séricos de tais proteínas citotóxicas mediante aos dias prévios com sintomas antes da internação, o grupo COVID-19 foi categorizado em três intervalos de tempo, 0 a 7 dias, 8 a 14 dias e mais de 15 dias. Todavia, não foram observadas distinções significativas, mostrando que o aumento de granzimas encontrado não é dependente de um período específico da doença (Figura 17).

Figura 17 – Comparação do nível sérico de moléculas citotóxicas entre o grupo COVID-19 com grupo controle, subdividindo o grupo COVID-19 por período de sintomas



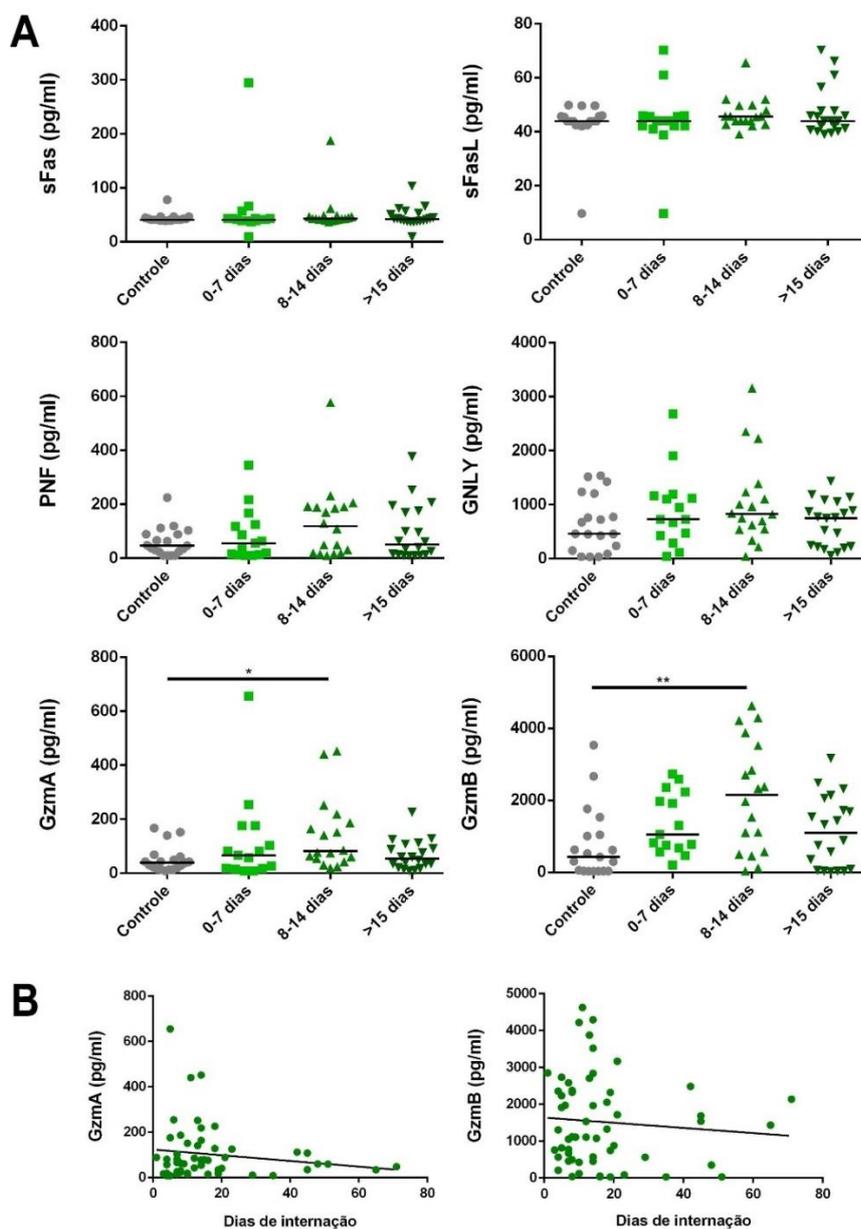
Legenda: Fas solúvel (sFAs), ligante Fas solúvel (sFasL), Perforina (PNF), Granulisina (GNLY), Granzima A (GzmA) e Granzima B (GzmB). Grupo controle: n 19, Grupo COVID-19 0-7 dias: n 9, Grupo COVID-19 8-14 dias: n 30, Grupo COVID-19 >15 dias: n 13. Mediana representada por barra intragrupo. Análise estatística por meio do Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Valores de *p*: sFas (0,54), sFasL (0,11), PFN (0,65), GNLY (0,69), GzmA (0,24), GzmB (0,06).

Assim, buscou-se avaliar os níveis séricos das proteínas citotóxicas frente ao tempo de internação dos pacientes, subdividindo-os conforme o intervalo de tempo da análise anterior. Verificou-se então a existência de distinção dos níveis séricos de GzmA ($p = 0,03$) e GzmB ($p = 0,01$) entre os subgrupos (Figura 18A), sendo mais significativo, tanto para os níveis de GzmA, quanto para os de GzmB, entre os grupos controle e grupo COVID-19 com 8 a 14 dias de internação (GzmA: $p < 0,05$; GzmB: $p < 0,01$). Diante destes resultados verificou-se a correlação entre o tempo de internação dos indivíduos positivos para SARS-CoV e seus níveis séricos tanto de GzmA, quanto de GzmB. Contudo, não houve correlação estatística para ambas as proteínas (GzmA $r: p = 0,89$, $r^2: p = 0,23$; GzmB $r: p = 0,37$, $r^2: p = 0,51$) (Figura 18B).

Devido ao grupo COVID-19 ser composto por indivíduos que necessitaram de suporte hospitalar em enfermaria ou UTI, foi verificada a existência de distinção dos níveis séricos das proteínas citotóxicas aqui mencionadas frente ao local de internação. Assim, foi constatado que os níveis tanto de GzmA quanto de GzmB se mostraram elevados nos indivíduos que foram internados na enfermaria (GzmA: $p < 0,05$; GzmB: $p < 0,01$), quando comparados ao grupo controle (Figura 19).

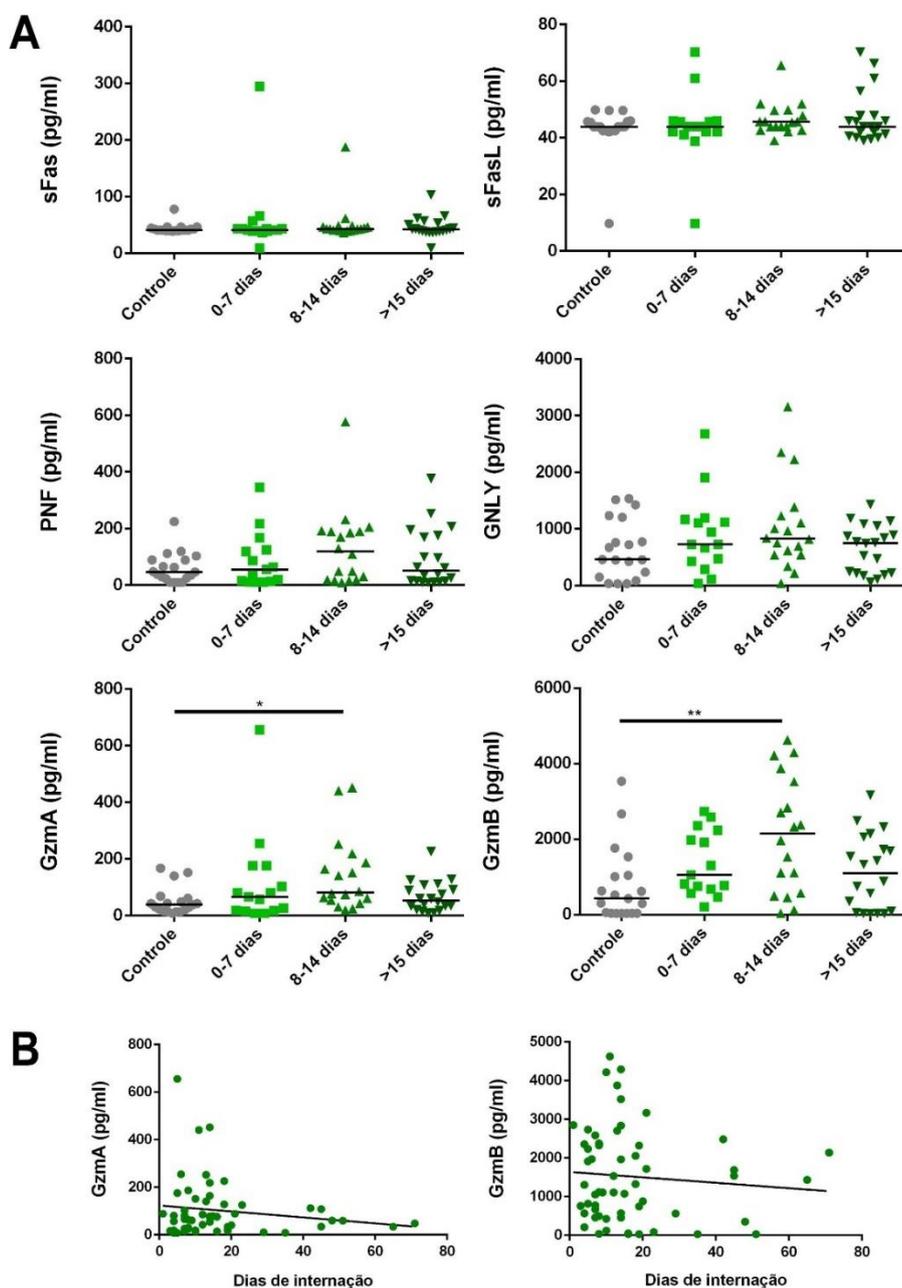
Por fim, verificou-se a associação dos níveis séricos das proteínas citotóxicas com o desfecho do grupo COVID-19, em alta e óbito. Após análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) (Figura 20), observou-se que as proteínas citotóxicas não possuem capacidade de discriminar o grupo COVID-19 quanto ao seu desfecho ($p=0,88$), contudo o componente 1 explica 81,7% da variância entre alta e óbito e a GzmB como uma proteína importantes para este componente ($VIP > 1,0$).

Figura 18 – Comparação do nível sérico de moléculas citotóxicas em pacientes diagnosticados com COVID-19 com grupo controle, subdividindo o grupo COVID-19 por dias de internação



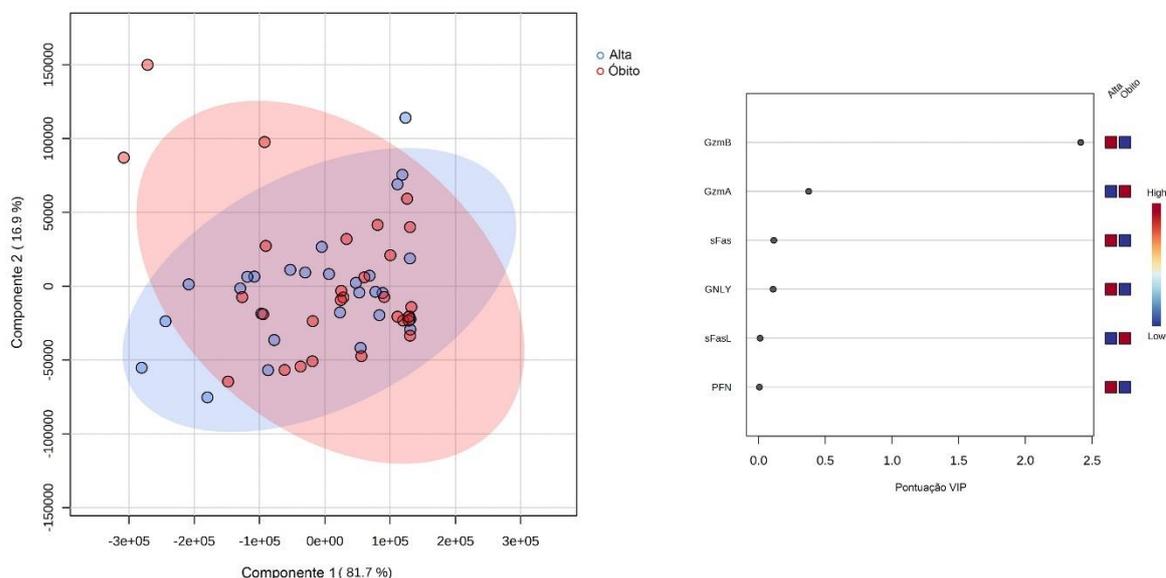
Legenda: Fas solúvel (sFas), ligante Fas solúvel (sFasL), Perforina (PNF), Granulinsina (GNLY), Granzima A (GzmA) e Granzima B (GzmB). Grupo controle: n 19, Grupo COVID-19 0-7 dias: n 15, Grupo COVID-19 8-14 dias: n 18, Grupo COVID-19 >15 dias: n 20. Mediana representada por barra intragrupo. Análise estatística por meio do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn em A, por meio de teste de correlação de Spearman em B. Valores de p : teste de Kruskal-Wallis - sFas (0,80), sFasL (0,61), PNF (0,42), GNLY (0,34), GzmA (0,03) GzmB (0,01); correlação de níveis de GzmA com tempo de internação - r : p 0,89, r^2 : p 0,23; correlação de níveis de GzmB com tempo de internação - r : p 0,37, r^2 : p 0,51. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.

Figura 19 – Comparação do nível sérico de moléculas citotóxicas em pacientes diagnosticados com COVID-19 com grupo controle, subdividindo o grupo COVID-19 por local internação



Legenda: Fas solúvel (sFAs), ligante Fas solúvel (sFasL), Perforina (PNF), Granulisina (GNLY), Granzima A (GzmA) e Granzima B (GzmB). (A) Grupo controle: n 19, Grupo COVID-19 Enfermaria: n 27, Grupo COVID-19 UTI: 30. (B) Grupo controle: 19. Mediana representada por barra intragrupo. Análise estatística por meio do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Valores de p : sFas (0,89), sFasL (0,70), PNF (0,25), GNLY (0,29), GzmA (0,02) GzmB ($< 0,01$) em A. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.

Figura 20 - Análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) do nível sérico de moléculas citotóxicas do grupo COVID-19, classificado por desfecho



Legenda: O gráfico de pontuação PLS-DA com validação cruzada para comparação dos perfis de moléculas citotóxicas de pacientes do grupo COVID-19 que veio a óbito (vermelho) e que recebeu alta (azul). O valor p baseado na permutação é 0,88 (1776/2000). Os círculos coloridos representam intervalos de confiança de 95%. Pontos coloridos representam amostras individuais.

Almejando verificar interdependência entre os níveis séricos das proteínas citotóxicas analisadas com os parâmetros laboratoriais dos pacientes positivos para COVID-19, foram realizados testes de correlação que indicaram, em geral, correlações inversamente proporcionais.

Em relação aos parâmetros de hemograma (Tabela 5), os níveis de GNLY e GzmA apresentaram correlação negativa com a contagem de hemácias (GNLY: $p = 0,002$; GzmA: $p = 0,008$) e a porcentagem de hematócrito (GNLY: $p = 0,002$; GzmA: $p = 0,005$). Já os níveis de PFN e GzmB mostraram correlação negativa com a contagem de leucócitos totais (PFN: $p = 0,025$; GzmB: $p = 0,021$) e neutrófilos (PFN: $p = 0,019$; GzmB: $p = 0,007$), sendo que para neutrófilos os níveis de GzmA também demonstraram o mesmo tipo de correlação ($p = 0,038$). Já os níveis de sFasL frente a contagem de plaquetas apresentou uma correlação diretamente proporcional ($p = 0,031$). Por sua vez, a respeito das correlações com parâmetros bioquímicos (Tabela 6), apenas PFN, GNLY e GzmA possuíram correlação negativa, sendo que a PFN e

GzmA apresentaram correlação com os níveis de CPK e leucócitos totais (PFN: $p = 0,003$; GzmA: $p = 0,016$) e a GNLY com os níveis de glicose ($p = 0,010$).

5.5 Populações celulares em pacientes com COVID-19

Com o intuito de conhecer as populações de linfócitos impactadas durante infecção pelo SARS-CoV-2 no grupo COVID-19 desse estudo, fez-se a imunofenotipagem de cinco subconjuntos linfocitários: ILCs, NKs, linfócitos B, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺.

Assim, após análise estatística, foi observado que a porcentagem de ILC1 (CD3⁻CD4⁻T-bet⁺) e ILC3 (CD3⁻CD4⁻ROR γ t⁺) no grupo COVID-19 apresentaram um aumento estatístico significativo frente ao grupo controle, já as porcentagens das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ naive (CD4⁺CD8⁻CD45RO⁻CD62L⁺), linfócitos T de memória efetor: CD4⁺ (CD4⁺CD8⁻CD45RO⁺CD62L⁻) e CD8⁺ (CD4⁻CD8⁺CD45RO⁺CD62L⁻); e linfócitos T CD8⁺ efetor (CD4⁻CD8⁺CD45RO⁻CD62L⁻) se mostraram estatisticamente reduzidas (Figura 21).

Tabela 5 - Correlação dos níveis de proteínas citotóxicas com parâmetros de hemograma em pacientes com COVID-19

	sFas		sFasL		PFN		GNLY		GzmA		GzmB	
	<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>
Hemácia	0,094	0,485	0,212	0,114	-0,239	0,073	-0,404	0,002*	-0,348	0,008*	-0,110	0,415
Hematócrito	0,068	0,617	0,190	0,156	-0,208	0,120	-0,394	0,002*	-0,363	0,005*	-0,130	0,334
Leucócito	-0,062	0,648	-0,041	0,764	-0,297	0,025*	-0,168	0,213	-0,193	0,150	-0,305	0,021*
Neutrófilo	-0,068	0,617	-0,024	0,859	-0,311	0,019*	-0,235	0,078	-0,276	0,038*	-0,352	0,007*
Linfócito	-0,098	0,468	-0,010	0,941	-0,087	0,519	0,057	0,673	0,183	0,172	0,044	0,744
Monócito	-0,037	0,782	-0,014	0,917	-0,166	0,218	-0,089	0,511	-0,049	0,715	-0,149	0,268
Plaquetas	0,114	0,405	0,289	0,031*	-0,179	0,187	-0,086	0,530	-0,106	0,437	-0,138	0,310

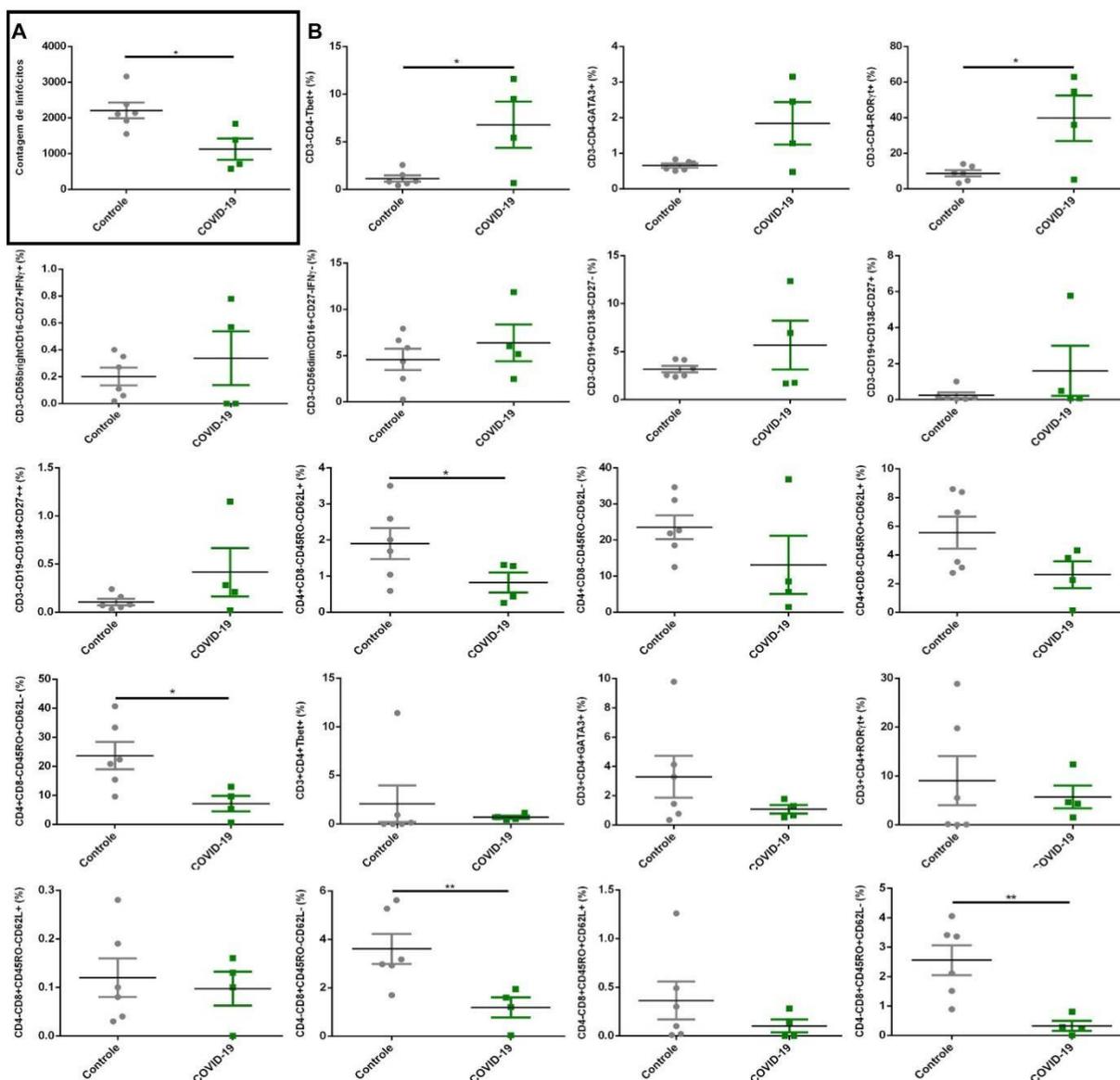
Teste de correlação de Spearman, * $p \leq 0.05$

Tabela 6 - Correlação dos níveis de proteínas citotóxicas com parâmetros bioquímicos em pacientes com COVID-19

	sFas		sFasL		PFN		GNLY		GzmA		GzmB	
	<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>
CPK	0,020	0,896	0,058	0,707	-0,440	0,003*	-0,186	0,223	-0,356	0,016*	-0,274	0,069
PCR	-0,100	0,458	-0,101	0,457	-0,127	0,347	-0,258	0,053	-0,131	0,332	-0,238	0,074
Ferritina	0,097	0,490	0,084	0,552	-0,027	0,846	-0,252	0,069	-0,208	0,136	-0,141	0,315
Glicose	0,021	0,893	0,092	0,547	-0,025	0,868	-0,380	0,010*	-0,059	0,699	-0,173	0,257
Triglicerídeos	0,066	0,703	-0,031	0,856	-0,207	0,226	0,030	0,863	0,006	0,970	-0,072	0,678

Teste de correlação de Spearman, * $p \leq 0.05$

Figura 21– Imunofenotipagem linfocitária de indivíduos com e sem COVID-19



Legenda: (A) Contagem total de linfócitos, (B) Porcentagem das populações de linfócitos marcadas. Grupo controle: 6, Grupo COVID-19: 4. CD3⁺ CD4⁺ Tbet⁺ (ILC1), CD3⁺ CD4⁺ GATA3⁺ (ILC2), CD3⁺ CD4⁺ RORγt⁺ (ILC3), CD3⁺ CD56^{bright} CD16⁺ CD27⁺ IFN-γ⁺ (NK produtora de citocinas), CD3⁺ CD56^{dim} CD16⁺ CD27⁻ IFN-γ⁻ (NK efetora citotóxica), CD3⁺ CD19⁺ CD138⁻ CD27⁻ (linfócito B naive), CD3⁺ CD19⁺ CD138⁻ CD27⁺ (linfócito B de memória), CD3⁺ CD19⁻ CD138⁺ CD27⁺⁺ (plasmócito), CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD62L⁺ (linfócito T CD4⁺ naive), CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD62L⁻ (linfócito T CD4⁺ efetor), CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁺ CD62L⁺ (linfócito T CD4⁺ memória central), CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁺ CD62L⁻ (linfócito T CD4⁺ memória efetor), CD4⁺ CD8⁺ CD45RO⁻ CD62L⁺ (linfócito T CD4⁺ memória efetor), CD3⁺ CD4⁺ Tbet⁺ (linfócito T CD4⁺ TH1), CD3⁺ CD4⁺ GATA3⁺ (linfócito T CD4⁺ TH2), CD3⁺ CD4⁺ RORγt⁺ (linfócito T CD4⁺ TH3), CD4⁺ CD8⁺ CD45RO⁻ CD62L⁺ (linfócito T CD8⁺ naive), CD4⁺ CD8⁺ CD45RO⁻ CD62L⁻ (linfócito T CD8⁺ efetor), CD4⁺ CD8⁺ CD45RO⁺ CD62L⁺ (linfócito T CD8⁺ memória central), CD4⁺ CD8⁺ CD45RO⁺ CD62L⁻ (linfócito T CD8⁺ memória central). Média e erro padrão da média são indicados em cada grupo. Análise estatística por meio do teste de Mann-Whitney. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

6. DISCUSSÃO

As diferentes manifestações clínicas que a COVID-19 possui reforça a necessidade de compreender melhor a resposta imunológica deflagrada a infecções por SARS-CoV-2 e identificar biomarcadores precisos, que auxiliem na conduta clínica de pacientes. Por entender que a resposta citotóxica é a linha de frente para resolução de infecções virais, neste estudo foram avaliadas seis moléculas citotóxicas, diferentes subpopulações de células linfoides e espectros Raman no plasma de indivíduos com COVID-19.

As coletas foram realizadas no período de maio a agosto de 2020, onde havia no Brasil a circulação apenas da variante alfa e não havia a vacinação da população (CANDIDO et al., 2020). Assim, dentre as limitações do estudo está a ausência de informações antecedentes a internação, devido ao período de isolamento imposto na época e o estado clínico dos pacientes. Desse modo os dados epidemiológicos e clínicos do grupo COVID-19 foram obtidos exclusivamente por registros nos prontuários. Ainda, câncer foi uma comorbidade frequente no grupo COVID-19, devido ao HUPAA/UFAL ser referência no tratamento desta patologia em adultos no Estado, embora não tenha influenciado nos desfechos estatísticos. Por fim, a ampliação dos dados de imunofenotipagem foi impossibilitada devido a manutenção de equipamento.

O grupo COVID-19 desse estudo foi composto por indivíduos classificados pela literatura como pacientes agudos graves/críticos, conforme os dias de sintomas, a parâmetros clínicos e laboratoriais. Pois, mais da metade deste grupo apresentou dispneia, SDRA e pontuação qSOFA acima de 1 (ROD; OVIEDO-TRESPALACIOS; CORTES-RAMIREZ, 2020). Além disso, estes indivíduos agregam parâmetros laboratoriais reportados na literatura como preditivos de severidade e mortalidade, ou seja, redução de hemácias, hematócrito e linfócitos, bem como leucocitose, neutrofilia e elevação dos níveis de ferritina, PCR, ureia, glicose e triglicerídeos (LONG et al., 2022). Em seguida, após compreender o contexto clínico em que o grupo COVID-19 desse estudo está inserido, avaliamos os resultados espectrais Raman frente aos do grupo controle, pois a aplicação desta técnica para caracterizar materiais biológicos está em expansão e já é amplamente utilizada nas áreas da farmacologia, microbiologia, toxicologia, fitoterapia e biologia humana (BUTLER et al., 2016).

Assim, após análise dos espectros Raman médios dos grupos controle e COVID-19, encontrou-se diferenças importantes dentro de 951 – 1668 cm^{-1} atribuídas a elementos com atuação na resposta antiviral. A fenilalanina, por exemplo, que foi atribuída aos picos 951 cm^{-1} e 1008 cm^{-1} – ambos reduzidos no grupo COVID-19 –, é um aminoácido associado a diferenciação e proliferação de linfócitos com perfil $\text{T}_{\text{H}1}$, com correlação diretamente proporcional aos níveis plasmáticos desse tipo celular (WANG, et al., 2019). Isso é bastante relevante, pois essas células são uma fonte de $\text{IFN-}\gamma$, uma potente citocina antiviral. Por sua vez, o pico 951 cm^{-1} também foi atribuído à prolina, um aminoácido importante para a capacidade de reconhecimento das moléculas de HLA classe I pelos linfócitos citotóxicos (HONGO *et al.*, 2019).

Os outros picos que também foram reduzidos no grupo COVID-19 possuem atribuições correlacionadas a atividade dos linfócitos citotóxicos. Os picos 1012 cm^{-1} e 1340 cm^{-1} foram atribuídos ao triptofano, o qual desempenha um relevante papel na ativação dos linfócitos citotóxicos através da regulação negativa da expressão de PD-1 (QIN, et al., 2021). Já o pico de 1171 cm^{-1} foi atribuído à tirosina, aminoácido importante para o mecanismo de degranulação dos linfócitos citotóxicos (AZUMA *et al.*, 1993). E por fim, os picos 1168 cm^{-1} , 1528 cm^{-1} e 1532 cm^{-1} foram atribuídos aos carotenoides, que consistem em compostos lipossolúveis encontrados no complexo de Golgi de NKs e linfócitos citotóxicos, capazes de promover o aumento de subpopulações linfocitárias, a produção de citocinas e aumentar a atividade citotóxica (CHEW, 1993; PUPPELS *et al.*, 1993). Carotenoides também são moléculas que possuem papel antioxidante devido a propriedades de eliminar ROS (MILANI *et al.*, 2017) e os três picos atribuídos a estes compostos tiveram pontuação VIP superior a 1 na análise de OPLS-DA, reforçando que se trata de uma variável importante para a discriminação entre grupo controle e COVID-19. Assim, a redução desses picos reflete um cenário de desbalanço do sistema redox, também visualizado no aumento do estresse oxidativo e redução de antioxidantes em eritrócitos do grupo COVID-19 em estudo publicado por nosso grupo (SALES *et al.*, 2023). O único pico que mostrou um aumento de intensidade no grupo COVID-19 foi o 1383 cm^{-1} , o qual possui como atribuição os lipídios, que são moléculas com capacidade inibitória a proliferação e ativação de linfócitos citotóxicos (CALDER, 1995; CALDER *et al.*, 2002; REILLY *et al.*, 2021). Ainda, sabe-se que o SARS-CoV-2 promove alterações no metabolismo lipídico a favor de sua replicação, pois servem como matéria prima para construção

dos seus envelopes virais e fonte de energia, além dos lipídeos atuarem na interação entre vírus e célula hospedeira, sendo demonstrado que a proteína S deve sofrer palmitoilação antes de promover a fusão viral (THEKEN *et al.*, 2021). Muito embora, mecanismos inflamatórios também realizem a liberação de ácidos graxos poli-insaturados de membranas plasmáticas celulares a fim de convertê-los em ativadores da resposta imune inata, como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, sendo a primeira repostada como elevada em pacientes graves de COVID-19 (IRÚN *et al.*, 2023).

Diante do exposto, fica claro o quão importante foi utilizar a espectroscopia Raman em nossas amostras. Até o momento, o uso dessa técnica em fluidos corpóreos de indivíduos infectados por SARS-CoV-2 teve como objetivo apenas servir como uma técnica alternativa para diagnóstico (CARVALHO; NOGUEIRA, 2020; DESAI *et al.*, 2020; GOULART *et al.*, 2021; YIN *et al.*, 2021). No entanto, dois trabalhos recém-publicados apresentaram, por meio de espectroscopia Raman, alterações bioquímicas no soro de indivíduos infectados por SARS-CoV-2, sendo que um indicou diminuição de aminoácidos e aumento de lipídios (GOULART *et al.*, 2022) como observado em nossas análises, enquanto o outro mostrou aumento de ácidos nucleicos, fenilalanina, tirosina, triptofano e lipídeos em pacientes severos quando comparado com pacientes não severos (BANERJEE *et al.*, 2023), contudo ambos não realizaram sem nenhuma correlação imunológica. Desse modo, de forma pioneira, nosso estudo traz a perspectiva de que as características espectrais do plasma de pacientes com COVID-19 podem sinalizar possíveis mecanismos de depleção da resposta imunológica citotóxica, por meio da redução de aminoácidos (fenilalanina, prolina, triptofano e tirosina) e carotenoides, agregado ao aumento de lipídeos. Por sua vez, este pode ser um dos mecanismos que provoquem a linfopenia observada no leucograma, refletindo na severidade clínica desses indivíduos. Esta severidade também é reforçada pelos níveis aumentados de lipídeos, pois a hiperlipidemia está vinculada ao aumento da gravidade e mortalidade da COVID-19 e já foi associada como possível indutora de lesão pulmonar por provocar disfunções endoteliais que resultam em apoptose dessas células (LIU, Yanli *et al.*, 2021).

Além disso, obtivemos dados interessantes com a dosagem plasmática de moléculas citotóxicas. Em uma visão geral, nossas análises indicaram diferença

estatística apenas para os níveis de granzimas, sendo estas elevadas nos indivíduos com COVID-19. Entretanto, até o presente momento, há apenas dois grupos de pesquisadores que realizaram a dosagem sérica de todas as proteínas em questão. Hernández-Solis e colaboradores (2022), observaram apenas o aumento nos níveis de GNLY e sFas em pacientes severos (n=25) e críticos (n=25) que foram internados no hospital geral do México, entre junho e novembro de 2020, sendo considerado paciente crítico aquele que precisou de suporte em UTI (HERNÁNDEZ-SOLIS *et al.*, 2022). Por sua vez, Li e colaboradores (2020) observaram um aumento nos níveis séricos de sFas, PFN, GNLY e GzmB em 16 pacientes com COVID-19 severa, que estavam em tratamento em um hospital de Wuhan, entre 25 e 27 de fevereiro de 2020 (LI *et al.*, 2020). Em relação a estes estudos, é válido mencionar que o grupo controle foi composto por critérios distintos, onde Hernández-Solis e colaboradores (2022) utilizaram indivíduos assintomáticos que tiveram contato com os pacientes que participaram do estudo, e Li e colaboradores (2020) recrutaram indivíduos por pareamento de idade com o grupo COVID-19, além de que, em ambos os estudos, os pacientes severos/críticos eram majoritariamente do sexo masculino. Todavia, o importante a se destacar é que não há um padrão ou consenso de como se apresentam os níveis séricos dessas moléculas citotóxicas em manifestações graves da COVID-19, reforçando a importância deste estudo, bem como a necessidade de realização de outros.

Outro ponto intrigante é que em uma resposta antiviral citotóxica, espera-se uma elevação mútua dos níveis de granzimas e PFN, e esse padrão foi observado em estudos que analisaram a expressão ou marcação intracelular dessas moléculas em pacientes com COVID-19 (CHEN *et al.*, 2021; KANG *et al.*, 2020; MALENGIER-DEVILIES *et al.*, 2022; MAZZONI *et al.*, 2020). Contudo, não podemos transpor este cenário ao aumento plasmático isolado das granzimas em nosso estudo, pois os níveis gênicos e intracelulares dessas moléculas podem não refletir nos seus níveis sanguíneos, como observado por Saleki e colaboradores, que identificaram aumento na expressão de sFasL em casos severos de COVID-19, mas sem alteração nos níveis séricos, quando comparado ao grupo controle (SALEKI *et al.*, 2022). Além disso, os nossos dados podem refletir o que já foi observado em quadros de doenças virais, bacterianas e doenças autoimunes, onde os níveis plasmáticos de granzimas estavam elevados e atuaram em funções biológicas independente de PFN como

remodelação de matriz extracelular, coagulação sanguínea e indução de processos inflamatórios (JOECKEL; BIRD, 2014; ROMERO; ANDRADE, 2008; WENSINK; HACK; BOVENSCHEN, 2015).

Assim, direcionando para as funções extracelulares de cada granzima aqui analisadas, estudos apontam que a GzmA extracelular possui a capacidade de estimular a produção de IL-6, IL-8 e TNF- α por monócitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais (GARZÓN-TITUAÑA *et al.*, 2020; VAN DAALEN; REIJNEVELD; BOVENSCHEN, 2020). Além disso, a GzmA contribui com um cenário inflamatório por meio da ativação de IL-1 β ao clivar de sua molécula precursora, e por atuar na remodelação da MEC por meio da clivagem de colágeno IV e fibronectina, refletindo na redução da adesão de células epiteliais com a membrana basal, e consequente patogênese de alguns quadros clínicos, como por exemplo o dano na parede alveolar na DPOC (LIEBERMAN, 2010; VAN DAALEN; REIJNEVELD; BOVENSCHEN, 2020). Por sua vez, essas citocinas pró-inflamatórias são capazes de induzir a liberação de grandes quantidades de fator de Von Willebrand (VWF), um potente agregador plaquetário, e isto, somado a capacidade da GzmA em clivar receptores ativados por proteases (PAR) e ativar a pró-uroquinase, indicam essa granzima como possível moduladora da cascata de coagulação (GARZÓN-TITUAÑA *et al.*, 2020; VAN DAALEN; REIJNEVELD; BOVENSCHEN, 2020). Já a respeito da GzmB, sabe-se que pode ser expressa por monócitos, macrófagos, basófilos, mastócitos, células vasculares musculares lisas e pneumócitos, além de ter a capacidade de clivar múltiplos substratos extracelulares (VELOTTI *et al.*, 2020). Assim, a GzmB extracelular pode desencadear uma inflamação persistente/crônica após hiperativar a citocina pró-inflamatória IL-1 α por clivagem; atuar na remodelação da MEC através da clivagem de substratos como fibronectina, laminina e decorim; e regular a cascata de coagulação por meio da clivagem de fibrinogênio e VWF (GARZÓN-TITUAÑA *et al.*, 2020; VELOTTI *et al.*, 2020). Desse modo, os níveis elevados de GzmA e GzmB indicam estas como possíveis agentes chave do processo fisiopatológico da COVID-19 nos pacientes deste estudo, contudo a GzmB merece um olhar especial. Isto porque nas nossas análises de OPLS-DA e PLS-DA os níveis desta granzima foi indicado como o que mais contribuiu para segregação dos grupos

controle e COVID-19, e para a discriminação dos pacientes evoluíram para alta ou óbito.

Agregando a estes resultados, nosso estudo indicou redução das porcentagens séricas de linfócitos T CD4⁺ *naive* (CD4⁺CD8⁻CD45RO⁻CD62L⁺), linfócitos T CD4⁺ de memória efetor (CD4⁺CD8⁻CD45RO⁺CD62L⁻), linfócitos T CD8⁺ de memória efetor (CD4⁻CD8⁺CD45RO⁺CD62L⁻), e linfócitos T CD8⁺ efetor (CD4⁻CD8⁺CD45RO⁻CD62L⁻) nos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2. Sabe-se que os linfócitos T *naive* sofre expansão clonal e diferenciação em linfócitos T de memória, após reconhecimento de antígeno (JARJOUR; MASOPUST; JAMESON, 2021), assim, a redução de linfócitos T CD4⁺ *naive* observada em nossos pacientes, justifica possivelmente a tendência de redução de linfócitos T CD4⁺ efetor e memória central, e de redução dos linfócitos T CD4⁺ efetor. Uma tendência discreta de redução de linfócitos T CD8⁺ *naive* também pode ser observada, o que impactaria na tendência de redução dos linfócitos T CD8⁺ de memória central e na redução dos linfócitos T CD8⁺ efetor e memória efetor. O fato é que a ocorrência de linfopenia com reduções significativas das populações celulares de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em casos graves de COVID-19 já está bem estabelecido na literatura (MOSS, 2022), mas ainda não há um consenso quanto as porcentagens de linfócitos T de memória central e efetor no mesmo cenário. Por exemplo, De Biasi e colaboradores (2020) não observaram alterações nas porcentagens de linfócitos T de memória para nenhuma das subpopulações entre pacientes hospitalizados com COVID-19 com quadro de pneumonia e voluntários saudáveis pareados por idade e sexo (DE BIASI *et al.*, 2020). Já Bekbossynova e colaboradores (2022) compararam as populações celulares de pacientes com COVID-19 que apresentaram pneumonia e observaram um aumento nas subpopulações linfocitárias de memória central e redução nas de memória efetora, tanto para linfócitos T CD4⁺ quanto para CD8⁺ nos indivíduos com pneumonia (BEKBOSSYNOVA *et al.*, 2022). Por sua vez, Rajamanickam e colaboradores analisaram a cinética das subpopulações de linfócitos T de memória, partindo de 15 dias pós-infecção até mais de 180 dias e observou um aumento de linfócitos T de memória central e efetor, tanto para linfócitos T CD4⁺ quanto para CD8⁺ de forma tempo-dependente. Esse mesmo estudo também mostrou redução de linfócitos T de memória CD4⁺ em paciente graves quando confrontados com pacientes leves (RAJAMANICKAM *et al.*, 2022). Desse modo, além de agregar mais dados a respeito das populações linfocitárias de memória central e efetora,

nossos dados possivelmente refletem um cenário característico de severidade da COVID-19.

Outra forma de visualizar os dados da imunofenotipagem é transpô-los para a dinâmica da resposta imunológica em casos severos de COVID-19. Isto porque, sabe-se que o SARS-CoV-2, por meio de ativação excessiva, pode induzir um estado de exaustão dos linfócitos T, caracterizado principalmente pela perda da função efetora (produção de citocinas e/ou atividade citotóxica) e expressão sustentada de receptores inibitórios, como o PD-1, que bloqueiam a ativação celular (RHA; SHIN, 2021; ZHENG, Hong Yi *et al.*, 2020). Este estado, por sua vez, impacta diretamente na produção de uma resposta antiviral efetiva e diferenciação de subpopulações linfocitárias de memória (RHA; SHIN, 2021). Ainda, uma imunidade inata ineficiente pode permitir o avanço da replicação viral no trato respiratório superior e pulmões, bem como inviabilizar um bom preparo de uma resposta imunológica adaptativa, a qual já pode estar suprimida a depender da idade do indivíduo, uma vez que idosos possuem um menor *pool* de linfócitos T *naive* (SETTE; CROTTY, 2021). Assim, as reduções das porcentagens das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ aqui observadas, podem ser reflexo não só da dinâmica do quadro infeccioso, mas também da média de idade dos pacientes incluídos na análise (RYDYZNSKI MODERBACHER *et al.*, 2020).

Ainda com o olhar sob este contexto, Satté e Crotty (2021) estabeleceram um modelo que integra a dinâmica da resposta imunologia com a severidade da COVID-19 e concluíram que na ausência de uma resposta imunológica adaptativa robusta, o sistema imunológico inato passa a ser a única alternativa de combate a infecção, pois muitos estudos encontraram proteínas da imunidade inata e quantidade elevada de neutrófilos no sangue (SETTE; CROTTY, 2021). Desse modo, a elevação de ILC1 e ILC3, assim como a tendência de elevação de ILC2 no grupo COVID-19, podem ser uma das contrapartidas que a imunidade inata provê para o combate da infecção. Em processos inflamatórios as ILCs podem ser encontradas no sangue como consequência de processo migratório interórgãos, a fim de garantir o seu acúmulo em locais que necessitem de reparo tecidual (WILLINGER, 2019). Contudo, as manifestações graves da COVID-19 foram vinculadas a frequência reduzida de ILCs no sangue, pois o indivíduo passaria a ter prejuízos nos mecanismos de tolerância à

doença (KUMAR, Amrita *et al.*, 2021; PRESTI *et al.*, 2022). Dessa forma, o que explicaria nossos achados? Embora não consigamos responder com as técnicas aqui realizadas, algumas hipóteses podem ser realizadas. As mulheres, tendem a produzir uma resposta imunológica mais eficaz para infecção por SARS-CoV-2, e já se sabe que possuem uma abundância geral maior de ILCs e mais funcionais do que os homens (HAITAO *et al.*, 2020; SILVERSTEIN *et al.*, 2021). Como nosso grupo COVID-19 era composto em sua maioria por mulheres, pode ser um fator preponderante nesse aumento observado. Outra teoria é de que mediante a uma linfopenia muito severa como a observada nesses indivíduos, as ILCs possam migrar em uma tentativa desordeira e final de suprir a ausência de linfócitos, o que pode contribuir ainda mais com a piora clínica dos pacientes. Infelizmente poucos estudos focados em ILCs durante a COVID-19 foram realizados e mais precisam ser feitos para que possamos ter uma visão mais ampla de seu envolvimento na patogênese da COVID-19.

Desse modo, é possível propor um contexto que integrem nossos resultados, principalmente se considerarmos a dinâmica da resposta imunológica em casos severos de COVID-19 proposto por Satta e Crotty (2021) e colocarmos a GzmB como elo por esta molécula ter sido evidenciada na análise de OPLS-DA. Desta forma, nossos dados caracterizaram claramente que os pacientes do grupo COVID-19 pertencem ao quadro clínico severo/crítico, reflexo da redução de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ observadas na imunofenotipagem, possivelmente potencializada pela redução de aminoácidos, carotenoides e aumento de lipídeos indicados pelos espectros Raman séricos desses indivíduos. Diante desse cenário, a GzmB extracelular surge como um suporte, visto que além de inibir a cascata de coagulação, juntamente com a GzmA, ela é uma serina protease produzida por células da imunidade inata – pneumócitos, macrófagos, mastócitos, por exemplo (VELOTTI *et al.*, 2020) – que atua não só na transmigração de linfócitos durante processos inflamatórios, devido a sua capacidade de remodelamento da membrana basal (TIBBS; CAO, 2022), mas também na indução indireta da maturação de APCs e ativação de linfócitos T efetores, devido sua capacidade de clivar a proteína C3 do sistema complemento que se liga ao receptor C3aR dessas células e deflagra os processos mencionados (PERL *et al.*, 2012; WEST; KOLEV; KEMPER, 2018). Nesse contexto é mais fácil compreender o porquê dos idosos contribuírem com os altos níveis de GzmB do grupo COVID-19, pois necessitam de um aporte para o sistema

imunológico adaptativo devido a sua depleção imunológica natural e apresentam uma resposta imunológica mais eficiente para infecção por SARS-CoV-2, respectivamente (HAITAO *et al.*, 2020; RYDYZNSKI MODERBACHER *et al.*, 2020). Todavia, uma resposta imunológica que garanta a produção massiva de GzmB extracelular se torna insustentável. Esses níveis elevados possivelmente potencializam sua ação de clivagem de substratos da MEC, que na COVID-19 parece estar atrelada à indução de dano tecidual pulmonar por meio de *anoikis* e de redução à integridade dos vasos sanguíneos, visto que altos níveis de GzmB foram anteriormente associados a doenças pulmonares e cardiovasculares (VELOTTI *et al.*, 2020; ZEGLINSKI; GRANVILLE, 2020).

7. CONCLUSÕES

- Os níveis plasmáticos elevados de GzmA e GzmB nos pacientes com COVID-19, sem a elevação conjunta com PNF e GNLY indica que essas proteases estão desempenhando suas funções extracelulares;
- A GzmB surgiu como variável de maior importância nas análises de PLS-DA e OPLS-DA, indicando a necessidade de novos estudos que elucidem o seu papel na fisiopatologia da COVID-19;
- A espectroscopia Raman foi útil em demonstrar alterações de aminoácidos, carotenoides e lipídios que ajudam a entender o estado clínico do paciente, podendo ser uma ferramenta melhor explorada no futuro para auxiliar na conduta clínica;
- A redução de diferentes subpopulações linfocitárias e o aumento de ILCs merece ser mais bem estudada para caracterizar se isso pode ocorrer como uma desregulação final da resposta imunológica desses pacientes ou como um mecanismo temporário até a produção de novos linfócitos e recuperação dos pacientes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, K. A.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8th ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ACKERMANN, Maximilian; VERLEDEN, Stijn E.; KUEHNEL, Mark; HAVERICH, Axel; WELTE, Tobias; LAENGER, Florian; VANSTAPEL, Arno; WERLEIN, Christopher; STARK, Helge; TZANKOV, Alexandar; LI, William W.; LI, Vincent W.; MENTZER, Steven J.; JONIGK, Danny. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. **New England Journal of Medicine**, vol. 383, no. 2, p. 120–128, 9 Jul. 2020. https://doi.org/10.1056/NEJMOA2015432/SUPPL_FILE/NEJMOA2015432_DISCLOSURES.PDF.

AFKARIAN, Maryam; SEDY, John R.; YANG, Jianfei; JACOBSON, Nils G.; CEREB, Nezhir; YANG, Soo Y.; MURPHY, Theresa L.; MURPHY, Kenneth M. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. **Nature immunology**, vol. 3, no. 6, p. 549–557, 2002. DOI 10.1038/NI794. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12006974/>. Accessed on: 6 Apr. 2022.

AKIRA, Shizuo; UEMATSU, Satoshi; TAKEUCHI, Osamu. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, vol. 124, no. 4, p. 783–801, 24 Feb. 2006. DOI 10.1016/J.CELL.2006.02.015. Available at: <http://www.cell.com/article/S0092867406001905/fulltext>. Accessed on: 12 Dec. 2021.

ANKA, Abubakar Umar; TAHIR, Mohammed Ibrahim; ABUBAKAR, Sharafudeen Dahiru; ALSABBAGH, Mohamed; ZIAN, Zeineb; HAMEDIFAR, Haleh; SABZEVARI, Araz; AZIZI, Gholamreza. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. **Scandinavian Journal of Immunology**, vol. 93, no. 4, 1 Apr. 2021. <https://doi.org/10.1111/SJI.12998>.

ARDAIN, Amanda; PORTERFIELD, James Zachary; KLØVERPRIS, Henrik N.; LESLIE, Alasdair. Type 3 ILCs in Lung Disease. **Frontiers in Immunology**, vol. 10, no. JAN, p. 92, 2019. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00092>.

ARTIS, David; SPITS, Hergen. The biology of innate lymphoid cells. **Nature** 2015 **517:7534**, vol. 517, no. 7534, p. 293–301, 14 Jan. 2015. <https://doi.org/10.1038/nature14189>.

AUJLA, Shean J.; CHAN, Yvonne R.; ZHENG, Mingquan; FEI, Mingjian; ASKEW, David J.; POCIASK, Derek A.; REINHART, Todd A.; MCALLISTER, Florencia; EDEAL, Jennifer; GAUS, Kristi; HUSAIN, Shahid; KREINDLER, James L.; DUBIN, Patricia J.; PILEWSKI, Joseph M.; MYERBURG, Mike M.; MASON, Carol A.; IWAKURA, Yoichiro; KOLLS, Jay K. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. **Nature medicine**, vol. 14, no. 3, p. 275–281, Mar. 2008. DOI 10.1038/NM1710. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18264110/>. Accessed on: 6 Apr. 2022.

AZUMA, Eriko K.; KITAGAWA, Seiichi; YUO, Akira; MIZOGUCHI, Hideaki; UMEZAWA, Kazuo; TAKAKU, Fumimaro; SAITO, Masaki. Activation of the respiratory burst and tyrosine phosphorylation of proteins in human neutrophils: No direct relationship and involvement of protein kinase C-dependent and -independent signaling pathways. **BBA - Molecular Cell Research**, vol. 1179, no. 2, p. 213–223, 7 Nov. 1993. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(93\)90144-E](https://doi.org/10.1016/0167-4889(93)90144-E). Accessed on: 7 Nov. 2022.

BAGGEN, Jim; VANSTREELS, Els; JANSEN, Sander; DAELEMANS, Dirk. Cellular host factors for SARS-CoV-2 infection. **Nature Microbiology** 2021 **6:10**, vol. 6, no. 10, p. 1219–1232, 1 Sep. 2021. DOI 10.1038/s41564-021-00958-0. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41564-021-00958-0>. Accessed on: 14 Oct. 2021.

BAJGAIN, Kalpana Thapa; BADAL, Sujan; BAJGAIN, Bishnu B.; SANTANA, Maria J. Prevalence of comorbidities among individuals with COVID-19: A rapid review of current literature. **American Journal of Infection Control**, vol. 49, no. 2, p. 238, 1 Feb. 2021. DOI 10.1016/J.AJIC.2020.06.213. Available at: </pmc/articles/PMC7351042/>. Accessed on: 2 Nov. 2021.

BANERJEE, Arghya; HALDER, Ankit; JADHAV, Priyanka; SARKAR, Anushka; HOLE, Arti; SHASTRI, Jayanthi S.; AGRAWAL, Sachee; CHILAKAPATI, Murali Krishna; SRIVASTAVA, Sanjeeva. SARS-CoV-2 severity classification from plasma sample using confocal Raman spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, vol. 54, no. 1, p. 124, 1 Jan. 2023. DOI 10.1002/JRS.6461. Available at: </pmc/articles/PMC9874663/>. Accessed on: 7 Feb. 2023.

BANSAL, Manish. Cardiovascular disease and COVID-19. **Diabetes & Metabolic Syndrome**, vol. 14, no. 3, p. 247, 1 May 2020. DOI 10.1016/J.DSX.2020.03.013. Available at: /pmc/articles/PMC7102662/. Accessed on: 16 Oct. 2021.

BARMAN, Hanna; WALCH, Michael; LATINOVIC-GOLIC, Sonja; DUMRESE, Claudia; DOLDER, Max; GROSCURTH, Peter; ZIEGLER, Urs. Cholesterol in negatively charged lipid bilayers modulates the effect of the antimicrobial protein granulysin. **The Journal of membrane biology**, vol. 212, no. 1, p. 29–39, Jul. 2006. <https://doi.org/10.1007/S00232-006-0040-3>.

BARRY, Michele; BLEACKLEY, R. Chris. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. **Nature Reviews Immunology** 2002 2:6, vol. 2, no. 6, p. 401–409, 2002. DOI 10.1038/nri819. Available at: <https://www.nature.com/articles/nri819>. Accessed on: 6 Apr. 2022.

BEKBOSSYNNOVA, Makhabbat; AKHMALTDINOVA, Lyudmila; DOSSYBAYEVA, Kuanysh; TAUEKELOVA, Ainur; SMAGULOVA, Zauresh; TSECHOEVA, Tatyana; TUREBAYEVA, Gulsimzhan; SAILYBAYEVA, Aliya; KALILA, Zhanar; MIRASHIROVA, Tahmina; MURATOV, Timur; PODDIGHE, Dimitri. Central and effector memory T cells in peripheral blood of patients with interstitial pneumonia: preliminary clues from a COVID-19 study. **Respiratory Research**, vol. 23, no. 1, 1 Dec. 2022. DOI 10.1186/S12931-022-02190-8. Available at: /pmc/articles/PMC9549841/. Accessed on: 5 Feb. 2023.

BEUTLER, Bruce. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, vol. 40, no. 12, p. 845–859, 1 Feb. 2004. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2003.10.005>.

BIHORAC, A; BASLANTI, TO; CUENCA, AG; HOBSON, CE; ANG, D; EFRON, PA; MAIER, RV; MOORE, FA; MOLDAWER, LL. Acute kidney injury is associated with early cytokine changes after trauma. **The journal of trauma and acute care surgery**, vol. 74, no. 4, p. 1005–1013, Apr. 2013. DOI 10.1097/TA.0B013E31828586EC. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23511138/>. Accessed on: 22 Oct. 2021.

BITTAR, Cíntia; MACHADO, Rafael Rahal Guaragna; COMELIS, Manuela Tosi; BUENO, Larissa Mayumi; BEGUELINI, Mateus Rodrigues; MORIELLE-VERSUTE, Eliana; NOGUEIRA, Maurício Lacerda; RAHAL, Paula. Alphacoronavirus Detection in Lungs, Liver, and Intestines of Bats from Brazil. **Microbial Ecology**, vol. 79, no. 1, p. 203,

1 Jan. 2020. DOI 10.1007/S00248-019-01391-X. Available at: /pmc/articles/PMC7080140/. Accessed on: 18 Sep. 2021.

BOIVIN, Wendy Anne; COOPER, Dawn Michelle; HIEBERT, Paul Ryan; GRANVILLE, David James. Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma. **Laboratory Investigation** 2009 **89:11**, vol. 89, no. 11, p. 1195–1220, 21 Sep. 2009. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2009.91>.

BOLEY, PA; ALHAMO, MA; LOSSIE, G; YADAV, KK; VASQUEZ-LEE, M; SAIF, LJ; KENNEY, SP. Porcine Deltacoronavirus Infection and Transmission in Poultry, United States 1. **Emerging infectious diseases**, vol. 26, no. 2, p. 255–264, 2020. DOI 10.3201/EID2602.190346. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31961296/>. Accessed on: 18 Sep. 2021.

BORTHWICK, L. A. The IL-1 cytokine family and its role in inflammation and fibrosis in the lung. **Seminars in immunopathology**, vol. 38, no. 4, p. 517–534, 1 Jul. 2016. <https://doi.org/10.1007/S00281-016-0559-Z>.

BOSCH, Berend Jan; ZEE, Ruurd van der; HAAN, Cornelis A. M. de; ROTTIER, Peter J. M. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. **Journal of Virology**, vol. 77, no. 16, p. 8801, 15 Aug. 2003. DOI 10.1128/JVI.77.16.8801-8811.2003. Available at: /pmc/articles/PMC167208/. Accessed on: 4 Oct. 2021.

BOVENSCHEN, Niels; QUADIR, Razi; VAN DEN BERG, Lotte A.; BRENKMAN, Arjan B.; VANDENBERGHE, Isabel; DEVREESE, Bart; JOORE, Jos; KUMMER, Alain J. Granzyme K displays highly restricted substrate specificity that only partially overlaps with granzyme A. **The Journal of biological chemistry**, vol. 284, no. 6, p. 3504–3512, 6 Feb. 2009. <https://doi.org/10.1074/JBC.M806716200>.

BOWIE, A.; O'NEILL, L. A.J. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. **Journal of leukocyte biology**, vol. 67, no. 4, p. 508–514, 2000. <https://doi.org/10.1002/JLB.67.4.508>.

BRASIL, Poder Legislativo. Dispõe sobre o Estatuto do Idoso e dá outras providências. 2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Available at: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/l10.741.htm. Accessed on: 12 Dec. 2022.

BRENNAN, A. J.; CHIA, J.; TRAPANI, J. A.; VOSKOBOINIK, I. Perforin deficiency and susceptibility to cancer. **Cell death and differentiation**, vol. 17, no. 4, p. 607–615, Apr. 2010. <https://doi.org/10.1038/CDD.2009.212>.

BUKHARI, K; MULLEY, G; GULYAEVA, AA; ZHAO, L; SHU, G; JIANG, J; NEUMAN, BW. Description and initial characterization of metatranscriptomic nidovirus-like genomes from the proposed new family Aabyssoviridae, and from a sister group to the Coronavirinae, the proposed genus Alphaletovirus. **Virology**, vol. 524, p. 160–171, 1 Nov. 2018. DOI 10.1016/J.VIROL.2018.08.010. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30199753/>. Accessed on: 18 Sep. 2021.

BUTLER, Holly J.; ASHTON, Lorna; BIRD, Benjamin; CINQUE, Gianfelice; CURTIS, Kelly; DORNEY, Jennifer; ESMONDE-WHITE, Karen; FULLWOOD, Nigel J.; GARDNER, Benjamin; MARTIN-HIRSCH, Pierre L.; WALSH, Michael J.; MCAINSH, Martin R.; STONE, Nicholas; MARTIN, Francis L. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. **Nature protocols**, vol. 11, no. 4, p. 664–687, 1 Apr. 2016. DOI 10.1038/NPROT.2016.036. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26963630/>. Accessed on: 26 Apr. 2023.

BUZZA, Marguerite S.; ZAMURS, Laura; SUN, Jiuru; BIRD, Catherine H.; SMITH, A. Ian; TRAPANI, Joseph A.; FROELICH, Christopher J.; NICE, Edouard C.; BIRD, Phillip I. Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. **The Journal of biological chemistry**, vol. 280, no. 25, p. 23549–23558, 24 Jun. 2005. <https://doi.org/10.1074/JBC.M412001200>.

CALDER, P. C. Fatty acids, dietary lipids and lymphocyte functions. **Biochemical Society transactions**, vol. 23, no. 2, p. 302–309, 1995. DOI 10.1042/BST0230302. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7672330/>. Accessed on: 7 Nov. 2022.

CALDER, P. C.; YAQOUB, P.; THIES, F.; WALLACE, F. A.; MILES, E. A. Fatty acids and lymphocyte functions. **The British journal of nutrition**, vol. 87 Suppl 1, no. S1, p. S31–S48, Jan. 2002. DOI 10.1079/BJN2001455. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11895154/>. Accessed on: 7 Nov. 2022.

CANADAY, David H.; WILKINSON, Robert J.; LI, Qing; HARDING, Clifford V.; SILVER, Richard F.; BOOM, W. Henry. CD4+ and CD8+ T Cells Kill Intracellular Mycobacterium tuberculosis by a Perforin and Fas/Fas Ligand-Independent Mechanism. **The Journal of Immunology**, vol. 167, no. 5, p. 2734–2742, 1 Sep. 2001. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.167.5.2734>.

CANDIDO, Darlan S.; CLARO, Ingra M.; DE JESUS, Jaqueline G.; SOUZA, William M.; MOREIRA, Filipe R.R.; DELLICOUR, Simon; MELLAN, Thomas A.; DU PLESSIS, Louis; PEREIRA, Rafael H.M.; SALES, Flavia C.S.; MANULI, Erika R.; THÉZÉ, Julien; ALMEIDA, Luiz; MENEZES, Mariane T.; VOLOCH, Carolina M.; FUMAGALLI, Marcilio J.; COLETTI, Thaís M.; DA SILVA, Camila A.M.; RAMUNDO, Mariana S.; ... FARIA, Nuno Rodrigues. Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. **Science (New York, N.y.)**, vol. 369, no. 6508, p. 1255–1260, 4 Sep. 2020. DOI 10.1126/SCIENCE.ABD2161. Available at: </pmc/articles/PMC7402630/>. Accessed on: 2 Jan. 2023.

CARTY, Michael; GUY, Coralie; BOWIE, Andrew G. Detection of Viral Infections by Innate Immunity. **Biochemical Pharmacology**, vol. 183, p. 114316, 1 Jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2020.114316>.

CARVALHO, Luis Felipe das Chagas e.Silva de; NOGUEIRA, Marcelo Saito. Optical techniques for fast screening - Towards prevention of the coronavirus COVID-19 outbreak. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, vol. 30, 1 Jun. 2020. DOI 10.1016/J.PDPDT.2020.101765. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32304912/>. Accessed on: 7 Nov. 2022.

CHAI, Wei Ran; CHEN, Yong; WANG, Qian; GAO, Hui Bao. Mechanism of nuclear factor of activated T-cells mediated FasL expression in corticosterone -treated mouse Leydig tumor cells. **BMC cell biology**, vol. 9, 12 Jun. 2008. DOI 10.1186/1471-2121-9-31. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18547442/>. Accessed on: 29 Mar. 2022.

CHAMS, Nour; CHAMS, Sana; BADRAN, Reina; SHAMS, Ali; ARAJI, Abdallah; RAAD, Mohamad; MUKHOPADHYAY, Sanjay; STROBERG, Edana; DUVAL, Eric J.; BARTON, Lisa M.; HUSSEIN, Inaya Hajj. COVID-19: A Multidisciplinary Review. **Frontiers in Public Health**, vol. 8, p. 383, 29 Jul. 2020. DOI 10.3389/FPUBH.2020.00383. Available at: </pmc/articles/PMC7403483/>. Accessed on: 2 Nov. 2021.

CHEN, Dong; LI, Xiaokun; SONG, Qifa; HU, Chenchan; SU, Feifei; DAI, Jianyi; YE, Yinghai; HUANG, Jianping; ZHANG, Xiaoming. Hypokalemia and Clinical Implications in Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **medRxiv**, , p. 2020.02.27.20028530, 29 Feb. 2020. DOI 10.1101/2020.02.27.20028530. Available at: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.27.20028530v1>. Accessed on: 16 Oct. 2021.

CHEN, N; ZHOU, M; DONG, X; QU, J; GONG, F; HAN, Y; QIU, Y; WANG, J; LIU, Y; WEI, Y; XIA, J; YU, T; ZHANG, X; ZHANG, L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **Lancet (London, England)**, vol. 395, no. 10223, p. 507, 15 Feb. 2020. DOI 10.1016/S0140-6736(20)30211-7. Available at: </pmc/articles/PMC7135076/>. Accessed on: 5 Oct. 2021.

CHEN, Qigao; YU, Baodan; YANG, Yihao; HUANG, Jiewen; LIANG, Ying; ZHOU, Jing; LI, Lianzhong; PENG, Xuechun; CHENG, Bolin; LIN, Yongping. Immunological and inflammatory profiles during acute and convalescent phases of severe/ critically ill COVID-19 patients. **International Immunopharmacology**, vol. 97, p. 107685, 1 Aug. 2021. DOI 10.1016/J.INTIMP.2021.107685. Available at: </pmc/articles/PMC8052478/>. Accessed on: 12 Nov. 2022.

CHEN, Yu; LIU, Qianyun; GUO, Deyin. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. **Journal of Medical Virology**, vol. 92, no. 4, p. 418, 1 Apr. 2020. DOI 10.1002/JMV.25681. Available at: </pmc/articles/PMC7167049/>. Accessed on: 4 Oct. 2021.

CHEN, Zeyu; JOHN WHERRY, E. T cell responses in patients with COVID-19. **Nature Reviews Immunology** 2020 20:9, vol. 20, no. 9, p. 529–536, 29 Jul. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0402-6>.

CHENG, Y; LUO, R; WANG, K; ZHANG, M; WANG, Z; DONG, L; LI, J; YAO, Y; GE, S; XU, G. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. **Kidney international**, vol. 97, no. 5, p. 829–838, 1 May 2020. DOI 10.1016/J.KINT.2020.03.005. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32247631/>. Accessed on: 22 Oct. 2021.

CHEW, Boon P. Role of carotenoids in the immune response. **Journal of dairy science**, vol. 76, no. 9, p. 2804–2811, 1993. DOI 10.3168/JDS.S0022-0302(93)77619-5. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8227684/>. Accessed on: 7 Nov. 2022.

CHIOSSONE, Laura; DUMAS, Pierre Yves; VIENNE, Margaux; VIVIER, Eric. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. **Nature Reviews Immunology** 2018 18:11, vol. 18, no. 11, p. 671–688, 12 Sep. 2018a. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0061-z>.

CHIOSSONE, Laura; DUMAS, Pierre Yves; VIENNE, Margaux; VIVIER, Eric. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. **Nature Reviews Immunology** 2018 18:11, vol. 18, no. 11, p. 671–688, 12 Sep. 2018b. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0061-z>.

CHUNG, Wen Hung; HUNG, Shuen lu; YANG, Jui Yung; SU, Shih Chi; HUANG, Shien Ping; WEI, Chun Yu; CHIN, See Wen; CHIOU, Chien Chun; CHU, Sung Chao; HO, Hsin Chun; YANG, Chih Hsun; LU, Chi Fang; WU, Jer Yuarn; LIAO, You Di; CHEN, Yuan Tsong. Granulysin is a key mediator for disseminated keratinocyte death in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. **Nature medicine**, vol. 14, no. 12, p. 1343–1350, Dec. 2008. <https://doi.org/10.1038/NM.1884>.

CIEVS/AL. Informe Epidemiológico - Monitoramento da Emergência - COVID-19. 28 Feb. 2023. Available at: <https://drive.google.com/drive/folders/1tr2-Dj54tljVwv8j2NptfpdQ7N2xNsKe>. Accessed on: 10 Mar. 2023.

CROTTY, Shane. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. **Immunity**, vol. 41, no. 4, p. 529, 10 Oct. 2014. DOI 10.1016/J.IMMUNI.2014.10.004. Available at: </pmc/articles/PMC4223692/>. Accessed on: 4 Oct. 2022.

CUI, Lei; WANG, Haiying; JI, Yanxi; YANG, Jie; XU, Shan; HUANG, Xingyu; WANG, Zidao; QIN, Lei; TIEN, Po; ZHOU, Xi; GUO, Deyin; CHEN, Yu. The Nucleocapsid Protein of Coronaviruses Acts as a Viral Suppressor of RNA Silencing in Mammalian Cells. **Journal of Virology**, vol. 89, no. 17, p. 9029, 1 Sep. 2015. DOI 10.1128/JVI.01331-15. Available at: </pmc/articles/PMC4524063/>. Accessed on: 4 Oct. 2021.

DA SILVA, Severino Jefferson Ribeiro; DO NASCIMENTO, Jessica Catarine Frutuoso; GERMANO MENDES, Renata Pessôa; GUARINES, Klarissa Miranda; TARGINO ALVES DA SILVA, Caroline; DA SILVA, Poliana Gomes; DE MAGALHÃES, Jurandy Júnior Ferraz; VIGAR, Justin R.J.; SILVA-JÚNIOR, Abelardo; KOHL, Alain; PARDEE, Keith; PENA, Lindomar. Two Years into the COVID-19 Pandemic: Lessons Learned. **ACS infectious diseases**, vol. 8, no. 9, p. 1758–1814, 9 Sep. 2022. DOI 10.1021/ACSINFECDIS.2C00204. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35940589/>. Accessed on: 27 Apr. 2023.

DALLEGRI, Franco; OTTONELLO, Luciano; TORTOLINA, Giuseppe; AMELOTTI, Massimo. **Soluble Fas Ligand Is Chemotactic for Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocytes**. [S. l.: s. n.], 1999. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/162/6/3601>.

DAVIS, Hannah E.; ASSAF, Gina S.; MCCORKELL, Lisa; WEI, Hannah; LOW, Ryan J.; RE'EM, Yochai; REDFIELD, Signe; AUSTIN, Jared P.; AKRAMI, Athena. Characterizing long COVID in an international cohort: 7 months of symptoms and their impact. **EClinicalMedicine**, vol. 38, 1 Aug. 2021. DOI 10.1016/J.ECLINM.2021.101019. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34308300/>. Accessed on: 26 Apr. 2023.

DAVIS, Hannah E.; MCCORKELL, Lisa; VOGEL, Julia Moore; TOPOL, Eric J. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. **Nature Reviews. Microbiology**, vol. 21, no. 3, p. 133, 1 Mar. 2023. DOI 10.1038/S41579-022-00846-2. Available at: </pmc/articles/PMC9839201/>. Accessed on: 26 Apr. 2023.

DE BIASI, Sara; MESCHIARI, Marianna; GIBELLINI, Lara; BELLINAZZI, Caterina; BORELLA, Rebecca; FIDANZA, Lucia; GOZZI, Licia; IANNONE, Anna; LO TARTARO, Domenico; MATTIOLI, Marco; PAOLINI, Annamaria; MENOZZI, Marianna; MILIĆ, Jovana; FRANCESCHI, Giacomo; FANTINI, Riccardo; TONELLI, Roberto; SITA, Marco; SARTI, Mario; TRENTI, Tommaso; ... COSSARIZZA, Andrea. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. **Nature communications**, vol. 11, no. 1, 1 Dec. 2020. DOI 10.1038/S41467-020-17292-4. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32632085/>. Accessed on: 5 Feb. 2023.

DE SAINT BASILE, Geneviève; MÉNASCHÉ, Gaël; FISCHER, Alain. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. **Nature Reviews Immunology** 2010 10:8, vol. 10, no. 8, p. 568–579, 16 Jul. 2010. <https://doi.org/10.1038/nri2803>.

DE WEERD, Nicole A.; SAMARAJIWA, Shamith A.; HERTZOG, Paul J. Type I Interferon Receptors: Biochemistry and Biological Functions. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 282, no. 28, p. 20053–20057, 13 Jul. 2007. <https://doi.org/10.1074/JBC.R700006200>.

DESAI, Sanket; MISHRA, Saket v.; JOSHI, Asim; SARKAR, Debashmita; HOLE, Arti; MISHRA, Rohit; DUTT, Shilpee; CHILAKAPATI, Murali K.; GUPTA, Sudeep; DUTT, Amit. Raman spectroscopy-based detection of RNA viruses in saliva: A preliminary report. **Journal of biophotonics**, vol. 13, no. 10, 1 Oct. 2020. DOI 10.1002/JBIO.202000189. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32609429/>. Accessed on: 7 Nov. 2022.

DONOGHUE, M; HSIEH, F; BARONAS, E; GODBOUT, K; GOSSELIN, M; STAGLIANO, N; DONOVAN, M; WOOLF, B; ROBISON, K; JEYASEELAN, R; BREITBART, RE; ACTON, S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circulation research**, vol. 87, no. 5, 2000. DOI 10.1161/01.RES.87.5.E1. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10969042/>. Accessed on: 14 Oct. 2021.

DOTIWALA, Farokh; LIEBERMAN, Judy. Granulysin: killer lymphocyte safeguard against microbes. **Current opinion in immunology**, vol. 60, p. 19–29, 1 Oct. 2019. DOI 10.1016/J.COI.2019.04.013. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31112765/>. Accessed on: 16 Mar. 2022.

EYERICH, Stefanie; EYERICH, Kilian; PENNINO, Davide; CARBONE, Teresa; NASORRI, Francesca; PALLOTTA, Sabatino; CIANFARANI, Francesca; ODORISIO, Teresa; TRAILD-HOFFMANN, Claudia; BEHRENDT, Heidrun; DURHAM, Stephen R.; SCHMIDT-WEBER, Carsten B.; CAVANI, Andrea. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. **The Journal of clinical investigation**, vol. 119, no. 12, p. 3573–3585, 1 Dec. 2009. DOI 10.1172/JCI40202. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19920355/>. Accessed on: 4 Oct. 2022.

FADHILAH, AS; KAI, TH; LOKMAN, HI; YASMIN, NAR; HAFANDI, A; HASLIZA, AH; TENGGU RINALFI, TA; HEZMEE, MNM. Molecular and pathogenicity of infectious bronchitis virus (Gammacoronavirus) in Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Poultry science**, vol. 99, no. 6, p. 2937–2943, 1 Jun. 2020. DOI 10.1016/J.PSJ.2020.01.026. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32475428/>. Accessed on: 18 Sep. 2021.

FANG, Li. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. **Annual review of virology**, vol. 3, no. 1, p. 237–261, 29 Sep. 2016. DOI 10.1146/ANNUREV-VIROLOGY-110615-042301. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27578435/>. Accessed on: 14 Oct. 2021.

FREEMAN, Gordon J.; LONG, Andrew J.; IWAI, Yoshiko; BOURQUE, Karen; CHERNOVA, Tatyana; NISHIMURA, Hiroyuki; FITZ, Lori J.; MALENKOVICH, Nelly; OKAZAKI, Taku; BYRNE, Michael C.; HORTON, Heidi F.; FOUSSER, Lynette; CARTER, Laura; LING, Vincent; BOWMAN, Michael R.; CARRENO, Beatriz M.; COLLINS, Mary; WOOD, Clive R.; HONJO, Tasuku. Engagement of the Pd-1 Inhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 192, no. 7, p. 1027–1034, 2 Oct. 2000. <https://doi.org/10.1084/JEM.192.7.1027>.

FRISCH, Steven M.; FRANCIS, Hunter. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. **The Journal of cell biology**, vol. 124, no. 4, p. 619–626, 1994. <https://doi.org/10.1083/JCB.124.4.619>.

GALANOPOULOS, Michail; GKEROS, Filippou; DOUKATAS, Aris; KARIANAKIS, Grigorios; PONTAS, Christos; TSOUKALAS, Nikolaos; VIAZIS, Nikos; LIATSOS, Christos; MANTZARIS, Gerassimos J. COVID-19 pandemic: Pathophysiology and manifestations from the gastrointestinal tract. **World Journal of Gastroenterology**, vol. 26, no. 31, p. 4579, 21 Aug. 2020. DOI 10.3748/WJG.V26.I31.4579. Available at: </pmc/articles/PMC7445869/>. Accessed on: 26 Oct. 2021.

GAO, Zhiru; XU, Yinghui; SUN, Chao; WANG, Xu; GUO, Ye; QIU, Shi; MA, Kewei. A systematic review of asymptomatic infections with COVID-19. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, vol. 54, no. 1, p. 12, 1 Feb. 2021. DOI 10.1016/J.JMII.2020.05.001. Available at: </pmc/articles/PMC7227597/>. Accessed on: 4 Nov. 2021.

GARZÓN-TITUAÑA, Marcela; ARIAS, Maykel A.; SIERRA-MONZÓN, José L.; MORTE-ROMEA, Elena; SANTIAGO, Llpsy; RAMIREZ-LABRADA, Ariel; MARTINEZ-LOSTAO, Luis; PAÑO-PARDO, José R.; GALVEZ, Eva M.; PARDO, Julián. The Multifaceted Function of Granzymes in Sepsis: Some Facts and a Lot to Discover. **Frontiers in immunology**, vol. 11, 17 Jun. 2020. DOI 10.3389/FIMMU.2020.01054. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32655547/>. Accessed on: 8 Jan. 2023.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, Evangelos J.; NETEA, Mihai G.; ROVINA, Nikoletta; AKINOSOGLOU, Karolina; ANTONIADOU, Anastasia; ANTONAKOS, Nikolaos; DAMORAKI, Georgia; GKAVOGIANNI, Theologia; ADAMI, Maria Evangelia; KATSAOUNOU, Paraskevi; NTAGANOU, Maria; KYRIAKOPOULOU, Magdalini; DIMOPOULOS, George; KOUTSODIMITROPOULOS, Ioannis; VELISSARIS, Dimitrios; KOUFARGYRIS, Panagiotis; KARAGEORGOS, Athanassios; KATRINI, Konstantina; LEKAKIS, Vasileios; ... KOUTSOUKOU, Antonia. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. **Cell Host & Microbe**, vol. 27, no. 6, p. 992, 10 Jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2020.04.009>.

GORBALENYA, Alexander E.; BAKER, Susan C.; BARIC, Ralph S.; DE GROOT, Raoul J.; DROSTEN, Christian; GULYAEVA, Anastasia A.; HAAGMANS, Bart L.; LAUBER, Chris; LEONTOVICH, Andrey M.; NEUMAN, Benjamin W.; PENZAR, Dmitry; PERLMAN, Stanley; POON, Leo L.M.; SAMBORSKIY, Dmitry v.; SIDOROV, Igor A.; SOLA, Isabel; ZIEBUHR, John. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology** **2020 5:4**, vol. 5, no. 4, p. 536–544, 2 Mar. 2020. DOI 10.1038/s41564-020-0695-z. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41564-020-0695-z>. Accessed on: 5 Oct. 2021.

GORBALENYA, Alexander E.; ENJUANES, Luis; ZIEBUHR, John; SNIJDER, Eric J. Nidovirales: Evolving the largest RNA virus genome. **Virus Research**, vol. 117, no. 1, p. 17, 2006. DOI 10.1016/J.VIRUSRES.2006.01.017. Available at: </pmc/articles/PMC7114179/>. Accessed on: 18 Sep. 2021.

GÖSCHL, Lisa; SCHEINECKER, Clemens; BONELLI, Michael. Treg cells in autoimmunity: from identification to Treg-based therapies. **Seminars in Immunopathology** **2019 41:3**, vol. 41, no. 3, p. 301–314, 5 Apr. 2019. DOI 10.1007/S00281-019-00741-8. Available at:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00281-019-00741-8>. Accessed on: 30 Sep. 2022.

GOULART, Ana Cristina Castro; SILVEIRA, Landulfo; CARVALHO, Henrique Cunha; DORTA, Cristiane Bissoli; PACHECO, Marcos Tadeu T.; ZÂNGARO, Renato Amaro. Diagnosing COVID-19 in human serum using Raman spectroscopy. **Lasers in Medical Science**, vol. 37, no. 4, p. 2217, 1 Jun. 2022. DOI 10.1007/S10103-021-03488-7. Available at: </pmc/articles/PMC8758209/>. Accessed on: 7 Nov. 2022.

GOULART, Ana Cristina Castro; ZÂNGARO, Renato Amaro; CARVALHO, Henrique Cunha; SILVEIRA, Landulfo. Diagnosing COVID-19 in human sera with detected immunoglobulins IgM and IgG by means of Raman spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, vol. 52, no. 12, p. 2671, 1 Dec. 2021. DOI 10.1002/JRS.6235. Available at: </pmc/articles/PMC8427108/>. Accessed on: 7 Nov. 2022.

GRACILIANO, Nayara Gomes; TENÓRIO, Micaely Cristinados Santos; FRAGOSO, Marilene Brandão Tenório; MOURA, Fabiana Andréa; BOTELHO, Rayane Martins; TANABE, Eloiza Lopes Lira; BORBELY, Karen Steponavicius Cruz; BORBELY, Alexandre Urban; OLIVEIRA, Alane Cabral Menezes; GOULART, Marília Oliveira Fonseca. The impact on colostrum oxidative stress, cytokines, and immune cells composition after SARS-CoV-2 infection during pregnancy. **Frontiers in Immunology**, vol. 13, p. 7628, 15 Dec. 2022. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.1031248/BIBTEX>. Accessed on: 12 Mar. 2023.

GRUDZIEN, Malgorzata; RAPAK, Andrzej. Effect of Natural Compounds on NK Cell Activation. **Journal of Immunology Research**, vol. 2018, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4868417>.

GU, J; HAN, B; WANG, J. COVID-19: Gastrointestinal Manifestations and Potential Fecal-Oral Transmission. **Gastroenterology**, vol. 158, no. 6, p. 1518–1519, 1 May 2020. DOI 10.1053/J.GASTRO.2020.02.054. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32142785/>. Accessed on: 26 Oct. 2021.

GUAN, Y; ZHENG, BJ; HE, YQ; LIU, XL; ZHUANG, ZX; CHEUNG, CL; LUO, SW; LI, PH; ZHANG, LJ; GUAN, YJ; BUTT, KM; WONG, KL; CHAN, KW; LIM, W; SHORTRIDGE, KF; YUEN, KY; PEIRIS, JS; POON, LL. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. **Science (New**

York, N.Y.), vol. 302, no. 5643, p. 276–278, 10 Oct. 2003. DOI 10.1126/SCIENCE.1087139. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12958366/>. Accessed on: 18 Sep. 2021.

GUSTINE, Joshua N.; JONES, Dennis. Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19. **The American journal of pathology**, vol. 191, no. 1, p. 4–17, 1 Jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.AJP.2020.08.009>.

HAITAO, Tu; VERMUNT, Jane v.; ABEYKOON, Jithma; GHAMRAWI, Ranine; GUNARATNE, Madugodaralalage; JAYACHANDRAN, Muthuvel; NARANG, Kavita; PARASHURAM, Santosh; SUVAKOV, Sonja; GAROVIC, Vesna D. COVID-19 and Sex Differences: Mechanisms and Biomarkers. **Mayo Clinic Proceedings**, vol. 95, no. 10, p. 2189, 1 Oct. 2020. DOI 10.1016/J.MAYOCP.2020.07.024. Available at: </pmc/articles/PMC7402208/>. Accessed on: 7 Feb. 2023.

HAMIDZADEH, Kajal; CHRISTENSEN, Stephen M.; DALBY, Elizabeth; CHANDRASEKARAN, Prabha; MOSSER, David M. Macrophages and the Recovery from Acute and Chronic Inflammation. **Annual review of physiology**, vol. 79, p. 567, 10 Feb. 2017. DOI 10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-022516-034348. Available at: </pmc/articles/PMC5912892/>. Accessed on: 6 Apr. 2022.

HARRISON, Andrew G.; LIN, Tao; WANG, Penghua. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. **Trends in Immunology**, vol. 41, no. 12, p. 1100, 1 Dec. 2020. DOI 10.1016/J.IT.2020.10.004. Available at: </pmc/articles/PMC7556779/>. Accessed on: 5 Oct. 2021.

HE, Lei; ZHANG, Quan; ZHANG, Yue; FAN, Yixian; YUAN, Fahu; LI, Songming. Single-cell analysis reveals cell communication triggered by macrophages associated with the reduction and exhaustion of CD8 + T cells in COVID-19. **Cell communication and signaling : CCS**, vol. 19, no. 1, 1 Dec. 2021. <https://doi.org/10.1186/S12964-021-00754-7>.

HERNÁNDEZ-SOLIS, Alejandro; GÜEMES-GONZÁLEZ, Azmavet M.; RUIZ-GÓMEZ, Ximena; ÁLVAREZ-MALDONADO, Pablo; CASTAÑEDA-CASIMIRO, Jessica; FLORES-LÓPEZ, Argelia; RAMÍREZ-GUERRA, Martha Alicia; MUÑOZ-MIRANDA, Omar; MADERA-SANDOVAL, Ruth L.; ARRIAGA-PIZANO, Lourdes A.; NIETO-PATLÁN, Alejandro; ESTRADA-PARRA, Sergio; PÉREZ-TAPIA, Sonia Mayra; SERAFÍN-LÓPEZ,

Jeanet; CHACÓN-SALINAS, Rommel; ESCOBAR-GUTIÉRREZ, Alejandro; SORIA-CASTRO, Rodolfo; RUIZ-SÁNCHEZ, Bibiana Patricia; WONG-BAEZA, Isabel. IL-6, IL-10, sFas, granulysin and indicators of intestinal permeability as early biomarkers for a fatal outcome in COVID-19. **Immunobiology**, vol. 227, no. 6, p. 152288, Nov. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2022.152288>.

HIEBERT, Paul R.; GRANVILLE, David J. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. **Trends in molecular medicine**, vol. 18, no. 12, p. 732–741, Dec. 2012. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2012.09.009>.

HILDRETH, Andrew D.; O'SULLIVAN, Timothy E. Tissue-Resident Innate and Innate-Like Lymphocyte Responses to Viral Infection. **Viruses**, vol. 11, no. 3, 1 Mar. 2019. <https://doi.org/10.3390/V11030272>.

HIRAYASU, Hirofumi; YOSHIKAWA, Yumiko; TSUZUKI, Satoshi; FUSHIKI, Tohru. A lymphocyte serine protease granzyme A causes detachment of a small-intestinal epithelial cell line (IEC-6). **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, vol. 72, no. 9, p. 2294–2302, 2008. <https://doi.org/10.1271/BBB.80140>.

HOLMES, Kathryn v. CORONAVIRUSES (CORONAVIRIDAE). **Encyclopedia of Virology**, , p. 291, 1999. DOI 10.1006/RWVI.1999.0055. Available at: </pmc/articles/PMC7150129/>. Accessed on: 18 Sep. 2021.

HONGO, Ayumi; KANASEKI, Takayuki; TOKITA, Serina; KOCHIN, Vitaly; MIYAMOTO, Sho; HASHINO, Yuiko; CODD, Amy; KAWAI, Noriko; NAKATSUGAWA, Munehide; HIROHASHI, Yoshihiko; SATO, Noriyuki; TORIGOE, Toshihiko. Upstream Position of Proline Defines Peptide-HLA Class I Repertoire Formation and CD8+ T Cell Responses. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, vol. 202, no. 10, p. 2849–2855, 15 May 2019. DOI 10.4049/JIMMUNOL.1900029. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30936292/>. Accessed on: 6 Nov. 2022.

HOU, Yixuan J.; OKUDA, Kenichi; EDWARDS, Caitlin E.; MARTINEZ, David R.; ASAKURA, Takanori; DINNON, Kenneth H.; KATO, Takafumi; LEE, Rhianna E.; YOUNT, Boyd L.; MASCENIK, Teresa M.; CHEN, Gang; OLIVIER, Kenneth N.; GHIO, Andrew; TSE, Longping v.; LEIST, Sarah R.; GRALINSKI, Lisa E.; SCHÄFER, Alexandra; DANG, Hong; GILMORE, Rodney; ... BARIC, Ralph S. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. **Cell**, vol. 182, no. 2, p. 429, 23 Jul.

2020. DOI 10.1016/J.CELL.2020.05.042. Available at: </pmc/articles/PMC7250779/>. Accessed on: 3 Nov. 2021.

HUI, Kenrie P.Y.; CHEUNG, Man Chun; PERERA, Ranawaka A.P.M.; NG, Ka Chun; BUI, Christine H.T.; HO, John C.W.; NG, Mandy M.T.; KUOK, Denise I.T.; SHIH, Kendrick C.; TSAO, Sai Wah; POON, Leo L.M.; PEIRIS, Malik; NICHOLLS, John M.; CHAN, Michael C.W. Tropism, replication competence, and innate immune responses of the coronavirus SARS-CoV-2 in human respiratory tract and conjunctiva: an analysis in ex-vivo and in-vitro cultures. **The Lancet. Respiratory medicine**, vol. 8, no. 7, p. 687–695, 1 Jul. 2020. DOI 10.1016/S2213-2600(20)30193-4. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32386571/>. Accessed on: 3 Nov. 2021.

HULSWIT, RJG; HAAN, CAM; BOSCH, B-J. Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. **Advances in virus research**, vol. 96, p. 29–57, 1 Dec. 2016. DOI 10.1016/BS.AIVIR.2016.08.004. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27712627/>. Accessed on: 14 Oct. 2021.

HUSAIN-SYED, F; SLUTSKY, AS; RONCO, C. Lung-Kidney Cross-Talk in the Critically Ill Patient. **American journal of respiratory and critical care medicine**, vol. 194, no. 4, p. 402–414, 15 Aug. 2016. DOI 10.1164/RCCM.201602-0420CP. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27337068/>. Accessed on: 22 Oct. 2021.

IRMLER, Martin; HERTIG, Silvie; ROBSON MACDONALD, H.; SADOUL, Remy; BECHERER, J. D.; PROUDFOOT, Amanda; SOLARI, Roberto; TSCHOPP, Jürg. Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. **The Journal of experimental medicine**, vol. 181, no. 5, p. 1917–1922, 1 May 1995. <https://doi.org/10.1084/JEM.181.5.1917>.

IRÚN, Pilar; GRACIA, Rafael; PIAZUELO, Elena; PARDO, Julián; MORTE, Elena; PAÑO, José Ramon; BOZA, Julio; CARRERA-LASFUENTES, Patricia; HIGUERA, Gustavo A.; LANAS, Angel. Serum lipid mediator profiles in COVID-19 patients and lung disease severity: a pilot study. **Scientific Reports**, vol. 13, no. 1, p. 6497, 20 Apr. 2023. DOI 10.1038/S41598-023-33682-2. Available at: </pmc/articles/PMC10118224/>. Accessed on: 27 Apr. 2023.

ISE, W.; KUROSAKI, T. Regulation of Plasma Cell Differentiation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, vol. 1254, p. 63–74, 2020. DOI 10.1007/978-981-

15-3532-1_6. Available at: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-3532-1_6. Accessed on: 6 Apr. 2022.

IVANOV, Ivaylo I.; MCKENZIE, Brent S.; ZHOU, Liang; TADOKORO, Carlos E.; LEPELLEY, Alice; LAFAILLE, Juan J.; CUA, Daniel J.; LITTMAN, Dan R. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell**, vol. 126, no. 6, p. 1121–1133, 22 Sep. 2006. DOI 10.1016/J.CELL.2006.07.035. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16990136/>. Accessed on: 6 Apr. 2022.

IVASHKIV, Lionel B.; DONLIN, Laura T. Regulation of type I interferon responses. **Nature Reviews Immunology** 2014 14:1, vol. 14, no. 1, p. 36–49, 23 Dec. 2013. <https://doi.org/10.1038/nri3581>.

IWASAKI, Akiko; MEDZHITOV, Ruslan. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature Immunology** 2015 16:4, vol. 16, no. 4, p. 343–353, 19 Mar. 2015. DOI 10.1038/ni.3123. Available at: <https://www.nature.com/articles/ni.3123>. Accessed on: 12 Dec. 2021.

IZCOVICH, Ariel; RAGUSA, Martín Alberto; TORTOSA, Fernando; MARZIO, María Andrea Lavena; AGNOLETTI, Camila; BENGOLEA, Agustín; CEIRANO, Agustina; ESPINOSA, Federico; SAAVEDRA, Ezequiel; SANGUINE, Verónica; TASSARA, Alfredo; CID, Candelaria; CATALANO, Hugo Norberto; AGARWAL, Arnav; FOROUTAN, Farid; RADA, Gabriel. Prognostic factors for severity and mortality in patients infected with COVID-19: A systematic review. **PLoS ONE**, vol. 15, no. 11, 1 Nov. 2020. DOI 10.1371/JOURNAL.PONE.0241955. Available at: </pmc/articles/PMC7671522/>. Accessed on: 7 Nov. 2021.

JANKA, G. E. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. **Annual review of medicine**, vol. 63, p. 233–246, 2012. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MED-041610-134208>.

JARJOUR, Nicholas N.; MASOPUST, David; JAMESON, Stephen C. T Cell Memory: Understanding COVID-19. **Immunity**, vol. 54, no. 1, p. 14–18, 12 Jan. 2021. DOI 10.1016/J.IMMUNI.2020.12.009. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33406391/>. Accessed on: 5 Feb. 2023.

JIA, Lei; WU, Changyou. T Helper Cell Differentiation and Their Function. **Advances in experimental medicine and biology**, vol. 841, p. 209–30, 2014. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25261209>. Accessed on: 4 Oct. 2022.

JIN, Yuefei; YANG, Haiyan; JI, Wangquan; WU, Weidong; CHEN, Shuaiyin; ZHANG, Weiguo; DUAN, Guangcai. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. **Viruses**, vol. 12, no. 4, 2020. DOI 10.3390/V12040372. Available at: </pmc/articles/PMC7232198/>. Accessed on: 14 Oct. 2021.

JOECKEL, Lars T.; BIRD, Phillip I. Are all granzymes cytotoxic in vivo? **Biological Chemistry**, vol. 395, no. 2, p. 181–202, 1 Feb. 2014. DOI 10.1515/HSZ-2013-0238/ASSET/GRAPHIC/J_HSZ-2013-0238_FIG_002.JPG. Available at: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/hsz-2013-0238/html>. Accessed on: 8 Jan. 2023.

JONGSTRA, Jan; SCHALL, Thomas J.; DYER, Bradley J.; CLAYBERGER, Carol; JORGENSEN, Jeffrey; DAVIS, Mark M.; KRENSKY, Alan M. The isolation and sequence of a novel gene from a human functional T cell line. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 165, no. 3, p. 601–614, 1 Mar. 1987. <https://doi.org/10.1084/JEM.165.3.601>.

KAK, Gunjan; RAZA, Mohsin; TIWARI, Brijendra K. Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. **Biomolecular Concepts**, vol. 9, no. 1, p. 64–79, 1 Jan. 2018. <https://doi.org/10.1515/BMC-2018-0007/MACHINEREADABLECITATION/RIS>.

KANG, Chang Kyung; HAN, Gi Chan; KIM, Minji; KIM, Gwanghun; SHIN, Hyun Mu; SONG, Kyoung Ho; CHOE, Pyoeng Gyun; PARK, Wan Beom; KIM, Eu Suk; KIM, Hong bin; KIM, Nam Joong; KIM, Hang Rae; OH, Myoung don. Aberrant hyperactivation of cytotoxic T-cell as a potential determinant of COVID-19 severity. **International Journal of Infectious Diseases**, vol. 97, p. 313, 1 Aug. 2020. DOI 10.1016/J.IJID.2020.05.106. Available at: </pmc/articles/PMC7261468/>. Accessed on: 12 Nov. 2022.

KANG, Chang Kyung; SONG, Kyoung-Ho; CHOE, Pyoeng Gyun; PARK, Wan Beom; BANG, Ji Hwan; KIM, Eu Suk; PARK, Sang Won; KIM, Hong bin; KIM, Nam Joong; CHO, Sung-il; LEE, Jong-koo; OH, Myoung-don. Clinical and Epidemiologic Characteristics of Spreaders of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus during the 2015 Outbreak in Korea. **Journal of Korean Medical Science**, vol. 32, no. 5, p. 744, 1

May 2017. DOI 10.3346/JKMS.2017.32.5.744. Available at: </pmc/articles/PMC5383605/>. Accessed on: 18 Sep. 2021.

KAPLAN, Mark H.; SCHINDLER, Ulrike; SMILEY, Stephen T.; GRUSBY, Michael J. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. **Immunity**, vol. 4, no. 3, p. 313–319, 1996. DOI 10.1016/S1074-7613(00)80439-2. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8624821/>. Accessed on: 6 Apr. 2022.

KNIGHT, Stella C.; STAGG, Andrew J. Antigen-presenting cell types. **Current Opinion in Immunology**, vol. 5, no. 3, p. 374–382, 1 Jun. 1993. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(93\)90056-X](https://doi.org/10.1016/0952-7915(93)90056-X). Accessed on: 6 Apr. 2022.

KORN, Thomas; BETTELLI, Estelle; OUKKA, Mohamed; KUCHROO, Vijay K. IL-17 and Th17 Cells. **Annual review of immunology**, vol. 27, p. 485–517, 2009. DOI 10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.021908.132710. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19132915/>. Accessed on: 6 Apr. 2022.

KOYAMA, Shohei; ISHII, Ken J.; COBAN, Cevayir; AKIRA, Shizuo. Innate immune response to viral infection. **Cytokine**, vol. 43, no. 3, p. 336–341, 1 Sep. 2008. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2008.07.009>.

KRÄMER, Benjamin; KNOLL, Rainer; BONAGURO, Lorenzo; TOVINH, Michael; RAABE, Jan; ASTABURUAGA-GARCÍA, Rosario; SCHULTE-SCHREPPING, Jonas; KAISER, Kim Melanie; RIEKE, Gereon J.; BISCHOFF, Jenny; MONIN, Malte B.; HOFFMEISTER, Christoph; SCHLABE, Stefan; DE DOMENICO, Elena; REUSCH, Nico; HÄNDLER, Kristian; REYNOLDS, Gary; BLÜTHGEN, Nils; HACK, Gudrun; ... NATTERMANN, Jacob. Early IFN- α signatures and persistent dysfunction are distinguishing features of NK cells in severe COVID-19. **Immunity**, vol. 54, no. 11, p. 2650-2669.e14, 9 Nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2021.09.002>.

KRENSKY, A. M.; CLAYBERGER, C. Biology and clinical relevance of granulysin. **Tissue Antigens**, vol. 73, no. 3, p. 193–198, 1 Mar. 2009. <https://doi.org/10.1111/J.1399-0039.2008.01218.X>.

KUMAR, Amrita; CAO, Weiping; ENDRIAS, Kedan; KUCHIPUDI, Suresh v.; MITTAL, Suresh K.; SAMBHARA, Suryaprakash. Innate lymphoid cells (ILC) in SARS-CoV-2 infection. **Molecular Aspects of Medicine**, vol. 80, p. 101008, 1 Aug. 2021. DOI

10.1016/J.MAM.2021.101008. Available at: </pmc/articles/PMC8361007/>. Accessed on: 6 Feb. 2023.

KUMAR, M; KHODOR, SA. Pathophysiology and treatment strategies for COVID-19. **Journal of Translational Medicine**, vol. 18, no. 1, 15 Sep. 2020. DOI 10.1186/S12967-020-02520-8. Available at: </pmc/articles/PMC7491044/>. Accessed on: 15 Oct. 2021.

KUMAR, Manoj; AL KHODOR, Souhaila. Pathophysiology and treatment strategies for COVID-19. **Journal of Translational Medicine**, vol. 18, no. 1, p. 1–9, 15 Sep. 2020. DOI 10.1186/S12967-020-02520-8/TABLES/2. Available at: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-020-02520-8>. Accessed on: 16 Oct. 2022.

KUMAR, Santosh. Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors. **Immunology**, vol. 154, no. 3, p. 383, 1 Jul. 2018. DOI 10.1111/IMM.12921. Available at: </pmc/articles/PMC6002213/>. Accessed on: 13 Dec. 2021.

KURI-CERVANTES, Leticia; PAMPENA, M. Betina; MENG, Wenzhao; ROSENFELD, Aaron M.; ITTNER, Caroline A.G.; WEISMAN, Ariel R.; AGYEKUM, Roseline S.; MATHEW, Divij; BAXTER, Amy E.; VELLA, Laura A.; KUTHURU, Oliva; APOSTOLIDIS, Sokratis A.; BERSHAW, Luanne; DOUGHERTY, Jeanette; GREENPLATE, Allison R.; PATTEKAR, Ajinkya; KIM, Justin; HAN, Nicholas; GOUMA, Sigrid; ... BETTS, Michael R. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. **Science Immunology**, vol. 5, no. 49, 1 Jul. 2020. <https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.ABD7114>.

LAING, Adam G.; LORENC, Anna; DEL MOLINO DEL BARRIO, Irene; DAS, Abhishek; FISH, Matthew; MONIN, Leticia; MUÑOZ-RUIZ, Miguel; MCKENZIE, Duncan R.; HAYDAY, Thomas S.; FRANCOS-QUIJORNA, Isaac; KAMDAR, Shraddha; JOSEPH, Magdalene; DAVIES, Daniel; DAVIS, Richard; JENNINGS, Aislinn; ZLATAREVA, Iva; VANTOUROUT, Pierre; WU, Yin; SOFRA, Vasiliki; ... HAYDAY, Adrian C. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. **Nature Medicine** **2020 26:10**, vol. 26, no. 10, p. 1623–1635, 17 Aug. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1038-6>.

LARSEN, CP; BOURNE, TD; WILSON, JD; SAQQA, O; SHARSHIR, MA. Collapsing Glomerulopathy in a Patient With COVID-19. **Kidney international reports**, vol. 5, no. 6, p. 935–939, 1 Jun. 2020. DOI 10.1016/J.EKIR.2020.04.002. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32292867/>. Accessed on: 22 Oct. 2021.

LEE, I-Cheng; HUO, Teh-la; HUANG, Yi-Hsiang. Gastrointestinal and liver manifestations in patients with COVID-19. **Journal of the Chinese Medical Association**, vol. 83, no. 6, p. 521–523, 1 Jun. 2020. DOI 10.1097/JCMA.0000000000000319. Available at: </pmc/articles/PMC7176263/>. Accessed on: 26 Oct. 2021.

LI, Bo; YANG, Jing; ZHAO, Faming; ZHI, Lili; WANG, Xiqian; LIU, Lin; BI, Zhaohui; ZHAO, Yunhe. Prevalence and impact of cardiovascular metabolic diseases on COVID-19 in China. **Clinical Research in Cardiology**, vol. 109, no. 5, p. 1, 1 May 2020. DOI 10.1007/S00392-020-01626-9. Available at: </pmc/articles/PMC7087935/>. Accessed on: 16 Oct. 2021.

LI, Mingyue; GUO, Weina; DONG, Yalan; WANG, Xiaobei; DAI, Die; LIU, Xingxing; WU, Yiquan; LI, Mengmeng; ZHANG, Wenjing; ZHOU, Haifeng; ZHANG, Zili; LIN, Lan; KANG, Zhenyu; YU, Ting; TIAN, Chunxia; QIN, Renjie; GUI, Yang; JIANG, Feng; FAN, Heng; ... HU, Desheng. Elevated Exhaustion Levels of NK and CD8+ T Cells as Indicators for Progression and Prognosis of COVID-19 Disease. **Frontiers in Immunology**, vol. 11, p. 1, 14 Oct. 2020. DOI 10.3389/FIMMU.2020.580237/FULL. Available at: </pmc/articles/PMC7591707/>. Accessed on: 12 Nov. 2022.

LI, Shaohua; JIANG, Lina; LI, Xi; LIN, Fang; WANG, Yijin; LI, Boan; JIANG, Tianjun; AN, Weimin; LIU, Shuhong; LIU, Hongyang; XU, Pengfei; ZHAO, Lihua; ZHANG, Lixin; MU, Jinsong; WANG, Hongwei; KANG, Jiarui; LI, Yan; HUANG, Lei; ZHU, Caizhong; ... ZHAO, Jingmin. Clinical and pathological investigation of patients with severe COVID-19. **JCI insight**, vol. 5, no. 12, 18 Jun. 2020. <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.138070>.

LI, Shufen; ZHANG, Yulan; GUAN, Zhenqiong; LI, Huiling; YE, Meidi; CHEN, Xi; SHEN, Jun; ZHOU, Yiwu; SHI, Zheng Li; ZHOU, Peng; PENG, Ke. SARS-CoV-2 triggers inflammatory responses and cell death through caspase-8 activation. **Signal transduction and targeted therapy**, vol. 5, no. 1, 1 Dec. 2020. <https://doi.org/10.1038/S41392-020-00334-0>.

LIAO, Mingfeng; LIU, Yang; YUAN, Jing; WEN, Yanling; XU, Gang; ZHAO, Juanjuan; CHENG, Lin; LI, Jinxiu; WANG, Xin; WANG, Fuxiang; LIU, Lei; AMIT, Ido; ZHANG, Shuye; ZHANG, Zheng. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. **Nature medicine**, vol. 26, no. 6, p. 842–844, 1 Jun. 2020. <https://doi.org/10.1038/S41591-020-0901-9>.

LICHTENHELD, Mathias G.; OLSEN, Kristin J.; LU, Ping; LOWREY, David M.; HAMEED, Arif; HENGARTNER, Hans; PODACK, Eckhard R. Structure and function of human perforin. **Nature**, vol. 335, no. 6189, p. 448–451, 1988. DOI 10.1038/335448A0. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3419519/>. Accessed on: 13 Mar. 2022.

LICONA-LIMÓN, P.; ARIAS-ROJAS, A.; OLGUÍN-MARTÍNEZ, E. IL-9 and Th9 in parasite immunity. **Seminars in Immunopathology** 2016 **39:1**, vol. 39, no. 1, p. 29–38, 29 Nov. 2016. DOI 10.1007/S00281-016-0606-9. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00281-016-0606-9>. Accessed on: 4 Oct. 2022.

LIEBERMAN, Judy. Granzyme A activates another way to die. **Immunological reviews**, vol. 235, no. 1, p. 93–104, May 2010. DOI 10.1111/J.0105-2896.2010.00902.X. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20536557/>. Accessed on: 17 Jan. 2022.

LIEBERMAN, Judy. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. **Nature Reviews Immunology** 2003 **3:5**, vol. 3, no. 5, p. 361–370, May 2003. <https://doi.org/10.1038/nri1083>.

LINKERMANN, Adreas; QIAN, Jing; LETTAU, Marcus; KABELITZ, Dieter; JANSSEN, Ottmar. Considering Fas ligand as a target for therapy. **Expert opinion on therapeutic targets**, vol. 9, no. 1, p. 119–134, Feb. 2005. DOI 10.1517/14728222.9.1.119. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15757486/>. Accessed on: 29 Mar. 2022.

LIU, Chau-Ching; YOUNG, Lucy H.Y.; YOUNG, John Ding-E. Lymphocyte-mediated cytolysis and disease. **The New England journal of medicine**, vol. 335, no. 22, p. 1651–1659, 28 Nov. 1996. <https://doi.org/10.1056/NEJM199611283352206>.

LIU, Ding Xiang; FUNG, To Sing; CHONG, Kelvin Kian-Long; SHUKLA, Aditi; HILGENFELD, Rolf. Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. **Antiviral Research**, vol. 109, no. 1, p. 97, 2014. DOI 10.1016/J.ANTIVIRAL.2014.06.013. Available at: [/pmc/articles/PMC7113789/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25113789/). Accessed on: 4 Oct. 2021.

LIU, Xing; ZHANG, Zhibin; RUAN, Jianbin; PAN, Youdong; MAGUPALLI, Venkat Giri; WU, Hao; LIEBERMAN, Judy. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. **Nature** 2016 **535:7610**, vol. 535, no. 7610, p. 153–158, 6 Jul. 2016. <https://doi.org/10.1038/nature18629>.

LIU, Yanli; PAN, Yilong; YIN, Yuyao; CHEN, Wenhao; LI, Xiaodong. Association of dyslipidemia with the severity and mortality of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. **Virology Journal**, vol. 18, no. 1, p. 157, 1 Dec. 2021. DOI 10.1186/S12985-021-01604-1. Available at: </pmc/articles/PMC8314261/>. Accessed on: 10 Feb. 2023.

LOBO, Andréa de Paula; CARDOSO-DOS-SANTOS, Augusto César; ROCHA, Marli Souza; PINHEIRO, Rejane Sobrino; BREMM, João Matheus; MACÁRIO, Eduardo Marques; OLIVEIRA, Wanderson Kleber de; FRANÇA, Giovanny Vinícius Araújo de. COVID-19 epidemic in Brazil: Where are we at? **International Journal of Infectious Diseases**, vol. 97, p. 382, 1 Aug. 2020. DOI 10.1016/J.IJID.2020.06.044. Available at: </pmc/articles/PMC7297148/>. Accessed on: 12 Oct. 2021.

LONG, Brit; BRADY, William J.; KOYFMAN, Alex; GOTTLIEB, Michael. Cardiovascular complications in COVID-19. **The American Journal of Emergency Medicine**, vol. 38, no. 7, p. 1504, 1 Jul. 2020. DOI 10.1016/J.AJEM.2020.04.048. Available at: </pmc/articles/PMC7165109/>. Accessed on: 16 Oct. 2021.

LONG, Brit; CARIUS, Brandon M.; CHAVEZ, Summer; LIANG, Stephen Y.; BRADY, William J.; KOYFMAN, Alex; GOTTLIEB, Michael. Clinical update on COVID-19 for the emergency clinician: Presentation and evaluation. **The American Journal of Emergency Medicine**, vol. 54, p. 46, 1 Apr. 2022. DOI 10.1016/J.AJEM.2022.01.028. Available at: </pmc/articles/PMC8779861/>. Accessed on: 2 Jan. 2023.

LORD, Sarah J.; RAJOTTE, Ray v.; KORBUTT, Gregory S.; BLEACKLEY, R. Chris. Granzyme B: a natural born killer. **Immunological reviews**, vol. 193, p. 31–38, Jun. 2003. DOI 10.1034/J.1600-065X.2003.00044.X. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12752668/>. Accessed on: 18 Jan. 2022.

LOUTEN, Jennifer. The Immune Response to Viruses. **Essential Human Virology**, , p. 93–109, 1 Jan. 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800947-5.00006-5>. Accessed on: 6 Apr. 2022.

LU, Roujian; ZHAO, Xiang; LI, Juan; NIU, Peihua; YANG, Bo; WU, Honglong; WANG, Wenling; SONG, Hao; HUANG, Baoying; ZHU, Na; BI, Yuhai; MA, Xuejun; ZHAN, Faxian; WANG, Liang; HU, Tao; ZHOU, Hong; HU, Zhenhong; ZHOU, Weimin; ZHAO, Li; ... TAN, Wenjie. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **Lancet (London, England)**, vol. 395, no. 10224, p. 565, 22 Feb. 2020. DOI 10.1016/S0140-6736(20)30251-8. Available at: /pmc/articles/PMC7159086/. Accessed on: 5 Oct. 2021.

LUCKHEERAM, Rishi Vishal; ZHOU, Rui; VERMA, Asha Devi; XIA, Bing. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. **Clinical and Developmental Immunology**, vol. 2012, p. 12, 2012. DOI 10.1155/2012/925135. Available at: /pmc/articles/PMC3312336/. Accessed on: 6 Apr. 2022.

MALARKANNAN, Subramaniam. Molecular mechanisms of FasL-mediated 'reverse-signaling.' **Molecular immunology**, vol. 127, p. 31, 1 Nov. 2020. DOI 10.1016/J.MOLIMM.2020.08.010. Available at: /pmc/articles/PMC7606657/. Accessed on: 4 Oct. 2022.

MALENGIER-DEVLIES, Bert; FILTJENS, Jessica; AHMADZADEH, Kourosh; BOECKX, Bram; VANDENHAUTE, Jessica; DE VISSCHER, Amber; BERNAERTS, Eline; MITERA, Tania; JACOBS, Cato; VANDERBEKE, Lore; VAN MOL, Pierre; VAN HERCK, Yannick; HERMANS, Greet; MEERSSEMAN, Philippe; WILMER, Alexander; CONTAGIOUS CONSORTIUM; GOUWY, Mieke; GARG, Abhishek D.; HUMBLET-BARON, Stephanie; ... MATTHYS, Patrick. Severe COVID-19 patients display hyper-activated NK cells and NK cell-platelet aggregates. **Frontiers in Immunology**, vol. 13, 5 Oct. 2022. DOI 10.3389/FIMMU.2022.861251/FULL. Available at: /pmc/articles/PMC9581751/. Accessed on: 12 Nov. 2022.

MARTINVALET, Denis; DYKXHOORN, Derek M.; FERRINI, Roger; LIEBERMAN, Judy. Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. **Cell**, vol. 133, no. 4, p. 681–692, 16 May 2008. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.03.032>.

MARTINVALET, Denis; ZHU, Pengcheng; LIEBERMAN, Judy. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis.

Immunity, vol. 22, no. 3, p. 355–370, 2005. DOI 10.1016/J.IMMUNI.2005.02.004. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15780992/>. Accessed on: 17 Jan. 2022.

MASON, R.J. Biology of alveolar type II cells. **Respirology (Carlton, Vic.)**, vol. 11 Suppl, no. SUPPL. 1, Jan. 2006. DOI 10.1111/J.1440-1843.2006.00800.X. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16423262/>. Accessed on: 2 Nov. 2021.

MASON, R.J. Pathogenesis of COVID-19 from a cell biology perspective. **The European respiratory journal**, vol. 55, no. 4, 1 Apr. 2020. DOI 10.1183/13993003.00607-2020. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32269085/>. Accessed on: 2 Nov. 2021.

MASTERS, Paul S. The Molecular Biology of Coronaviruses. **Advances in Virus Research**, vol. 66, p. 193, 2006. DOI 10.1016/S0065-3527(06)66005-3. Available at: </pmc/articles/PMC7112330/>. Accessed on: 18 Sep. 2021.

MAUCOURANT, Christopher; FILIPOVIC, Iva; PONZETTA, Andrea; ALEMAN, Soo; CORNILLET, Martin; HERTWIG, Laura; STRUNZ, Benedikt; LENTINI, Antonio; REINIUS, Björn; BROWNLIE, Demi; CUAPIO, Angelica; ASK, Eivind Heggernes; HULL, Ryan M.; HAROUN-IZQUIERDO, Alvaro; SCHAFFER, Marie; KLINGSTRÖM, Jonas; FOLKESSON, Elin; BUGGERT, Marcus; SANDBERG, Johan K.; ... BJÖRKSTRÖM, Niklas K. Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. **Science immunology**, vol. 5, no. 50, 2020. DOI 10.1126/SCIIMMUNOL.ABD6832. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32826343/>. Accessed on: 13 Jan. 2022.

MAZZONI, Alessio; SALVATI, Lorenzo; MAGGI, Laura; CAPONE, Manuela; VANNI, Anna; SPINICCI, Michele; MENCARINI, Jessica; CAPORALE, Roberto; PERUZZI, Benedetta; ANTONELLI, Alberto; TROTTA, Michele; ZAMMARCHI, Lorenzo; CIANI, Luca; GORI, Leonardo; LAZZERI, Chiara; MATUCCI, Andrea; VULTAGGIO, Alessandra; ROSSI, Oliviero; ALMERIGOGNA, Fabio; ... COSMI, Lorenzo. Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. **The Journal of Clinical Investigation**, vol. 130, no. 9, p. 4694, 8 Aug. 2020. DOI 10.1172/JCI138554. Available at: </pmc/articles/PMC7456250/>. Accessed on: 2 Nov. 2022.

MCCOMB, Scott; THIRIOT, Aude; AKACHE, Bassel; KRISHNAN, Lakshmi; STARK, Felicity. Introduction to the Immune System. **Methods in molecular biology**

(Clifton, N.J.), vol. 2024, p. 1–24, 2019. DOI 10.1007/978-1-4939-9597-4_1. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31364040/>. Accessed on: 6 Apr. 2022.

MCNAB, Finlay; MAYER-BARBER, Katrin; SHER, Alan; WACK, Andreas; O’GARRA, Anne. Type I interferons in infectious disease. **Nature Reviews Immunology** 2015 15:2, vol. 15, no. 2, p. 87–103, 23 Jan. 2015. <https://doi.org/10.1038/nri3787>.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY C., Jr. Innate immunity. **The New England journal of medicine**, vol. 343, no. 5, p. 338–344, 2000. DOI 10.1056/NEJM200008033430506. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10922424/>. Accessed on: 12 Dec. 2021.

MEDZHITOV, Ruslan; JANEWAY, Charles. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunological Reviews**, vol. 173, no. 1, p. 89–97, 1 Feb. 2000. <https://doi.org/10.1034/J.1600-065X.2000.917309.X>.

MEHMOOD, Iqra; IJAZ, Munazza; AHMAD, Sajjad; AHMED, Temoor; BARI, Amna; ABRO, Asma; ALLEMAILEM, Khaled S; ALMATROUDI, Ahmad; TAHIR UL QAMAR, Muhammad. SARS-CoV-2: An Update on Genomics, Risk Assessment, Potential Therapeutics and Vaccine Development. **Public Health**, vol. 18, p. 1626, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijerph>. Accessed on: 2 Nov. 2021.

MENG, Xiao Ming; NIKOLIC-PATERSON, David J.; LAN, Hui Yao. TGF- β : the master regulator of fibrosis. **Nature Reviews Nephrology** 2016 12:6, vol. 12, no. 6, p. 325–338, 25 Apr. 2016. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.48>.

MEYEROWITZ, Eric A.; RICHTERMAN, Aaron; GANDHI, Rajesh T.; SAX, Paul E. Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. **Annals of Internal Medicine**, vol. 174, no. 1, p. 69–79, 1 Jan. 2021. DOI 10.7326/M20-5008. Available at: </pmc/articles/PMC7505025/>. Accessed on: 2 Nov. 2021.

MICHEL, Christian Jean; MAYER, Claudine; POCH, Olivier; THOMPSON, Julie Dawn. Characterization of accessory genes in coronavirus genomes. **Virology Journal**, vol. 17, no. 1, 27 Aug. 2020. DOI 10.1186/S12985-020-01402-1. Available at: </pmc/articles/PMC7450977/>. Accessed on: 4 Oct. 2021.

MILANI, Alireza; BASIRNEJAD, Marzieh; SHAHBAZI, Sepideh; BOLHASSANI, Azam. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. **British Journal of**

Pharmacology, vol. 174, no. 11, p. 1290, 2017. DOI 10.1111/BPH.13625. Available at: </pmc/articles/PMC5429337/>. Accessed on: 26 Apr. 2023.

MOGENSEN, Trine H. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 22, no. 2, p. 240, Apr. 2009. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>.

MOHAMED, Muner M.B.; LUKITSCH, Ivo; TORRES-ORTIZ, Aldo E.; WALKER, Joseph B.; VARGHESE, Vipin; HERNANDEZ-ARROYO, Cesar F.; ALQUDSI, Muhannad; LEDOUX, Jason R.; VELEZ, Juan Carlos Q. Acute Kidney Injury Associated with Coronavirus Disease 2019 in Urban New Orleans. **Kidney360**, vol. 1, no. 7, p. 614–622, 30 Jul. 2020. DOI 10.34067/KID.0002652020. Available at: <https://kidney360.asnjournals.org/content/1/7/614>. Accessed on: 22 Oct. 2021.

MORESCO, Eva Marie Y.; LAVINE, Diantha; BEUTLER, Bruce. Toll-like receptors. **Current Biology**, vol. 21, no. 13, p. R488–R493, 12 Jul. 2011. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2011.05.039>.

MOSS, Paul. The T cell immune response against SARS-CoV-2. **Nature Immunology** 2022 23:2, vol. 23, no. 2, p. 186–193, 1 Feb. 2022. DOI 10.1038/s41590-021-01122-w. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41590-021-01122-w>. Accessed on: 5 Feb. 2023.

MOSSEL, EC; WANG, J; JEFFERS, S; EDEEN, KE; WANG, S; COSGROVE, GP; FUNK, CJ; MANZER, R; MIURA, TA; PEARSON, LD; HOLMES, KV; MASON, RJ. SARS-CoV replicates in primary human alveolar type II cell cultures but not in type I-like cells. **Virology**, vol. 372, no. 1, p. 127–135, 1 Mar. 2008. DOI 10.1016/J.VIROL.2007.09.045. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18022664/>. Accessed on: 2 Nov. 2021.

MOVASAGHI, Zanyar; REHMAN, Shazza; REHMAN, Ihtesham U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. <http://dx.doi.org/10.1080/05704920701551530>, vol. 42, no. 5, p. 493–541, Sep. 2007. DOI 10.1080/05704920701551530. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/05704920701551530>. Accessed on: 11 Mar. 2023.

MS. Boletim Epidemiológico Nº 146. 31 Dec. 2022. Available at: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de->

conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/covid-19/2022/boletim-epidemiologico-no-146-boletim-coe-coronavirus/view. Accessed on: 11 Mar. 2023.

MÜLLER, Ulrike; STEINHOFF, Ulrich; REIS, Luiz F.L.; HEMMI, Silvio; PAVLOVIC, Jovan; ZINKERNAGEL, Rolf M.; AGUET, Michel. Functional Role of Type I and Type II Interferons in Antiviral Defense. **Science**, vol. 264, no. 5167, p. 1918–1921, 1994. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8009221>.

MURALIDAR, Shibi; AMBI, Senthil Visaga; SEKARAN, Saravanan; KRISHNAN, Uma Maheswari. The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. **Biochimie**, vol. 179, p. 85, 1 Dec. 2020. DOI 10.1016/J.BIOCHI.2020.09.018. Available at: [/pmc/articles/PMC7505773/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39111111/). Accessed on: 5 Oct. 2021.

NAGATA, Shigekazu. Apoptosis by death factor. **Cell**, vol. 88, no. 3, p. 355–365, 7 Feb. 1997. DOI 10.1016/S0092-8674(00)81874-7. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9039262/>. Accessed on: 29 Mar. 2022.

NAGATA, Shigekazu. Fas Ligand-Induced Apoptosis. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.33.1.29>, vol. 33, p. 29–55, 28 Nov. 2003. DOI 10.1146/ANNUREV.GENET.33.1.29. Available at: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.genet.33.1.29>. Accessed on: 29 Mar. 2022.

NAGATA, Shigekazu; GOLSTEIN, Pierre. The Fas death factor. **Science (New York, N.Y.)**, vol. 267, no. 5203, p. 1449–1456, 1995. DOI 10.1126/SCIENCE.7533326. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7533326/>. Accessed on: 29 Mar. 2022.

NEGISHI, Hideo; TANIGUCHI, Tadatsugu; YANAI, Hideyuki. The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, vol. 10, no. 11, 1 Nov. 2018. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A028423>.

NETEA, Mihai G.; BALKWILL, Frances; CHONCHOL, Michel; COMINELLI, Fabio; DONATH, Marc Y.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, Evangelos J.; GOLENBOCK, Douglas; GRESNIGT, Mark S.; HENEKA, Michael T.; HOFFMAN, Hal M.; HOTCHKISS, Richard; JOOSTEN, Leo A.B.; KASTNER, Daniel L.; KORTE, Martin; LATZ, Eicke; LIBBY,

Peter; MANDRUP-POULSEN, Thomas; MANTOVANI, Alberto; MILLS, Kingston H.G.; ... DINARELLO, Charles A. A guiding map for inflammation. **Nature Immunology** 2017 **18:8**, vol. 18, no. 8, p. 826–831, 19 Jul. 2017. <https://doi.org/10.1038/ni.3790>.

NEUMAN, Benjamin W.; KISS, Gabriella; KUNDING, Andreas H.; BHELLA, David; BAKSH, M. Fazil; CONNELLY, Stephen; DROESE, Ben; KLAUS, Joseph P.; MAKINO, Shinji; SAWICKI, Stanley G.; SIDDELL, Stuart G.; STAMOU, Dimitrios G.; WILSON, Ian A.; KUHN, Peter; BUCHMEIER, Michael J. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. **Journal of Structural Biology**, vol. 174, no. 1, p. 11, Apr. 2011. DOI 10.1016/J.JSB.2010.11.021. Available at: </pmc/articles/PMC4486061/>. Accessed on: 4 Oct. 2021.

NEURATH, Markus F.; KAPLAN, Mark H. Th9 cells in immunity and immunopathological diseases. **Seminars in Immunopathology**, vol. 39, no. 1, p. 1–4, 1 Jan. 2017. DOI 10.1007/S00281-016-0611-Z/TABLES/1. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00281-016-0611-z>. Accessed on: 4 Oct. 2022.

NG, Jia H.; BIJOL, Vanesa; SPARKS, Matthew A.; SISE, Meghan E.; IZZEDINE, Hassane; JHAVERI, Kenar D. Pathophysiology and Pathology of Acute Kidney Injury in Patients With COVID-19. **Advances in Chronic Kidney Disease**, vol. 27, no. 5, p. 365, 1 Sep. 2020. DOI 10.1053/J.ACKD.2020.09.003. Available at: </pmc/articles/PMC7574722/>. Accessed on: 22 Oct. 2021.

OECKINGHAUS, Andrea; GHOSH, Sankar. The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, vol. 1, no. 4, 2009. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A000034>.

OGRA, PEARAY L.; MORAG, ABRAHAM; TIKU, MOTI L. HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO VIRAL INFECTIONS. **Viral Immunology and Immunopathology**, , p. 57–77, 1 Jan. 1975. DOI 10.1016/B978-0-12-522050-7.50008-3. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780125220507500083>. Accessed on: 6 Apr. 2022.

OSIŃSKA, Iwona; POPKO, Katarzyna; DEMKOW, Urszula. Perforin: an important player in immune response. **Central-European Journal of Immunology**, vol. 39, no. 1, p. 109, 2014. <https://doi.org/10.5114/CEJI.2014.42135>.

PALUDAN, Søren R.; MOGENSEN, Trine H. Innate immunological pathways in COVID-19 pathogenesis. **Science Immunology**, vol. 7, no. 67, p. 5505, 7 Jan. 2022. <https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.ABM5505>.

PAN, L; MU, M; YANG, P; SUN, Y; WANG, R; YAN, J; LI, P; HU, B; WANG, J; HU, C; JIN, Y; NIU, X; PING, R; DU, Y; LI, T; XU, G; HU, Q; TU, L. Clinical Characteristics of COVID-19 Patients With Digestive Symptoms in Hubei, China: A Descriptive, Cross-Sectional, Multicenter Study. **The American journal of gastroenterology**, vol. 115, no. 5, p. 766–773, 1 May 2020. DOI 10.14309/AJG.0000000000000620. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32287140/>. Accessed on: 26 Oct. 2021.

PAN, Y; TIAN, X; QIN, P; WANG, B; ZHAO, P; YANG, YL; WANG, L; WANG, D; SONG, Y; ZHANG, X; HUANG, YW. Discovery of a novel swine enteric alphacoronavirus (SeACoV) in southern China. **Veterinary microbiology**, vol. 211, p. 15–21, 1 Nov. 2017. DOI 10.1016/J.VETMIC.2017.09.020. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29102111/>. Accessed on: 18 Sep. 2021.

PENG, Yanchun; MENTZER, Alexander J.; LIU, Guihai; YAO, Xuan; YIN, Zixi; DONG, Danning; DEJNIRATTISAI, Wanwisa; ROSTRON, Timothy; SUPASA, Piyada; LIU, Chang; LÓPEZ-CAMACHO, César; SLON-CAMPOS, Jose; ZHAO, Yuguang; STUART, David I.; PAESEN, Guido C.; GRIMES, Jonathan M.; ANTSON, Alfred A.; BAYFIELD, Oliver W.; HAWKINS, Dorothy E.D.P.; ... KNIGHT, Julian C. Broad and strong memory CD4 + and CD8 + T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. **Nature immunology**, vol. 21, no. 11, p. 1336–1345, 1 Nov. 2020. <https://doi.org/10.1038/S41590-020-0782-6>.

PENNOCK, Nathan D.; WHITE, Jason T.; CROSS, Eric W.; CHENEY, Elizabeth E.; TAMBURINI, Beth A.; KEDL, Ross M. T cell responses: naïve to memory and everything in between. **Advances in Physiology Education**, vol. 37, no. 4, p. 273, 1 Dec. 2013. DOI 10.1152/ADVAN.00066.2013. Available at: </pmc/articles/PMC4089090/>. Accessed on: 6 Apr. 2022.

PERL, Mario; DENK, Stephanie; KALBITZ, Miriam; HUBER-LANG, Markus. Granzyme B: A new crossroad of complement and apoptosis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, vol. 946, p. 135–146, 2012. DOI 10.1007/978-1-4614-0106-

3_8/COVER. Available at: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-0106-3_8. Accessed on: 13 Nov. 2022.

PRAGER, Isabel; WATZL, Carsten. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 105, no. 6, p. 1319–1329, 1 Jun. 2019. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0718-269R>.

PRESTI, Elena Io; DE GAETANO, Andrea; PIOGGIA, Giovanni; GANGEMI, Sebastiano. Comprehensive Analysis of the ILCs and Unconventional T Cells in Virus Infection: Profiling and Dynamics Associated with COVID-19 Disease for a Future Monitoring System and Therapeutic Opportunities. **Cells**, vol. 11, no. 3, 1 Feb. 2022. DOI 10.3390/CELLS11030542/S1. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35111030/>. Accessed on: 6 Feb. 2023.

PUPPELS, G. J.; GARRITSEN, H. S.P.; KUMMER, J. A.; GREVE, J. Carotenoids located in human lymphocyte subpopulations and natural killer cells by Raman microspectroscopy. **Cytometry**, vol. 14, no. 3, p. 251–256, 1993. DOI 10.1002/CYTO.990140303. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7682491/>. Accessed on: 7 Nov. 2022.

PUROHIT, Darshana; AHIRWAR, Ashok Kumar; SAKARDE, Apurva; ASIA, Priyanka; GOPAL, Niranjan. COVID-19 and lung pathologies. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, vol. 42, no. 4, p. 435–443, 1 Dec. 2021. DOI 10.1515/HMBCI-2020-0096/MACHINEREADEABLECITATION/RIS. Available at: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/hmbci-2020-0096/html>. Accessed on: 4 Oct. 2022.

QIN, Hongwei; WANG, Lanfang; FENG, Ting; ELSON, Charles O.; NIYONGERE, Sandrine A.; LEE, Sun Jung; REYNOLDS, Stephanie L.; WEAVER, Casey T.; ROARTY, Kevin; SERRA, Rosa; BENVENISTE, ETTY N.; CONG, Yingzi. TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, vol. 183, no. 1, p. 97–105, 1 Jul. 2009. DOI 10.4049/JIMMUNOL.0801986. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19535626/>. Accessed on: 6 Apr. 2022.

QIN, Rui; ZHAO, Chen; WANG, Chen Ji; XU, Wei; ZHAO, Jian Yuan; LIN, Yan; YUAN, Yi Yuan; LIN, Peng Cheng; LI, Yao; ZHAO, Shimin; HUANG, Yan. Original research: Tryptophan potentiates CD8+ T cells against cancer cells by TRIP12

tryptophanylation and surface PD-1 downregulation. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, vol. 9, no. 7, p. 2840, 29 Jul. 2021. DOI 10.1136/JITC-2021-002840. Available at: /pmc/articles/PMC8323461/. Accessed on: 7 Nov. 2022.

RABAAN, A. A.; AL-AHMED, S. H.; AL-MALKEY, M.; ALSUBKI, R.; EZZIKOURI, S.; AL-HABABI, F. H.; SAH, R.; AL MUTAIR, A.; ALHUMAID, S.; AL-TAWFIQ, J. A.; AL-OMARI, A.; AL-QAANEH, A. M.; AL-QAHTANI, M.; TIRUPATHI, R.; AL HAMAD, M. A.; AL-BAGHLI, N. A.; SULAIMAN, T.; ALSUBAIT, A.; MEHTA, R.; ... RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Airborne transmission of SARS-CoV-2 is the dominant route of transmission: droplets and aerosols. **Infezioni in Medicina**, , p. 10–19, 2021. . Accessed on: 14 Oct. 2021.

RAJAMANICKAM, Anuradha; PAVAN KUMAR, Nathella; PANDIARAJ, Arul Nancy; SELVARAJ, Nandhini; MUNISANKAR, Saravanan; RENJI, Rachel Mariam; VENKATARAMANI, Vijayalakshmi; MURHEKAR, Manoj; THANGARAJ, Jeromie Wesley Vivian; MUTHUSAMY, Santhosh Kumar; CHETHRAPILLY PURUSHOTHAMAN, Girish Kumar; BHATNAGAR, Tarun; PONNAIAH, Manickam; RAMASAMY, Sabarinathan; VELUSAMY, Saravanakumar; BABU, Subash. Characterization of memory T cell subsets and common γ -chain cytokines in convalescent COVID-19 individuals. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 112, no. 1, p. 201, 1 Jul. 2022. DOI 10.1002/JLB.5COVA0721-392RR. Available at: /pmc/articles/PMC9088480/. Accessed on: 14 Feb. 2023.

REILLY, Nathalie A.; LUTGENS, Esther; KUIPER, Johan; HEIJMANS, Bastiaan T.; WOUTER JUKEMA, J. Effects of fatty acids on T cell function: role in atherosclerosis. **Nature Reviews Cardiology 2021 18:12**, vol. 18, no. 12, p. 824–837, 12 Jul. 2021. DOI 10.1038/s41569-021-00582-9. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41569-021-00582-9>. Accessed on: 7 Nov. 2022.

REIZIS, Boris. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. **Immunity**, vol. 50, no. 1, p. 37, 15 Jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2018.12.027>.

RHA, Min Seok; SHIN, Eui Cheol. Activation or exhaustion of CD8+ T cells in patients with COVID-19. **Cellular and Molecular Immunology**, vol. 18, no. 10, p. 2325, 1 Oct. 2021. DOI 10.1038/S41423-021-00750-4. Available at: /pmc/articles/PMC8374113/. Accessed on: 27 Apr. 2023.

RICHARDSON, S; JS, HIRSCH, JS; M, NARASIMHAN, M; JM, CRAWFORD, JM; T, MCGINN, T; DAVIDSON, KW; BARNABY, DP; BECKER, LB; CHELICO, JD; COHEN, SL; COOKINGHAM, J; COPPA, K; DIEFENBACH, MA; DOMINELLO, AJ; DUERHEFELE, J; FALZON, L; GITLIN, J; HAJIZADEH, N; HARVIN, TG; ... ZANOS, TP. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. **JAMA**, vol. 323, no. 20, p. 2052–2059, 26 May 2020. DOI 10.1001/JAMA.2020.6775. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32320003/>. Accessed on: 22 Oct. 2021.

RIVERA VARGAS, Thaiz; HUMBLIN, Etienne; VÉGRAN, Frédérique; GHIRINGHELLI, François; APETOH, Lionel. TH9 cells in anti-tumor immunity. **Seminars in Immunopathology**, vol. 39, no. 1, p. 39–46, 1 Jan. 2017. DOI 10.1007/S00281-016-0599-4/FIGURES/2. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00281-016-0599-4>. Accessed on: 4 Oct. 2022.

ROD, J. E.; OVIEDO-TRESPALACIOS, Oscar; CORTES-RAMIREZ, Javier. A brief-review of the risk factors for covid-19 severity. **Revista de Saúde Pública**, vol. 54, 2020. DOI 10.11606/S1518-8787.2020054002481. Available at: </pmc/articles/PMC7263798/>. Accessed on: 7 Nov. 2021.

ROMAGNANI, Sergio. Th1/Th2 cells. **Inflammatory bowel diseases**, vol. 5, no. 4, p. 285–294, 1999. DOI 10.1097/00054725-199911000-00009. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10579123/>. Accessed on: 6 Apr. 2022.

ROMERO, V.; ANDRADE, F. Non-apoptotic functions of granzymes. **Tissue Antigens**, vol. 71, no. 5, p. 409–416, 1 May 2008. DOI 10.1111/J.1399-0039.2008.01013.X. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1399-0039.2008.01013.x>. Accessed on: 8 Jan. 2023.

RONCO, C; REIS, T; HUSAIN-SYED, F. Management of acute kidney injury in patients with COVID-19. **The Lancet. Respiratory medicine**, vol. 8, no. 7, p. 738–742, 1 Jul. 2020. DOI 10.1016/S2213-2600(20)30229-0. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32416769/>. Accessed on: 22 Oct. 2021.

ROUVIER, Eric; LUCIANI, Marie Françoise; GOLSTEIN, Pierre. Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. **The Journal of experimental**

medicine, vol. 177, no. 1, p. 195–200, 1 Jan. 1993. DOI 10.1084/JEM.177.1.195. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7678113/>. Accessed on: 29 Mar. 2022.

RYDYZNSKI MODERBACHER, Carolyn; RAMIREZ, Sydney I.; DAN, Jennifer M.; GRIFONI, Alba; HASTIE, Kathryn M.; WEISKOPF, Daniela; BELANGER, Simon; ABBOTT, Robert K.; KIM, Christina; CHOI, Jinyong; KATO, Yu; CROTTY, Eleanor G.; KIM, Cheryl; RAWLINGS, Stephen A.; MATEUS, Jose; TSE, Long Ping Victor; FRAZIER, April; BARIC, Ralph; PETERS, Bjoern; ... CROTTY, Shane. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. **Cell**, vol. 183, no. 4, p. 996-1012.e19, 12 Nov. 2020. DOI 10.1016/J.CELL.2020.09.038. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33010815/>. Accessed on: 6 Feb. 2023.

SALEKI, Kiarash; SHIRZAD, Moein; JAVANIAN, Mostafa; MOHAMMADKHANI, Sheyda; ALIJANI, Mohammad Hossein; MIRI, Niloufarsadat; OLADNABI, Morteza; AZADMEHR, Abbas. Serum soluble Fas ligand is a severity and mortality prognostic marker for COVID-19 patients. **Frontiers in Immunology**, vol. 13, 31 Aug. 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.947401>.

SALES, Marcos V S; TANABE, Eloiza L L; MACIEL, Thamilla M S; TAVARES, Maria C; LEAL, Juliana G C; PINTO, Larissa S; PIRES, Keyla S N; COELHO, Jorge A P M; SILVA, Elaine C O; SOUZA, Samuel T; FONSECA, Eduardo J S; FRAGOSO, Thiago S; AQUINO, Thiago M; BORBELY, Alexandre U; ROCHA, Ueslen; SANTOS, Josué C C; CATARINA, Ana; LEITE, R. COVID-19 Infection Changes the Functions and Morphology of Erythrocytes: A Multidisciplinary Study. **Article J. Braz. Chem. Soc**, vol. 00, no. 00, p. 1–12, 2023. DOI 10.21577/0103-5053.20230031. Available at: <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20230031>. Accessed on: 26 Apr. 2023.

SARWAL, Minnie M.; JANI, Alkesh; CHANG, Stella; HUIE, Phil; WANG, Zhuo; SALVATIERRA, Oscar; CLAYBERGER, Carol; SIBLEY, Richard; KRENSKY, Alan M.; PAVLAKIS, Martha. Granulysin expression is a marker for acute rejection and steroid resistance in human renal transplantation. **Human Immunology**, vol. 62, no. 1, p. 21–31, 1 Jan. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(00\)00228-7](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(00)00228-7).

SCHLAME, Michael. Thematic Review Series: Glycerolipids. Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes *. **Journal of Lipid Research**, vol. 49, no. 8, p. 1607–1620, 1 Aug. 2008. <https://doi.org/10.1194/JLR.R700018-JLR200>.

SCHOEMAN, Dewald; FIELDING, Burtram C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. **Virology Journal**, vol. 16, no. 1, 27 May 2019. DOI 10.1186/S12985-019-1182-0. Available at: </pmc/articles/PMC6537279/>. Accessed on: 4 Oct. 2021.

SCHRODER, Kate; HERTZOG, Paul J.; RAVASI, Timothy; HUME, David A. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 75, no. 2, p. 163–189, 1 Feb. 2004. <https://doi.org/10.1189/JLB.0603252>.

SETTE, Alessandro; CROTTY, Shane. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. **Cell**, vol. 184, no. 4, p. 861–880, 18 Feb. 2021. DOI 10.1016/J.CELL.2021.01.007/ATTACHMENT/30A5B93A-BB54-4E5C-979F-18B014FDD055/MMC1.PDF. Available at: <http://www.cell.com/article/S0092867421000076/fulltext>. Accessed on: 14 Jan. 2022.

SHARPE, Arlene H.; PAUKEN, Kristen E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. **Nature Reviews Immunology 2017 18:3**, vol. 18, no. 3, p. 153–167, 13 Nov. 2017. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.108>.

SILVERSTEIN, Noah J.; WANG, Yetao; MANICKAS-HILL, Zachary; CARBONE, Claudia; DAUPHIN, Ann; BORIBONG, Brittany P.; LOISELLE, Maggie; DAVIS, Jameson; LEONARD, Maureen M.; KURI-CERVANTES, Leticia; TEAM, MGH COVID-19 Collection & Processing; MEYER, Nuala J.; BETTS, Michael R.; LI, Jonathan Z.; WALKER, Bruce; YU, Xu G.; YONKER, Lael M.; LUBAN, Jeremy. Innate lymphoid cells and disease tolerance in SARS-CoV-2 infection. **medRxiv**, 15 Jan. 2021. DOI 10.1101/2021.01.14.21249839. Available at: </pmc/articles/PMC7814851/>. Accessed on: 6 Feb. 2023.

SONG, Wenzhi; CRAFT, Joe. T follicular helper cell heterogeneity: Time, space, and function. **Immunological reviews**, vol. 288, no. 1, p. 85–96, 1 Mar. 2019. DOI 10.1111/IMR.12740. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30874350/>. Accessed on: 4 Oct. 2022.

SOWER, Laurie E.; KLIMPEL, Gary R.; HANNA, William; FROELICH, Christopher J. Extracellular activities of human granzymes. I. Granzyme A induces IL6 and IL8 production in fibroblast and epithelial cell lines. **Cellular immunology**, vol. 171, no. 1, p. 159–163, 10 Jul. 1996. <https://doi.org/10.1006/CIMM.1996.0187>.

SPARROW, E.; BODMAN-SMITH, M. D. Granulysin: The attractive side of a natural born killer. **Immunology Letters**, vol. 217, p. 126–132, 1 Jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2019.11.005>.

STERTZ, S; REICHELT, M; SPIEGEL, M; KURI, T; MARTÍNEZ-SOBRIDO, L; GARCÍA-SASTRE, A; WEBER, F; KOCHS, G. The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. **Virology**, vol. 361, no. 2, p. 304–315, 10 May 2007. DOI 10.1016/J.VIROL.2006.11.027. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17210170/>. Accessed on: 14 Oct. 2021.

SUDA, Takashi; HASHIMOTO, Hideo; TANAKA, Masato; OCHI, Takahiro; NAGATA, Shigekazu. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. **The Journal of experimental medicine**, vol. 186, no. 12, p. 2045–2050, 15 Dec. 1997. DOI 10.1084/JEM.186.12.2045. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9396774/>. Accessed on: 29 Mar. 2022.

SUDA, Takashi; TAKAHASHI, Tomohiro; GOLSTEIN, Pierre; NAGATA, Shigekazu. Molecular cloning and expression of the fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. **Cell**, vol. 75, no. 6, p. 1169–1178, 17 Dec. 1993. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90326-L](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90326-L). Accessed on: 29 Mar. 2022.

SWIECKI, Melissa; COLONNA, Marco. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. **Nature reviews. Immunology**, vol. 15, no. 8, p. 471, 25 Aug. 2015. <https://doi.org/10.1038/NRI3865>.

TADDEI, M. L.; GIANNONI, E.; FIASCHI, T.; CHIARUGI, P. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. **The Journal of pathology**, vol. 226, no. 2, p. 380–393, Jan. 2012. <https://doi.org/10.1002/PATH.3000>.

TAKEUCHI, Osamu; AKIRA, Shizuo. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, vol. 140, no. 6, p. 805–820, 19 Mar. 2010. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.01.022>.

TANAKA, Masato; SUDA, Takashi; HAZE, Kyosuke; NAKAMURA, Norio; SATO, Ken; KIMURA, Fumihiko; MOTOYOSHI, Kazuo; MIZUKI, Masao; TAGAWA, Shinichi; OHGA, Shigetoshi; HATAKE, Kiyohiko; DRUMMOND, Alan H.; NAGATA, Shigekazu. Fas ligand in human serum. **Nature medicine**, vol. 2, no. 3, p. 317–322, 1996. DOI 10.1038/NM0396-317. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8612231/>. Accessed on: 29 Mar. 2022.

TANAKA, Masato; SUDA, Takashi; TAKAHASHI, Tomohiro; NAGATA, Shigekazu. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. **The EMBO Journal**, vol. 14, no. 6, p. 1129, 15 Mar. 1995. DOI 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07096.x. Available at: </pmc/articles/PMC398190/?report=abstract>. Accessed on: 29 Mar. 2022.

THAISS, Christoph A.; ZMORA, Niv; LEVY, Maayan; ELINAV, Eran. The microbiome and innate immunity. **Nature** **2016 535:7610**, vol. 535, no. 7610, p. 65–74, 6 Jul. 2016. <https://doi.org/10.1038/nature18847>.

THEKEN, Katherine N.; TANG, Soon Yew; SENGUPTA, Shaon; FITZGERALD, Garret A. The roles of lipids in SARS-CoV-2 viral replication and the host immune response. **Journal of Lipid Research**, vol. 62, 2021. DOI 10.1016/J.JLR.2021.100129. Available at: </pmc/articles/PMC8480132/>. Accessed on: 26 Apr. 2023.

THIERY, Jerome; KEEFE, Dennis; BOULANT, Steeve; BOUCROT, Emmanuel; WALCH, Michael; MARTINVALET, Denis; GOPING, Ing Swie; BLEACKLEY, R. Chris; KIRCHHAUSEN, Tomas; LIEBERMAN, Judy. Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. **Nature immunology**, vol. 12, no. 8, p. 770–777, Aug. 2011. <https://doi.org/10.1038/NI.2050>.

TIBBS, Ellis; CAO, Xuefang. Emerging Canonical and Non-Canonical Roles of Granzyme B in Health and Disease. **Cancers**, vol. 14, no. 6, 1 Mar. 2022. DOI 10.3390/CANCERS14061436. Available at: </pmc/articles/PMC8946077/>. Accessed on: 7 Feb. 2023.

TOMAR, Namrata; DE, Rajat K. A brief outline of the immune system. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, vol. 1184, p. 3–12, 2014. DOI 10.1007/978-1-4939-1115-8_1. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25048116/>. Accessed on: 6 Apr. 2022.

VAN DAALEN, Kim R.; REIJNEVELD, Josephine F.; BOVENSCHEN, Niels. Modulation of Inflammation by Extracellular Granzyme A. **Frontiers in Immunology**, vol. 11, p. 931, 19 May 2020. DOI 10.3389/FIMMU.2020.00931. Available at: /pmc/articles/PMC7248576/. Accessed on: 17 Jan. 2022.

VAN EEDEN, Charmaine; KHAN, Lamia; OSMAN, Mohammed S.; TERVAERT, Jan Willem Cohen. Natural Killer Cell Dysfunction and Its Role in COVID-19. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 21, no. 17, p. 1–17, 1 Sep. 2020. DOI 10.3390/IJMS21176351. Available at: /pmc/articles/PMC7503862/. Accessed on: 16 Jan. 2022.

VARGA, Z; FLAMMER, AJ; STEIGER, P; HABERECKER, M; ANDERMATT, R; ZINKERNAGEL, AS; MEHRA, MR; SCHUEPBACH, RA; RUSCHITZKA, F; MOCH, H. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. **Lancet (London, England)**, vol. 395, no. 10234, p. 1417–1418, 2 May 2020. DOI 10.1016/S0140-6736(20)30937-5. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32325026/>. Accessed on: 22 Oct. 2021.

VELJKOVIC VUJAKLIJA, Danijela; DOMINOVIC, Marin; GULIC, Tamara; MAHMUTEFENDIC, Hana; HALLER, Herman; SAITO, Shigeru; RUKAVINA, Daniel. Granulysin expression and the interplay of granulysin and perforin at the maternal-fetal interface. **Journal of reproductive immunology**, vol. 97, no. 2, p. 186–196, Apr. 2013. <https://doi.org/10.1016/J.JRI.2012.11.003>.

VELJKOVIC VUJAKLIJA, Danijela; SUCIC, Sonja; GULIC, Tamara; DOMINOVIC, Marin; RUKAVINA, Daniel. Cell Death Mechanisms at the Maternal-Fetal Interface: Insights into the Role of Granulysin. **Clinical and Developmental Immunology**, vol. 2012, p. 180272, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/180272>.

VELOTTI, Francesca; BARCHETTA, Ilaria; CIMINI, Flavia Agata; CAVALLO, Maria Gisella. Granzyme B in Inflammatory Diseases: Apoptosis, Inflammation, Extracellular Matrix Remodeling, Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Fibrosis. **Frontiers in Immunology**, vol. 11, p. 1, 11 Nov. 2020. DOI 10.3389/FIMMU.2020.587581. Available at: /pmc/articles/PMC7686573/. Accessed on: 18 Jan. 2022.

VINCENT, J. L.; MORENO, R.; TAKALA, J.; WILLATTS, S.; DE MENDONÇA, A.; BRUINING, H.; REINHART, C. K.; SUTER, P. M.; THIJS, L. G. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the

Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. **Intensive care medicine**, vol. 22, no. 7, p. 707–710, 1996. DOI 10.1007/BF01709751. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8844239/>. Accessed on: 25 Oct. 2022.

VIVIER, Eric; ARTIS, David; COLONNA, Marco; DIEFENBACH, Andreas; DI SANTO, James P.; EBERL, Gérard; KOYASU, Shigeo; LOCKSLEY, Richard M.; MCKENZIE, Andrew N.J.; MEBIUS, Reina E.; POWRIE, Fiona; SPITS, Hergen. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. **Cell**, vol. 174, no. 5, p. 1054–1066, 23 Aug. 2018. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.07.017>.

V'KOVSKI, Philip; KRATZEL, Annika; STEINER, Silvio; STALDER, Hanspeter; THIEL, Volker. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews. Microbiology**, vol. 19, no. 3, p. 1, 1 Mar. 2021. DOI 10.1038/S41579-020-00468-6. Available at: </pmc/articles/PMC7592455/>. Accessed on: 14 Oct. 2021.

VOSKOBOINIK, Ilia; DUNSTONE, Michelle A.; BARAN, Katherine; WHISSTOCK, James C.; TRAPANI, Joseph A. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. **Immunological reviews**, vol. 235, no. 1, p. 35–54, May 2010. <https://doi.org/10.1111/J.0105-2896.2010.00896.X>.

VOSKOBOINIK, Ilia; WHISSTOCK, James C.; TRAPANI, Joseph A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. **Nature Reviews Immunology** **2015 15:6**, vol. 15, no. 6, p. 388–400, 22 May 2015. DOI 10.1038/nri3839. Available at: <https://www.nature.com/articles/nri3839>. Accessed on: 14 Mar. 2022.

WALKER, Jennifer A.; MCKENZIE, Andrew N.J. TH2 cell development and function. **Nature Reviews Immunology** **2017 18:2**, vol. 18, no. 2, p. 121–133, 30 Oct. 2017. DOI 10.1038/nri.2017.118. Available at: <https://www.nature.com/articles/nri.2017.118>. Accessed on: 30 Sep. 2022.

WANG, Dang; FANG, Liurong; XIAO, Shaobo. Porcine epidemic diarrhea in China. **Virus Research**, vol. 226, p. 7, 2 Dec. 2016. DOI 10.1016/J.VIRUSRES.2016.05.026. Available at: </pmc/articles/PMC7114554/>. Accessed on: 18 Sep. 2021.

WANG, Mei; SU, Ping. The role of the Fas/FasL signaling pathway in environmental toxicant-induced testicular cell apoptosis: An update.

<https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1422046>, vol. 64, no. 2, p. 93–102, 4 Mar. 2018. DOI 10.1080/19396368.2017.1422046. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19396368.2017.1422046>. Accessed on: 29 Mar. 2022.

WANG, Xinyi; SUN, Guangqiang; FENG, Teng; ZHANG, Jing; HUANG, Xun; WANG, Tao; XIE, Zuoquan; CHU, Xingkun; YANG, Jun; WANG, Huan; CHANG, Shuaishuai; GONG, Yanxue; RUAN, Lingfei; ZHANG, Guanqun; YAN, Siyuan; LIAN, Wen; DU, Chen; YANG, Dabing; ZHANG, Qingli; ... GENG, Meiyu. Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression. **Cell Research**, vol. 29, no. 10, p. 787, 1 Oct. 2019. DOI 10.1038/S41422-019-0216-X. Available at: </pmc/articles/PMC6796854/>. Accessed on: 6 Nov. 2022.

WAUTERS, Els; VAN MOL, Pierre; GARG, Abhishek Dinkarnath; JANSEN, Sander; VAN HERCK, Yannick; VANDERBEKE, Lore; BASSEZ, Ayse; BOECKX, Bram; MALENGIER-DEVLIES, Bert; TIMMERMAN, Anna; VAN BRUSSEL, Thomas; VAN BUYTEN, Tina; SCHEPERS, Rogier; HEYLEN, Elisabeth; DAUWE, Dieter; DOOMS, Christophe; GUNST, Jan; HERMANS, Greet; MEERSSEMAN, Philippe; ... LAMBRECHTS, Diether. Discriminating mild from critical COVID-19 by innate and adaptive immune single-cell profiling of bronchoalveolar lavages. **Cell Research**, vol. 31, no. 3, p. 272, 1 Mar. 2021. <https://doi.org/10.1038/S41422-020-00455-9>.

WEIZMAN, Orr El; ADAMS, Nicholas M.; SCHUSTER, Iona S.; KRISHNA, Chirag; PRITYKIN, Yuri; LAU, Colleen; DEGLI-ESPOSTI, Mariapia A.; LESLIE, Christina S.; SUN, Joseph C.; O'SULLIVAN, Timothy E. ILC1 Confer Early Host Protection at Initial Sites of Viral Infection. **Cell**, vol. 171, no. 4, p. 795-808.e12, 2 Nov. 2017. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.09.052>.

WENSINK, Annette C.; HACK, C. Erik; BOVENSCHEN, Niels. Granzymes regulate proinflammatory cytokine responses. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, vol. 194, no. 2, p. 491–497, 15 Jan. 2015. DOI 10.4049/JIMMUNOL.1401214. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25556251/>. Accessed on: 8 Jan. 2023.

WEST, Erin E.; KOLEV, Martin; KEMPER, Claudia. Complement and the Regulation of T Cell Responses. **Annual review of immunology**, vol. 36, p. 309, 4 Apr.

2018. DOI 10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-042617-053245. Available at: [/pmc/articles/PMC7478175/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32235945/). Accessed on: 7 Feb. 2023.

WHERRY, E. John; KURACHI, Makoto. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. **Nature reviews. Immunology**, vol. 15, no. 8, p. 486, 25 Aug. 2015. DOI 10.1038/NRI3862. Available at: [/pmc/articles/PMC4889009/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26019111/). Accessed on: 6 Apr. 2022.

WHO. Situation Report – 22, Novel Coronavirus. 11 Feb. 2020a. . Accessed on: 5 Oct. 2021.

WHO. Situation Report-51, Coronavirus disease 2019 . 11 Mar. 2020b. . Accessed on: 5 Oct. 2021.

WIERSINGA, W. Joost; RHODES, Andrew; CHENG, Allen C.; PEACOCK, Sharon J.; PRESCOTT, Hallie C. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA**, vol. 324, no. 8, p. 782–793, 25 Aug. 2020. DOI 10.1001/JAMA.2020.12839. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32648899/>. Accessed on: 4 Nov. 2021.

WILLIAMS, N S; ENGELHARD, V H. Perforin-dependent cytotoxic activity and lymphokine secretion by CD4+ T cells are regulated by CD8+ T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, United States, vol. 159, no. 5, p. 2091–2099, Sep. 1997. .

WILLINGER, Tim. Metabolic Control of Innate Lymphoid Cell Migration. **Frontiers in Immunology**, vol. 10, no. AUG, 2019. DOI 10.3389/FIMMU.2019.02010. Available at: [/pmc/articles/PMC6713999/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32235945/). Accessed on: 14 Feb. 2023.

WÖLFEL; CORMAN, VM; GUGGEMOS, W; SEILMAIER, M; ZANGE, S; MÜLLER, MA; NIEMEYER, D; JONES, TC; VOLLMAR, P; ROTHE, C; HOELSCHER, M; BLEICKER, T; BRÜNINK, S; SCHNEIDER, J; EHMANN, R; ZWIRGLMAIER, K; DROSTEN, C; WENDTNER, C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. **Nature**, vol. 581, no. 7809, p. 465–469, 28 May 2020a. DOI 10.1038/S41586-020-2196-X. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32235945/>. Accessed on: 2 Nov. 2021.

WÖLFEL, Roman; CORMAN, Victor M.; GUGGEMOS, Wolfgang; SEILMAIER, Michael; ZANGE, Sabine; MÜLLER, Marcel A.; NIEMEYER, Daniela; JONES, Terry C.;

VOLLMAR, Patrick; ROTHE, Camilla; HOELSCHER, Michael; BLEICKER, Tobias; BRÜNINK, Sebastian; SCHNEIDER, Julia; EHMANN, Rosina; ZWIRGLMAIER, Katrin; DROSTEN, Christian; WENDTNER, Clemens. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. **Nature** **2020 581:7809**, vol. 581, no. 7809, p. 465–469, 1 Apr. 2020b. DOI 10.1038/s41586-020-2196-x. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2196-x>. Accessed on: 3 Nov. 2021.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; LAM, C. S. F.; LAU, C. C. Y.; TSANG, A. K. L.; LAU, J. H. N.; BAI, R.; TENG, J. L. L.; TSANG, C. C. C.; WANG, M.; ZHENG, B.-J.; CHAN, K.-H.; YUEN, K.-Y. 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 Deltacoronavi. **Journal of Virology**, vol. 86, no. 7, p. 3995–4008, 1 Apr. 2012. DOI 10.1128/jvi.06540-11. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22278237/>. Accessed on: 18 Sep. 2021.

WU, Fan; ZHAO, Su; YU, Bin; CHEN, Yan-Mei; WANG, Wen; SONG, Zhi-Gang; HU, Yi; TAO, Zhao-Wu; TIAN, Jun-Hua; PEI, Yuan-Yuan; YUAN, Ming-Li; ZHANG, Yu-Ling; DAI, Fa-Hui; LIU, Yi; WANG, Qi-Min; ZHENG, Jiao-Jiao; XU, Lin; HOLMES, Edward C.; ZHANG, Yong-Zhen. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, vol. 579, no. 7798, p. 265, 12 Mar. 2020. DOI 10.1038/S41586-020-2008-3. Available at: </pmc/articles/PMC7094943/>. Accessed on: 5 Oct. 2021.

WU, Yang; TIAN, Zhigang; WEI, Haiming. Developmental and Functional Control of Natural Killer Cells by Cytokines. **Frontiers in Immunology**, vol. 8, no. AUG, 4 Aug. 2017. DOI 10.3389/FIMMU.2017.00930. Available at: </pmc/articles/PMC5543290/>. Accessed on: 13 Dec. 2021.

XIAO, Fei; TANG, Meiwen; ZHENG, Xiaobin; LIU, Ye; LI, Xiaofeng; SHAN, Hong. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. **Gastroenterology**, vol. 158, no. 6, p. 1831, 1 May 2020. DOI 10.1053/J.GASTRO.2020.02.055. Available at: </pmc/articles/PMC7130181/>. Accessed on: 26 Oct. 2021.

XIONG, Tian-Yuan; REDWOOD, Simon; PRENDERGAST, Bernard; CHEN, Mao. Coronaviruses and the cardiovascular system: acute and long-term implications. **European Heart Journal**, vol. 41, no. 19, p. 1798, 14 May 2020. DOI

10.1093/EURHEARTJ/EHAA231. Available at: /pmc/articles/PMC7454513/. Accessed on: 16 Oct. 2021.

XU, Zhe; SHI, Lei; WANG, Yijin; ZHANG, Jiyuan; HUANG, Lei; ZHANG, Chao; LIU, Shuhong; ZHAO, Peng; LIU, Hongxia; ZHU, Li; TAI, Yanhong; BAI, Changqing; GAO, Tingting; SONG, Jinwen; XIA, Peng; DONG, Jinghui; ZHAO, Jingmin; WANG, Fu Sheng. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **The Lancet Respiratory Medicine**, vol. 8, no. 4, p. 420–422, 1 Apr. 2020a. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X/ATTACHMENT/7ED32B78-78BC-45CA-8ED3-480FAFBC46C4/MMC1.PDF](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X/ATTACHMENT/7ED32B78-78BC-45CA-8ED3-480FAFBC46C4/MMC1.PDF).

XU, Zhe; SHI, Lei; WANG, Yijin; ZHANG, Jiyuan; HUANG, Lei; ZHANG, Chao; LIU, Shuhong; ZHAO, Peng; LIU, Hongxia; ZHU, Li; TAI, Yanhong; BAI, Changqing; GAO, Tingting; SONG, Jinwen; XIA, Peng; DONG, Jinghui; ZHAO, Jingmin; WANG, Fu Sheng. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **The Lancet Respiratory Medicine**, vol. 8, no. 4, p. 420–422, 1 Apr. 2020b. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X/ATTACHMENT/7ED32B78-78BC-45CA-8ED3-480FAFBC46C4/MMC1.PDF](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X/ATTACHMENT/7ED32B78-78BC-45CA-8ED3-480FAFBC46C4/MMC1.PDF). Accessed on: 29 Mar. 2022.

YAMADA, Akiko; ARAKAKI, Rieko; SAITO, Masako; KUDO, Yasusei; ISHIMARU, Naozumi. Dual role of Fas/FasL-mediated signal in peripheral immune tolerance. **Frontiers in Immunology**, vol. 8, no. APR, p. 403, 5 Apr. 2017. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.00403/BIBTEX>. Accessed on: 29 Mar. 2022.

YAMAGUCHI, Tomoyuki; KISHI, Ayumi; OSAKI, Motonao; MORIKAWA, Hiromasa; PRIETO-MARTIN, Paz; WING, Kajsa; SAITO, Takashi; SAKAGUCHI, Shimon. Construction of self-recognizing regulatory T cells from conventional T cells by controlling CTLA-4 and IL-2 expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 110, no. 23, p. E2116–E2125, 4 Jun. 2013. DOI 10.1073/PNAS.1307185110/SUPPL_FILE/PNAS.201307185SI.PDF. Available at: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1307185110>. Accessed on: 30 Sep. 2022.

YANG, Lan; XIE, Xueru; TU, Zikun; FU, Jinrong; XU, Damo; ZHOU, Yufeng. The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19. **Signal Transduction and Targeted Therapy** 2021 6:1, vol. 6, no. 1, p. 1–20, 7 Jul. 2021. DOI 10.1038/s41392-021-

00679-0. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00679-0>. Accessed on: 16 Oct. 2022.

YIN, Gang; LI, Lintao; LU, Shun; YIN, Yu; SU, Yuanzhang; ZENG, Yilan; LUO, Mei; MA, Maohua; ZHOU, Hongyan; ORLANDINI, Lucia; YAO, Dezhong; LIU, Gang; LANG, Jinyi. An efficient primary screening of COVID-19 by serum Raman spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, vol. 52, no. 5, p. 949, 1 May 2021. DOI 10.1002/JRS.6080. Available at: </pmc/articles/PMC8014023/>. Accessed on: 7 Nov. 2022.

ZAIM, Sevim; CHONG, Jun Heng; SANKARANARAYANAN, Vissagan; HARKY, Amer. COVID-19 and Multiorgan Response. **Current Problems in Cardiology**, vol. 45, no. 8, p. 100618, 1 Aug. 2020. DOI 10.1016/J.CPCARDIOL.2020.100618. Available at: </pmc/articles/PMC7187881/>. Accessed on: 16 Oct. 2021.

ZEGLINSKI, Matthew R.; GRANVILLE, David J. Granzymes in cardiovascular injury and disease. **Cellular Signalling**, vol. 76, p. 109804, 1 Dec. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2020.109804>. Accessed on: 15 Jan. 2023.

ZHANG, C; SHI, L; WANG, FS. Liver injury in COVID-19: management and challenges. **The lancet. Gastroenterology & hepatology**, vol. 5, no. 5, p. 428–430, 1 May 2020. DOI 10.1016/S2468-1253(20)30057-1. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32145190/>. Accessed on: 26 Oct. 2021.

ZHANG, Sheng; ZHANG, Hongjun; ZHAO, Jiandong. The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 384, no. 4, p. 405–408, 10 Jul. 2009. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2009.04.134>. Accessed on: 6 Apr. 2022.

ZHENG, Hong Yi; ZHANG, Mi; YANG, Cui Xian; ZHANG, Nian; WANG, Xi Cheng; YANG, Xin Ping; DONG, Xing Qi; ZHENG, Yong Tang. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. **Cellular & Molecular Immunology 2020 17:5**, vol. 17, no. 5, p. 541–543, 17 Mar. 2020. DOI 10.1038/s41423-020-0401-3. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41423-020-0401-3>. Accessed on: 16 Jan. 2022.

ZHENG, Meijuan; GAO, Yong; WANG, Gang; SONG, Guobin; LIU, Siyu; SUN, Dandan; XU, Yuanhong; TIAN, Zhigang. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in

COVID-19 patients. **Cellular & Molecular Immunology** 2020 17:5, vol. 17, no. 5, p. 533–535, 19 Mar. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>.

ZHOU, F; YU, Ting; DU, Ronghui; FAN, Guohui; LIU, Ying; LIU, Zhibo; XIANG, Jie; WANG, Yeming; SONG, Bin; GU, Xiaoying; GUAN, Lulu; WEI, Yuan; LI, Hui; WU, Xudong; XU, Jiuyang; TU, Shengjin; ZHANG, Yi; CHEN, Hua; CAO, Bin. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **Lancet (London, England)**, vol. 395, no. 10229, p. 1054, 28 Mar. 2020. DOI 10.1016/S0140-6736(20)30566-3. Available at: </pmc/articles/PMC7270627/>. Accessed on: 7 Nov. 2021.

ZHOU, Peng; YANG, Xing-Lou; WANG, Xian-Guang; HU, Ben; ZHANG, Lei; ZHANG, Wei; SI, Hao-Rui; ZHU, Yan; LI, Bei; HUANG, Chao-Lin; CHEN, Hui-Dong; CHEN, Jing; LUO, Yun; GUO, Hua; JIANG, Ren-Di; LIU, Mei-Qin; CHEN, Ying; SHEN, Xu-Rui; WANG, Xi; ... SHI, Zheng-Li. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, vol. 579, no. 7798, p. 270–273, 12 Mar. 2020. DOI 10.1038/s41586-020-2012-7. Available at: </pmc/articles/PMC7095418/>. Accessed on: 5 Oct. 2021.

ZHU, Jinfang; YAMANE, Hidehiro; COTE-SIERRA, Javier; GUO, Liying; PAUL, William E. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. **Cell research**, vol. 16, no. 1, p. 3–10, 19 Jan. 2006. DOI 10.1038/SJ.CR.7310002. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16467870/>. Accessed on: 6 Apr. 2022.

ZHU, Na; ZHANG, Dingyu; WANG, Wenling; LI, Xingwang; YANG, Bo; SONG, Jingdong; ZHAO, Xiang; HUANG, Baoying; SHI, Weifeng; LU, Roujian; NIU, Peihua; ZHAN, Faxian; MA, Xuejun; WANG, Dayan; XU, Wenbo; WU, Guizhen; GAO, George F.; TAN, Wenjie. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, vol. 382, no. 8, p. 727–733, 20 Feb. 2020. DOI 10.1056/nejmoa2001017. Available at: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2001017>. Accessed on: 12 May 2021.

ZOU, X; CHEN, K; ZOU, J; HAN, P; HAO, J; HAN, Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human

organs vulnerable to 2019-nCoV infection. **Frontiers of medicine**, vol. 14, no. 2, p. 185–192, 1 Apr. 2020. DOI 10.1007/S11684-020-0754-0. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32170560/>. Accessed on: 16 Oct. 2021.

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.)

(Em 2 vias, firmado por cada participante-voluntário(o,a) da pesquisa e pelo responsável)

Eu, tendo sido convidado(o,a) a participar como voluntário(o,a) do estudo *Estudo do Metabolismo de Pacientes Contaminados com o SARS-CoV-2 Através da Identificação de Biomarcadores e mapeamento de resposta celular: Aplicação em Diagnósticos e Alvos Terapêuticos*, recebi do Sr. Thiago Mendonça de Aquino, do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

§Que o estudo se destina a coleta de sangue dos pacientes confirmados com a infecção pelo SARS-CoV-2, bem como pacientes do grupo controle sem infecção no Hospital Universitário Alberto Antunes (HUAA) para avaliação de moléculas que podem ajudar no diagnóstico e no tratamento médico.

§Que a importância deste estudo é a de gerar informações sobre as possíveis alterações que ocorrem no corpo após a infecção pelo SARS-CoV-2 e o que é diferente dos pacientes que se curam ou não, e dos que tem formas mais graves da doença em comparação aos que ficam com sintomas leves.

§Que os resultados que se desejam alcançar não irão ajudar o paciente diretamente, mas podem ajudar pacientes futuros para melhorar o diagnóstico e a rapidez e direcionamento dos tratamentos.

§Que esse estudo começará em maio/2020 e terminará em outubro/2021, considerando as coletas das amostras como primeira atividade relacionada a este projeto.

§Que o estudo será feito da seguinte forma: o sangue será coletado, assim como os dados clínicos. Serão realizados testes no laboratório para identificar várias moléculas que podem ser importantes para melhorar o diagnóstico, a agilidade e a escolha do melhor tratamento para cada caso, além de indicar por quem alguns pacientes tem formas mais graves da doença, enquanto outros não. Por fim, estes dados serão avaliados cientificamente e publicados. Caso desejar, posso saber mais detalhes a qualquer momento, através do contato com o responsável pelo projeto: Prof Thiago Mendonça de Aquino pelo telefone 82-996370317.

§Que eu estou convidado a participar das seguintes etapas: i) permitir que sejam utilizados dados do meu prontuário médico os exames que o médico/pesquisador julgar necessário afim de auxiliar nos dados experimentais, com o compromisso de que não serão mencionados nenhum dado pessoal como nome, endereço, ou qualquer outro dado que permita exposição da identidade do paciente ii) fornecer amostras de sangue sem que haja prejuízo à saúde do paciente.

§Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: possíveis desconfortos durante a coleta de sangue (punção venosa) não trazem nenhum risco maior à saúde, uma vez que estes procedimentos serão feitos pelo profissional de saúde responsável pelas coletas no local, sendo que nós ficaremos responsáveis apenas pela análise do material coletado. Para coleta do sangue periférico, os riscos são mínimos, mas podem ocorrer dor ou ardor. No entanto, estes riscos serão minimizados pela cautela em realizar os procedimentos e, se ainda assim ocorrerem, serão aplicadas medidas para sanar

eventuais dores e/ou ardor. Caso hajam outros incômodos, a equipe clínica estará a disposição para amenizá-los.

§ Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação não serão aplicados para resolver a situação de doença atual do paciente, mas ajudarão futuros pacientes e os sistemas de saúde brasileiro e internacional.

§ Que a minha participação será acompanhada por profissionais da saúde para recolhimento das amostras de sangue e coordenador e pesquisadores vinculados ao projeto para esclarecimento sobre eventuais dúvidas que possam surgir durante a realização da pesquisa.

§ Que, sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.

§ Que eu serei informado sobre o resultado final da pesquisa.

§ Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.

§ Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais vinculados ao projeto de pesquisa.

§ O estudo não acarretará nenhuma despesa para o participante da pesquisa.

§ Que eu serei indenizado por qualquer dano que venha a sofrer com a participação na pesquisa.

§ Que eu receberei uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço d(o,a) participante-voluntári(o,a)

Domicílio: (rua, praça, conjunto):

Bloco: /Nº: /Complemento:

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:

Ponto de referência:

Contato de urgência: Sr(a).

Domicílio: (rua, praça, conjunto)

Bloco: /Nº: /Complemento:

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:

Ponto de referência:

Endereço d(os,as) responsável(is) pela pesquisa (OBRIGATÓRIO):

Nome: Thiago Mendonça de Aquino

Endereço: Rua Delfino Cavalvanti, 130

Bairro: Mangabeiras, CEP 5703-480, Maceió-AL

Telefones para contato: (82) 99637-0317 ou (82) 3214-1391

Instituição: Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:**Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas****Prédio do Centro de Integração Comunitária, Térreo, Campus A. C. Simões, Cidade Universitária****Telefone: 3214-1041, Maceió-AL**

Maceió,

<hr/> <small>Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntári(o,a) ou responsável legal e rubricar as demais folhas</small>	<hr/> Thiago Mendonça de Aquino <i>Responsável pelo estudo</i>
---	--

ANEXO B – Produtos de Tese (Artigos)

Article

<https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20230031>*J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 00, No. 00, 1-12, 2023
©2023 Sociedade Brasileira de QuímicaCOVID-19 Infection Changes the Functions and Morphology of Erythrocytes:
A Multidisciplinary Study

Marcos V. S. Sales,^{#,a} Eloiza L. L. Tanabe,^{#,b} Thamilla M. S. Maciel,^c Maria C. Tavares,^c
Juliana G. C. Leal,^d Larissa S. Pinto,^d Keyla S. N. Pires,^b Jorge A. P. M. Coelho,^{*,e}
Elaine C. O. Silva,^e Samuel T. Souza,^e Eduardo J. S. Fonseca,^e Thiago S. Fragoso,^d
Thiago M. Aquino,^f Alexandre U. Borbely,^b Ueslen Rocha,^g
Josué C. C. Santos^{*,*,c} and Ana Catarina R. Leite^{*,*,a}

^aLaboratório de Bioenergética, Instituto de Química e Biotecnologia,
Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Campus A.C. Simões, 57072-900 Maceió-AL, Brazil

^bLaboratório de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde,
Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Campus A.C. Simões, 57072-900 Maceió-AL, Brazil

^cLaboratório de Instrumentação em Química Analítica, Instituto de Química e Biotecnologia,
Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Campus A. C. Simões, 57072-900 Maceió-AL, Brazil

^dServiço de Reumatologia, “Hospital Clínico”, Universidade Federal de Alagoas (UFAL),
Campus A. C. Simões, 57072-900 Maceió-AL, Brazil

^eGrupo de Óptica e Nanoscopia, Instituto de Física, Universidade Federal de Alagoas (UFAL),
Campus A.C. Simões, 57072-970 Maceió-AL, Brazil

^fNúcleo de Análises e Pesquisas em Ressonância Magnética Nuclear,
Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas (UFAL),
Campus A. C. Simões, 57072-900 Maceió-AL, Brazil

^gLaboratório de Nano-Fotônica e Imagem, Instituto de Física,
Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Campus A. C. Simões, 57072-900 Maceió-AL, Brazil

Hematological problems are associated with Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Respiratory impairment is the higher point studied, although without experimental studies related to the oxygen transport performed by erythrocytes. Therefore, we decided to investigate if erythrocytes from COVID-19 patients have their functionality changed. The case-control study included hospitalized patients with a positive real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) result admitted to University Hospital. Volunteers (negative RT-PCR results) were recruited as a control group. Thus, we assessed different erythrocytes parameters, oxidative stress markers, and biophysical studies using whole blood and isolated hemoglobin. We found a decrease of 51% in oxygen uptake and reduced antioxidant enzyme activity in COVID-19 patients compared to controls. Raman spectrometry showed structural changes in the hemoglobin and lipids of the erythrocytes from COVID-19 patients; thus, these results were consolidated with an increase in Young's modulus in erythrocytes followed by morphology changes. Besides, isolated hemoglobin from COVID-19 patients has a distinct interaction profile using a ligand model compared to the control. COVID-19 leads to structural, functional, and morphological damage to human erythrocytes. Our data showed structural and molecular changes and induction of oxidative stress in erythrocytes by COVID-19, a new perspective on the contribution of erythrocytes to a respiratory commitment in COVID-19.

Keywords: hemoglobin, COVID-19, case-control study, red cell, morphological changes

*e-mail: *e-mail: josue@iqb.ufal.br; ana.leite@iqb.ufal.br

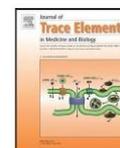
[#]The authors made an equal contribution to this work.

Editor handled this article: Ivo M. Raimundo Jr. (Associate)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jtemb

Consequences of thimerosal on human erythrocyte hemoglobin: Assessing functional and structural protein changes induced by an organic mercury compound

Marcos V.S. Sales^a, Reginaldo C. da Silva Filho^a, Marina M. Silva^a, Jeanyne L. Rocha^b, Ricardo O. Freire^b, Eloiza Lopes de L. Tanabe^a, Elaine C.O. Silva^a, Eduardo Jorge S. Fonseca^a, Isis M. Figueiredo^a, Ueslen Rocha^a, Josué Carinhanha C. Santos^{a,*}, Ana Catarina R. Leite^{a,*}

^a Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Campus A.C. Simões, 57072-900, Maceió, Alagoas, Brazil

^b Universidade Federal de Sergipe (UFS), Campus São Cristóvão, 49100-000, Sergipe, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Organic mercury compound
Protein structural changes
Functional alterations

ABSTRACT

Background: Thimerosal (TM) is an organic mercury compound used as a preservative in many pharmacological inputs. Mercury toxicity is related to structural and functional changes in macromolecules such as hemoglobin (Hb) in erythrocytes (Ery).

Method: Human Hb and Ery were used to evaluate O₂ uptake based on the TM concentration, incubation time, and temperature. The influence of TM on the sulfhydryl content, production of reactive oxygen species (ROS), and membrane fragility was also evaluated. Raman spectra and atomic force microscopy (AFM) profiles for Ery in the presence and absence of TM were calculated, and docking studies were performed.

Results: At 37 °C, with 2.50 μM TM (higher concentration) and after 5 min of incubation in Hb and Ery, we observed a reduction in O₂ uptake of up to 50 %, while HgCl₂, which was used as a positive control, showed a reduction of at least 62 %. Total thiol assays in the presence of NEM (thiol blocker) quantified the preservation of almost 60 % of free SH in Ery. Based on the Raman spectrum profile from Ery-TM, structural differences in the porphyrinic ring and the membrane lipid content were confirmed. Finally, studies using AFM showed changes in the morphology and biomechanical properties of Ery. Theoretical studies confirmed these experimental results and showed that the cysteine (Cys) residues present in Hb are involved in the binding of TM.

Conclusion: Our results show that TM binds to human Hb via free Cys residues, causing conformation changes and leading to harmful effects associated with O₂ transport.

1. Introduction

It is well documented that the continuous exposure of humans to substances such as Hg, As, Se, Cd, and Pb can lead to dysfunction, neurological problems [1], cancer [2], and cardiac disease [3]. Many studies have confirmed the harmful effects of Hg, which mainly produces neurotoxic effects after exposure to contaminated foods or environmental sources. Thimerosal (TM) is an organomercury compound that is commercially employed as a preservative in a range of different products such as dermo-cosmetics [4], antiseptics [5], and vaccines [6]. Approximately 50 % of the total mass of TM is mercury, a toxic and bioaccumulative metal [7] that causes biological problems such as neurotoxicity [8] and kidney damage [9]. *In vitro* toxicity studies using

blood carrier proteins (serum albumin) have indicated that TM induces and increases fibrillation rates [10]. Another example of a biomolecule that TM impairs is human Hb. The primary function of Hb is to bind to oxygen and transport it to all the tissues in the body. The transport and delivery of oxygen via Hb are essential to human life [11], as O₂ is necessary in order to oxidize certain biomolecules, giving ATP as an energy source [12]. Silva et al. [13] have reported that TM reacts spontaneously with Hb to form a TM-protein adduct that inhibits oxygen transport, the primary function of Hb. Of the human biomarkers used to monitor the cytotoxicity of metal species, Ery and circulating lymphocytes are the most accessible and least invasive and have been used to answer several questions regarding these effects [14]. Since Ery is important as an oxygen transporter throughout the body, we aimed to

* Corresponding authors.

E-mail addresses: josue@iqb.ufal.br (J.C.C. Santos), ana.leite@iqb.ufal.br (A.C.R. Leite).

<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.126928>

Received 6 September 2021; Received in revised form 30 December 2021; Accepted 9 January 2022

Available online 10 January 2022

0946-672X/© 2022 Elsevier GmbH. All rights reserved.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Neelakshi Gohain,
Henry M Jackson Foundation for the
Advancement of Military Medicine
(HJF), United States

REVIEWED BY
Silvana Sandri,
University of São Paulo, Brazil
Yukihiro Yamaguchi,
University of North Carolina at Chapel
Hill, United States

*CORRESPONDENCE
Marília Oliveira Fonseca Goulart
mofg@qui.ufal.br

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Viral Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 29 August 2022
ACCEPTED 29 November 2022
PUBLISHED 15 December 2022

CITATION
Graciliano NG, Tenório MCS,
Fragoso MBT, Moura FA, Botelho RM,
Tanabe ELL, Borbely KSC, Borbely AU,
Oliveira ACM and Goulart M
(2022) The impact on colostrum
oxidative stress, cytokines, and
immune cells composition
after SARS-CoV-2 infection
during pregnancy.
Front. Immunol. 13:1031248.
doi: 10.3389/fimmu.2022.1031248

COPYRIGHT
© 2022 Graciliano, Tenório, Fragoso,
Moura, Botelho, Tanabe, Borbely,
Borbely, Oliveira and Goulart. This is an
open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use,
distribution or reproduction is
permitted which does not comply with
these terms.

The impact on colostrum oxidative stress, cytokines, and immune cells composition after SARS-CoV-2 infection during pregnancy

Nayara Gomes Graciliano¹, Micaely Cristinados Santos Tenório², Marilene Brandão Tenório Fragoso², Fabiana Andréa Moura³, Rayane Martins Botelho¹, Eloiza Lopes Lira Tanabe¹, Karen Steponavicius Cruz Borbely¹, Alexandre Urban Borbely¹, Alane Cabral Menezes Oliveira^{1,3} and Marília Oliveira Fonseca Goulart^{1,2,4*}

¹Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Alagoas, Maceio, Alagoas, Brazil,

²Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, Maceio, Alagoas, Brazil,

³College of Nutrition, Federal University of Alagoas, Maceio, Alagoas, Brazil, ⁴National Institute of Science and Technology in Bioanalytics (INCT-Bio), Campinas, Sao Paulo, Brazil

Background: Limited data are available regarding the differences between immunological, biochemical, and cellular contents of human colostrum following maternal infection during pregnancy with coronavirus 2 disease (COVID-19).

Objective: To investigate whether maternal COVID-19 infection may affect immunological, biochemical, and cellular contents of human colostrum.

Methods: Using a case-control study design, we collected colostrum from 14 lactating women with a previous diagnosis of COVID-19 during pregnancy and 12 without a clear diagnosis during September 2020 to May 2021. Colostrum samples were analysed for some enzymes and non-enzymatic oxidative stress markers (SOD, CAT, GPx, MDA, GSH, GSSG, H₂O₂, MPO) and for IL-1 β , IL-6, tumour necrosis factor (TNF)- α , protein induced by interferon gamma (IP)-10, IL-8, IFN- λ 1, IL12p70, IFN- α 2, IFN- λ 2/3, granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), IFN- β , IL-10 and IFN- γ , along with IgA and IgG for the SARS-CoV-2 S protein. We perform immunophenotyping to assess the frequency of different cell types in the colostrum.

Results: Colostrum from the COVID-19 symptomatic group in pregnancy contained reduced levels of H₂O₂, IFN- α 2, and GM-CSF. This group had higher levels of GSH, and both NK cell subtypes CD3⁺CD56^{bright}CD16⁻CD27⁺IFN- γ ⁺ and CD3⁺CD56^{dim}CD16⁺CD27⁻ were also increased.



Immunological Investigations
A Journal of Molecular and Cellular Immunology



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/iimm20>

Association of Polymorphisms in Cytokine genes with susceptibility to Precancerous Lesions and Cervical Cancer: A systematic review with meta-analysis

Edilson Leite de Moura , Ana Caroline Melo dos Santos , Denise Macedo da Silva , Bruna Brandão dos Santos , Diego de Siqueira Figueredo , Alexandre Wendell Araújo Moura , Adriely Ferreira da Silva , Ithallo Sathio Bessoni Tanabe , Eloiza Lopes de Lira Tanabe , Abel Barbosa Lira Neto , Aline Cristine Pereira e Silva , Carlos Alberto de Carvalho Fraga , José Luiz de Lima Filho , Karol Fireman de Farias & Elaine Virginia Martins de Souza

To cite this article: Edilson Leite de Moura , Ana Caroline Melo dos Santos , Denise Macedo da Silva , Bruna Brandão dos Santos , Diego de Siqueira Figueredo , Alexandre Wendell Araújo Moura , Adriely Ferreira da Silva , Ithallo Sathio Bessoni Tanabe , Eloiza Lopes de Lira Tanabe , Abel Barbosa Lira Neto , Aline Cristine Pereira e Silva , Carlos Alberto de Carvalho Fraga , José Luiz de Lima Filho , Karol Fireman de Farias & Elaine Virginia Martins de Souza (2020): Association of Polymorphisms in Cytokine genes with susceptibility to Precancerous Lesions and Cervical Cancer: A systematic review with meta-analysis, *Immunological Investigations*, DOI: [10.1080/08820139.2020.1778023](https://doi.org/10.1080/08820139.2020.1778023)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/08820139.2020.1778023>



Published online: 30 Jun 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Prevalence of human papillomavirus genotypes in women treated by the Unified Health System in a population from Northeast Brazil

Prevalência de genótipos do papilomavírus humano em mulheres atendidas pelo Sistema Único de Saúde em uma população do Nordeste do Brasil

Página | 2942

Karol Fireman de Farias⁽¹⁾; Edilson Leite de Moura⁽²⁾; Adrielly Ferreira da Silva⁽³⁾;
Ithallo Sathio Bessoni Tanabe⁽⁴⁾; Eloiza Lopes de Lira Tanabe⁽⁵⁾;
Denise Macedo da Silva⁽⁶⁾; Ana Caroline Melo dos Santos⁽⁷⁾;
Cristiane Araújo Nascimento⁽⁸⁾; Tiago Gomes de Andrade⁽⁹⁾;
Danyelly Brunaska Gondim Martins⁽¹⁰⁾; Elaine Virginia Martins de Souza⁽¹¹⁾;
José Luiz Lima-Filho⁽¹²⁾

⁽¹⁾ ORCID: 0000-0003-1852-2518; Prof.ª Dr.ª Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Complexo de Ciências Médicas e Enfermagem, Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica, Arapiraca-AL, BRAZIL, Email: karolfireman@hotmail.com;

⁽²⁾ ORCID: 0000-0001-6216-6522; Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Complexo de Ciências Médicas e Enfermagem, Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica, Msc, Pesquisador; Email: edilsonleite17@hotmail.com;

⁽³⁾ ORCID: 0000-0002-2902-0650; Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Complexo de Ciências Médicas e Enfermagem, Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica, Arapiraca-AL, BRAZIL, Pesquisador; Email: adriellyferreirasilva@gmail.com;

⁽⁴⁾ ORCID: 0000-0002-3063-4414; Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Complexo de Ciências Médicas e Enfermagem, Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica, Arapiraca-AL, BRAZIL, Mestre, Pesquisador; Email: ithallo.tanabe@arapiraca.ufal.br;

⁽⁵⁾ ORCID: Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Biologia Celular, Maceió-AL, BRAZIL, Mestre, Pesquisador; Email: lopeslira.eloiza@gmail.com

⁽⁶⁾ ORCID: 0000-0002-2294-6660; Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Complexo de Ciências Médicas e Enfermagem, Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica, Arapiraca-AL, BRAZIL, Pesquisador; Email: denise.macedo19@hotmail.com;

⁽⁷⁾ ORCID: 0000-0003-0280-6107; Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Complexo de Ciências Médicas e Enfermagem, Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica, Arapiraca-AL, BRAZIL, Mestre, Pesquisador; Email: anacaroline12805@gmail.com;

⁽⁸⁾ ORCID: 0000-0003-1978-0588; Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Complexo de Ciências Médicas e Enfermagem, Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica, Arapiraca-AL, BRAZIL, Prof.ª Mestre; Email: crisnasci@arapiraca.ufal.br;

⁽⁹⁾ ORCID: 0000-0003-0948-6329; Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Faculdade de Medicina, Maceió-AL, BRAZIL, Prof. Dr.; Email: tgdeandrade@ufal.br;

⁽¹⁰⁾ ORCID: 0000-0002-6005-7864; Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunologia Keizo Asami, Recife-PE, BRAZIL, Prof.ª Dr.ª; Email: brunaska@prospecmol.org;

⁽¹¹⁾ ORCID: 0000-0001-9724-9861; Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Complexo de Ciências Médicas e Enfermagem, Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica, Arapiraca-AL, BRAZIL, Prof.ª Dr.ª; Email: elainevms@yahoo.com.br;

⁽¹²⁾ ORCID: 0000-0003-0897-7775; Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunologia Keizo Asami, Recife-PE, BRAZIL, Prof. Dr.; Email: joseluz60@gmail.com.

Corresponding Author: MSc. Ithallo Sathio Bessoni Tanabe

E-mail: ithallo.tanabe@arapiraca.ufal.br

AL 115, Km 6,5, Bom Sucesso, city of Arapiraca-Alagoas, BRAZIL, CEP: 57800-970.

Telephone: +55 82 8482-1880

Todo o conteúdo expresso neste artigo é de inteira responsabilidade dos seus autores.

Recebido em: 28 de outubro de 2019; Aceito em: 10 de maio de 2020; publicado em 10 de 10 de 2020. Copyright © Autor, 2020.

ABSTRACT: The aim of this study was to present the circulating HPV genotypes in a population from northeast Brazil. HPV was detected by nested-Polymerase Chain Reaction (nPCR) method using primers MY09/11 and GP5+/6+. HPV sequencing was performed by the method of Sanger. The HPV 16 was the most frequent (35.7%), followed by HPV 58 (14.3%). In conclusion, we identified, in one population from Northeast Brazil, a low prevalence of HPV 18 present in the vaccine provided by Unified Health System and a high prevalence of HPV 58 which is not present in this vaccine.

KEYWORDS: HPV, Oncology and Woman Healthy.

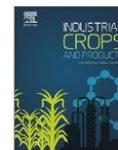
RESUMO: O objetivo deste estudo foi apresentar os genótipos circulantes do HPV em uma população do nordeste do Brasil. O HPV foi detectado pelo método de reação em cadeia da polimerase aninhada (nPCR) usando os iniciadores MY09 / 11 e GP5 + / 6 +. O sequenciamento do HPV foi realizado pelo método de Sanger. O HPV 16 foi o mais frequente (35,7%), seguido do HPV 58 (14,3%). Concluindo, identificamos, em uma população do Nordeste do Brasil, baixa prevalência do HPV 18 presente na vacina fornecida pelo Sistema Único de Saúde e alta prevalência do HPV 58 que não está presente nesta vacina.

PALAVRAS-CHAVE: HPV, Oncologia e Mulher Saudável.



Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops & Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

Schinus terebinthifolius Raddi extracts: From sunscreen activity toward protection of the placenta to Zika virus infection, new uses for a well-known medicinal plant



Monika B.S. Oliveira^a, Iara B. Valentim^b, Tauane S. Rocha^a, Jaqueline C. Santos^c, Keyla S.N. Pires^c, Eloiza L.L. Tanabe^c, Karen S.C. Borbely^{c,d}, Alexandre U. Borbely^{c,*}, Marília O.F. Goulart^{a,*}

^a Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Instituto de Química e Biotecnologia, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, 57072-970, Maceió, AL, Brazil

^b Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Alagoas (IFAL), Rua Micael Domingues, 75, Cenuro, CEP 57020-600, Maceió, AL, Brazil

^c Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Biologia Celular, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, 57072-970, Maceió, AL, Brazil

^d Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Faculdade de Nutrição, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, 57072-970, Maceió, AL, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Schinus terebinthifolius Raddi
Photoprotection
Sunscreen formulation
Zika virus
Placenta protection
Antiviral activity

ABSTRACT

Schinus terebinthifolius Raddi is a well-known medicinal plant native of South America. This species has demonstrated important biological activities such as antihypertensive and vasodilator, antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant. However, no studies have been, so far, reported with the fruits of *S. terebinthifolius* as a protector of the placenta against Zika virus infection and as sunscreen agents. The present study aimed to investigate new uses for the ethanolic fruit extracts of *S. terebinthifolius*, from fruits'peel (STPE) and from the whole fruits (STWFE). Zika virus (ZIKV) has been linked to several fetal malformations, such as microcephaly and other central nervous system abnormalities. Thus, the potential of these natural extracts against ZIKV infection was evaluated, using an *in vitro* method. The photoprotective potential, determined by spectrometry, along with phenolic content, antioxidant capacity, and chemical composition of both extracts were also evaluated. The chemical composition of the extracts was evaluated by HPLC-UV / vis. The cytotoxicity of peel and whole fruit extracts in vero E6 cell lines, in placental cell lines and placental explant cultures were evaluated by the MTT assay. The infectivity of placental cells and explants was evaluated by qRT-PCR and the effects of extracts on ZIKV infection were investigated using HTR-8/SVneo cells, pre-treated with 100 µg mL⁻¹ of STWFE for 1 h, and infected with MR766 (AD) or PE243 (EH) ZIKV strains. STPE and STWFE were well-tolerated by both placental-derived trophoblast cell line HTR-8/SVneo as well as by term placental chorionic villi explants, which indicate absence of cytotoxicity in all analysed concentrations. Two strains of ZIKV were tested to access if pre-treatment of trophoblast cells with the STWFE would protect them against infection. Flow cytometry analysis revealed that STWFE extract greatly reduced ZIKV infection. The extracts were also photoprotective with SPF values equivalent to the standard, benzophenone-3. The formulations prepared in different concentrations of the extracts (5–10 %) had shown maximum SPF values of 32.21. STWFE represents a potential natural mixture to be used in pregnancy in order to restrain placental infection by ZIKV and might potentially protect fetus against ZIKV-related malformations. The extracts exhibited photoprotective activity and some of the phenolic compounds, mainly resveratrol, catechin and epicatechin, are active ingredients in all assayed activities. The development of biotechnological/medical products, giving extra value to products from family farming, is expected, with strong prospects for success.

* Corresponding authors at: Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Campus A.C. Simões, Tabuleiro dos Martins, 57072-970, Maceió, AL, Brazil.

E-mail addresses: alexandre.borbely@icbs.ufal.br (A.U. Borbely), mofg@qui.ufal.br (M.O.F. Goulart).

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112503>

Received 13 December 2019; Received in revised form 22 April 2020; Accepted 23 April 2020

Available online 28 April 2020

0926-6690/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

The limited knowledge of placental damage due to neglected infections: ongoing problems in Latin America

Isabela Moreti Ribeiro^a, Paula Cristina Souza Souto^a, Alexandre U. Borbely^{a,b}, Eloiza Lopes Lira Tanabe^b, Angela Cadavid^c, Angela M. Alvarez^c, Julio Bueno^c, Olga Agudelo^d, Reggie García Robles^e, Paola Ayala-Ramírez^f, Flavia Sacerdoti^g, Theodora Szasz^h, Alicia E. Damiano^{i,j}, Cristina Ibarraⁱ, Carlos Escudero^k, Victor V. Lima^a, and Fernanda R. Giachini^a, on behalf of RIVATREM*

^aLaboratory of Vascular Biology and Histopathology, Institute of Health Sciences and Health, Federal University of Mato Grosso, Barra Do Garcas, Brazil; ^bCell Biology Laboratory, Institute of Health and Biological Sciences, Federal University of Alagoas, Alagoas, Brazil; ^cGrupo Reproducción, Facultad De Medicina Universidad De Antioquia, Medellín, Colombia; ^dGrupo Salud Y Comunidad, Facultad De Medicina Universidad De Antioquia, Medellín, Colombia; ^ePhysiological Sciences Department, Faculty of Medicine, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia; ^fHuman Genetics Institute, Facultad De Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia; ^gLaboratorio De Fisiopatogenia, Instituto De Fisiología Y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO)- CONICET- Departamento De Fisiología, Facultad De Medicina, Universidad De Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina; ^hDepartamento of Physiology, Augusta University, Augusta, USA; ⁱCátedra De Biología Celular Y Molecular, Departamento De Ciencias Biológicas, Facultad De Farmacia Y Bioquímica, Universidad De Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina; ^jLaboratorio De Biología De La Reproducción, Instituto De Fisiología Y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO)- CONICET- Facultad De Medicina, Universidad De Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina; ^kVascular Physiology Laboratory, Group of Research and Innovation in Vascular Health (GRIVAS Health), Basic Sciences Department Faculty of Sciences, Universidad Del Bio-Bio, Chillan, Chile

ABSTRACT

The placenta works as a selective barrier, protecting the fetus from potential infections that may affect the maternal organism during pregnancy. In this review, we will discuss several challenging infections that are common within Latin American countries and that may affect the maternal-fetal interface and pose risks to fetal development. Specifically, we will focus on emerging infectious diseases including the arboviruses, malaria, leishmaniasis, and the bacterial foodborne disease caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. We will also highlight some topics of interest currently being studied by research groups that comprise an international effort aimed at filling the knowledge gaps in this field. These topics address the relationship between exposure to microorganisms and placental abnormalities, congenital anomalies, and complications of pregnancy.

Abbreviations: ADE: antibody-dependent enhancement; CCL2: monocyte chemoattractant protein-1; CCL3: macrophage inflammatory protein-1 α ; CCL5: chemokine (C-C motif) ligand 5; CHIKV: chikungunya virus; DCL: diffuse cutaneous leishmaniasis; DENV: dengue virus; Gb3: glycolipid globotriaosylceramide; HIF: hypoxia-inducible factor; HUS: hemolytic uremic syndrome; IFN: interferon; Ig: immunoglobulins; IL: interleukin; IUGR: intrauterine growth restriction; LCL: localized cutaneous leishmaniasis; LPS: lipopolysaccharide; MCL: mucocutaneous leishmaniasis; NO: nitric oxide; PCR: polymerase chain reaction; PGF: placental growth factor; PM: placental malaria; RIVATREM: Red Iberoamericana de Alteraciones Vasculares em transtornos del Embarazo; sVEGFR: soluble vascular endothelial growth factor receptor; STEC: shiga toxin-producing *Escherichia coli*; stx: shiga toxin protein; TNF: tumor necrosis factor; TOAS: T cell original antigenic sin; Var2CSA: variant surface antigen 2-CSA; VEGF: vascular endothelial growth factor; VL: visceral leishmaniasis; WHO: world health organization; YFV: yellow fever virus; ZIKV: Zika virus

ARTICLE HISTORY

Received 3 November 2019
Revised 3 March 2020
Accepted 8 March 2020

KEYWORDS

Microbiome; placenta;
dysbiosis; infection;
pregnancy complications;
placental diseases

Introduction

The placenta has many vital functions, such as transport of nutrients and respiratory gases and secretion of hormones, among other essential roles that allow healthy embryonic/fetal development. Another important placental role is to serve as a selective barrier, protecting the fetus of potentially deleterious infections

that may affect the maternal organism during pregnancy (Burton et al. 2016). These infections affecting the fetus during pregnancy may result either from intra-uterine vertical transmission or from unexpected shifts within the intra-uterine microbiome.

While the maternal organism tolerates the allogeneic fetus, it must also protect itself against invading agents.

CONTACT Fernanda R. Giachini  fernandagiachini@hotmail.com  Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Universitário do Araguaia, Av. Valdon Varjon, 6390. Casa De Pesquisa 9., 78607-059 Barra Do Garcas, Brazil.

*RIVATREM – Red Iberoamericana De Alteraciones Vasculares Em Transtornos Del Embarazo. www.rivatrem.org

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - General Subjects

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbagen

Biomechanical and functional properties of trophoblast cells exposed to Group B Streptococcus *in vitro* and the beneficial effects of uvaol treatment



R.M. Botelho^{a,1}, L.P.G. Tenorio^{a,1}, A.L.M. Silva^a, E.L.L. Tanabe^a, K.S.N. Pires^a, C.M. Gonçalves^a, J.C. Santos^a, A.L.X. Marques^a, M.J. Allard^b, J.D. Bergeron^c, G. Sebire^{b,c}, E.C.O. Silva^d, S.T. Souza^d, E.J.S. Fonseca^d, A.U. Borbely^a, K.S.C. Borbely^{a,e,*}

^a Cell Biology Laboratory, Institute of Health and Biological Sciences, Federal University of Alagoas, Maceio, Brazil

^b Department of Pediatrics, McGill University, Montreal, Canada

^c Department of Pediatrics, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada

^d Optics and Nanoscopy Group, Physics Institute, Federal University of Alagoas, Maceio, Brazil

^e Faculty of Nutrition, Federal University of Alagoas, Maceio, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Atomic force microscopy
Chorioamnionitis
Group B Streptococcus
Placenta
Uvaol
Trophoblast

ABSTRACT

Background: Group B streptococcus (GBS) is the main bacteria that infects pregnant women and can cause abortion and chorioamnionitis. The impact of GBS effects on human trophoblast cells remains largely elusive, and actions toward anti-inflammatory strategies in pregnancy are needed. A potent anti-inflammatory molecule, uvaol is a triterpene from olive oil and its functions in trophoblasts are unknown. We aimed to analyze biomechanical and functional effects of inactivated GBS in trophoblast cells, with the addition of uvaol to test potential benefits.

Methods: HTR-8/SVneo cells were treated with uvaol and incubated with inactivated GBS. Cell viability and death were analyzed. Cellular elasticity and topography were accessed by atomic force microscopy. Nitrite production was evaluated by Griess reaction. Nuclear translocation of NFκB p65 was detected by immunofluorescence and Th1/Th2 cytokines by bead-based multiplex assay.

Results: GBS at 10⁸ CFU increased cell death, which was partially prevented by uvaol. Cell stiffness, cytoskeleton organization and morphology were changed by GBS, and uvaol partially restored these alterations. Nuclear translocation of NFκB p65 began 15 min after GBS incubation and uvaol inhibited this process. GBS decreased IL-4 secretion and increased IL-1β, IFN-γ and IL-2, whereas uvaol reverted this.

Conclusions: The increased inflammation and cell death caused by GBS correlated with biomechanical and cytoskeleton changes found in trophoblast cells, while uvaol was effective its protective role.

General significance: Uvaol is a natural anti-inflammatory product efficient against GBS-induced inflammation and it has potential to be acquired through diet in order to prevent GBS deleterious effects in pregnancy.

1. Background

The placenta is a unique immunological site, responsible for maternal tolerance to the allogeneic fetus and for maternal and fetal defense against possible pathogens. Maternal decidual cells and several leukocytes in the basal decidua of the placenta are involved in local and systemic immunomodulation, however, fetal trophoblast cells are also critically involved in decidual defense against pathogens [1]. Similar to immune cells, trophoblast cells express different receptors from the

innate immune response, such as Toll-like receptors (TLR). These are known to bind to pathogen-associated molecular patterns (PAMP) [2], such as lipoteichoic acid and peptidoglycan present on the gram-positive bacteria surface, and bind to TLR-2 [3] and other TLR receptors [4,5]. The TLR-2 and its co-receptors TLR-1 and TLR-6 are also known to be expressed in different types of cells in the maternal-fetal interface during the first trimester, such as trophoblast cells, decidual cells and all decidual leukocytes [6,7].

One important gram-positive bacterium is *Streptococcus agalactiae* or

* Corresponding author at: Faculty of Nutrition, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões. Av. Lourival Melo Mota, s/n, 57072-970, Maceio, Alagoas, Brazil.

E-mail address: ksteponcb@gmail.com (K.S.C. Borbely).

¹ Authors have contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.06.012>

Received 19 April 2019; Received in revised form 21 June 2019; Accepted 24 June 2019

Available online 26 June 2019

0304-4165/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.



Cytokines and chemokines triggered by Chikungunya virus infection in human patients during the very early acute phase

Ithallo S. B. Tanabe^a, Elane C. Santos^a, Eloiza L. L. Tanabe^a, Stephannie J. M. Souza^a, Fabio E. F. Santos^a, Jamile Taniele-Silva^a, Jean F. G. Ferro^b, Magliones C. Lima^b, Adriana A. Moura^c, Leticia Anderson^{a,d} and Ênio J. Bassi^{a,*}

^aIMUNOREG–Grupo de Pesquisa em Regulação da Resposta Imune, Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, 57072-900, Maceió, Alagoas, Brazil; ^bLaboratório Central de Saúde Pública de Alagoas, 57036-860, Maceió, Alagoas, Brazil; ^cFaculdade de Medicina, Universidade Federal de Alagoas, 57072-900, Maceió, Alagoas, Brazil; ^dCentro Universitário CESMAC, 57081-350, Maceió, Alagoas, Brazil

*Corresponding author: Tel: +55-82-3214-1536; E-mail: enio.bassi@icbs.ufal.br

Received 18 March 2019; revised 8 June 2019; editorial decision 24 June 2019; accepted 25 June 2019

Background: The immune response against the Chikungunya virus (CHIKV) during the very early acute phase is not fully elucidated. Therefore we explored the cytokine and chemokine profile triggered by CHIKV in infected patients.

Methods: Cytokines, chemokines and C5a anaphylatoxin were analysed in serum from CHIKV-infected patients during the viraemic phase (mean 2.97±1.27 d after illness onset) compared with a healthy group.

Results: CHIKV-infected patients had a significant increase of interferon- α (IFN- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (CXCL8/IL-8), interleukin-10 (IL-10), interferon- γ (IFN- γ), monokine induced by interferon- γ (CXCL9/MIG), monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2/MCP-1), interferon- γ -induced protein-10 (CXCL10/IP-10) and complement C5a anaphylatoxin.

Conclusions: The very early acute immune response triggered against CHIKV leads to an increase in pro-inflammatory immune mediators such as IFN- γ and its induced chemokines, and a high level of C5a anaphylatoxin as a result of complement activation.

Keywords: acute immune response, arboviruses, chemokines, chikungunya virus, complement system, cytokines

Introduction

Chikungunya virus (CHIKV) is an emergent arbovirus transmitted by mosquitoes in tropical and subtropical regions that is responsible for outbreaks around the world in recent years.¹ The acute phase occurs during the first 2 weeks after the onset of the disease and is characterized by fever, headache, skin rash and polyarthralgia. The disease can progress to the chronic phase, with persistent arthralgia for months or even years. The immune soluble analytes profile present in the blood of infected patients during different stages of the disease has been explored in various studies.^{2–6} However, the early acute immune response triggered by CHIKV in the first days of infection has not been fully elucidated. Therefore, in this study we investigated the levels of 12 soluble analytes of the immune response in the very early acute phase in CHIKV-infected patients.

Materials and methods

In this study, patients underwent a medical examination (on the day of blood sample collection) and the day of initial symptoms onset was obtained. This study analysed 29 serum samples from CHIKV-infected patients in the very early acute phase and 21 serum samples of healthy donors (see Supplementary data). All samples were tested with reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) with primers to detect the CHIKV genome (5'-TCA CTC CCT GTT GGA CTT GAT AGA-3', 5'-TTG ACG AAC AGA GTT AGG AAC ATA CC-3') and the probe (5'-FAM-AGGTACGCG/ZEN/CTTCAAGTTCGG CG-IwBFQ-3') in the Superscript III Platinum One-Step RT-qPCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and immune assays to reveal anti-Chikungunya virus immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Euroimmun, Lübeck, Germany), anti-Zika virus IgM antibodies by immunochromatographic assay

ANEXO C – Produtos de Tese (Livros)

UNIVERSIDADE PARA A COMUNIDADE: ações sociais no enfrentamento à pandemia de COVID-19



**ORGANIZADORES:
MEIRIELLY KELLYA HOLANDA DA SILVA
ANDREIVNA KHARENINE SERBIM
KAROL FIREMAN DE FARIAS
ANA CAROLINE MELO DOS SANTOS
JOSÉ ANDERSON DOS SANTOS**

Universidade para a comunidade: ações sociais no enfrentamento à pandemia de COVID-19

Universidade Federal de Alagoas – UFAL
Biblioteca Campus Arapiraca - BCA
Bibliotecário Responsável: Nestor Antonio Alves Junior
CRB - 4 / 1557

U58 Universidade para a comunidade: ações sociais no enfrentamento à
pandemia de COVID-19. / Organização de Meirielly Kellya Holanda da
Silva, Andreivna Kharenine Serbim, Karol Fireman de Farias, Ana Caroline Melo
dos Santos, José Anderson dos Santos. – Arapiraca, AL: Amazon, 2020.
168 p.: il.

ISBN 978-65-00-151-29-9 (e-book).

1. Coronavirus – COVID 19. 2. Pandemia – COVID-19. 3. Telemonitoramento
de saúde. 4. Extensão universitária. 4. Tecnologia da informação – COVID 19.
I. Silva, Meirielly Kellya Holanda da. II. Serbim, Andreivna Kharenine. III. Farias,
Karol Fireman de. IV. Santos, Ana Caroline Melo dos. V. Santos, José Anderson dos.

CDU 378:578.834

Universidade para a comunidade: ações sociais no enfrentamento à pandemia de COVID-19

CAPÍTULO 5

Atuando na prevenção da COVID-19 no interior de Alagoas – um relato de experiência da ação de extensão “Unidos pelo Bem”

Rafaela Lira Mendes Costa
Christiane Cavalcante Feitoza
Carlos Alberto de Carvalho Fraga
Eloiza Lopes de Lira
Victor Santana Santos
Maria Cristina Cavalcante da Silva
Marta Maurícia Limeira de Oliveira
Igor Ricardo Cavalcante da Silva
Francisco Vicente da Silva Junior
Luciana Xavier Pereira

Atuando na prevenção da COVID-19 no interior de Alagoas – um relato de experiência da ação de extensão “Unidos pelo Bem”

A Universidade tem identificado e respondido a diversas demandas que reafirmam na prática o seu papel de proporcionar transformações benéficas para a sociedade. O seu

HOST-PATHOGEN INTERACTIONS DURING ARBOVIRAL INFECTIONS

Topic Editors:

Alan G. Goodman, Washington State University, United States

Angela L. Rasmussen, Columbia University, United States

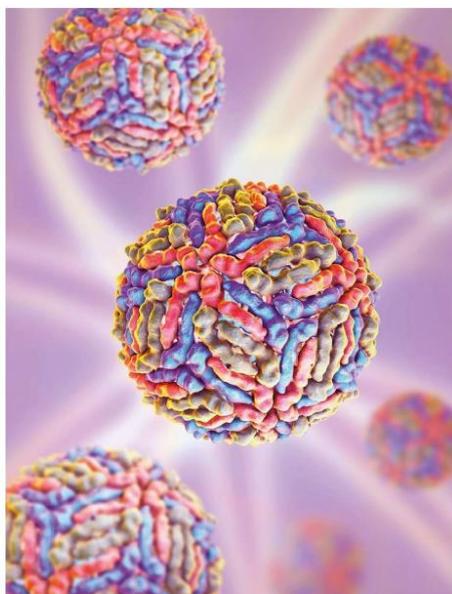


Image: Kateryna Kon/Shutterstock.com

Arboviruses, or arthropod-borne viruses, such as West Nile virus, Dengue virus, and Zika virus, pose a serious threat to public health worldwide. West Nile virus was introduced to the United States in 1999, and is now endemic, causing over 2,000 domestically acquired cases in the U.S. annually in mammals. Similarly, dengue and Zika viruses are endemic in the Americas and pose novel threats to the human population. Tick-borne viruses such as Powassan virus and Heartland virus are increasing in frequency in the U.S. At this time, there is no commercially available vaccine or therapeutic to treat these viral infections. Because nearly every mammalian case of these virus infections originates from the insect vector, it is imperative that we also understand viral pathogenesis, transmission, and the immune response in insect models as well as pathogenesis and the host responses in infected mammals.

Table of Contents

SECTION 1

FOREWORD

- 06** *Editorial: Host-Pathogen Interactions During Arboviral Infections*
Alan G. Goodman and Angela L. Rasmussen

SECTION 2

ORIGINAL RESEARCH ARTICLES

- 09** *Monocyte-Derived Dendritic Cells as Model to Evaluate Species Tropism of Mosquito-Borne Flaviviruses*
Obdulio García-Nicolás, Marta Lewandowska, Meret E. Ricklin and Artur Summerfield
- 22** *Corrigendum: Monocyte-Derived Dendritic Cells as Model to Evaluate Species Tropism of Mosquito-Borne Flaviviruses*
Obdulio García-Nicolás, Marta Lewandowska, Meret E. Ricklin and Artur Summerfield
- 24** *Innate Immune Response of Primary Human Keratinocytes to West Nile Virus Infection and its Modulation by Mosquito Saliva*
Magali Garcia, Haoues Alout, Fodé Diop, Alexia Damour, Michèle Bengue, Mylène Weill, Dorothée Missé, Nicolas Lévêque and Charles Bodet
- 37** *Dengue Virus Infects Primary Human Hair Follicle Dermal Papilla Cells*
Kai-Che Wei, Mei-Shu Huang and Tsung-Hsien Chang
- 47** *Human Kinase/Phosphatase-Wide RNAi Screening Identified Checkpoint Kinase 2 as a Cellular Factor Facilitating Japanese Encephalitis Virus Infection*
Yi-Lin Chan, Ching-Len Liao and Yi-Ling Lin
- 56** *Increased Relative Risk of Tick-Borne Encephalitis in Warmer Weather*
Milan Daniel, Vlasta Danielová, Alena Fialová, Marek Malý, Bohumír Kříž and Patricia A. Nuttall

SECTION 3

REVIEWS

- 67** *Mapping Arbovirus-Vector Interactions Using Systems Biology Techniques*
Marine J. Petit and Priya S. Shah
- 74** *The Role of Host Cholesterol During Flavivirus Infection*
Juan Fidel Osuna-Ramos, José Manuel Reyes-Ruiz and Rosa Maria del Ángel
- 86** *Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection*
Ithallo S. B. Tanabe, Eloiza L. L. Tanabe, Elane C. Santos, Wanessa V. Martins, Isadora M. T. C. Araújo, Maria C. A. Cavalcante, Ana R. V. Lima, Niels O. S. Câmara, Leticia Anderson, Dinar Yunusov and Ênio J. Bassi

ANEXO D – Produtos de Tese (Patentes)



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102021001478-4 A2



(22) Data do Depósito: 26/01/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 09/08/2022

(54) **Título:** EXTRATOS DE SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS RADDI: ATIVIDADE FOTOPROTETORA E PROTEÇÃO DA PLACENTA À INFECÇÃO POR VÍRUS ZIKA

(51) **Int. Cl.:** A61K 36/22; A61K 8/9789; A61K 129/00; A61K 131/00; A61P 31/14; (...).

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS.

(72) **Inventor(es):** MARÍLIA OLIVEIRA FONSECA GOULART; MÔNICA BEZERRA DOS SANTOS OLIVEIRA; TAUANE DOS SANTOS ROCHA; ALEXANDRE URBAN BORBELY; JAQUELINE CORREIA SANTOS; MONIQUE ALMEIDA VILA NOVA; KEYLA S. N. PIRES; ELOISA L. L. TANABÉ; KAREN STEPONAVICIUS CRUZ BORBELY; IARA BARROS VALENTIM.

(57) **Resumo:** EXTRATOS DE SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS RADDI: ATIVIDADE FOTOPROTETORA E PROTEÇÃO DA PLACENTA À INFECÇÃO POR VÍRUS ZIKA. A presente invenção refere-se à obtenção e ao emprego de extratos etanólicos da casca e dos frutos inteiros de Schinus terebinthifolius Raddi como protetor da placenta contra a infecção causada pelo vírus da Zika e como agente de proteção solar. Os extratos demonstraram ação antiviral contra a infecção pelo vírus da Zika, em células trofoblásticas, sem toxicidade celular e potencial fotoprotetor, atuando como ingrediente ativo em formulações protetoras. E ainda, em ação complementar, os extratos apresentaram ação antioxidante. Em vista das suas características, os extratos obtidos podem atuar nas áreas cosméticas e/ou farmacêuticas.

