



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Laura Otto Walter

**RESPOSTA IMUNE DOS PACIENTES INFECTADOS PELO SARS-COV-2: UM
ESTUDO TRANSVERSAL**

Florianópolis
2022

Laura Otto Walter

**RESPOSTA IMUNE DOS PACIENTES INFECTADOS PELO SARS-COV-2: UM
ESTUDO TRANSVERSAL**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Cláudia Santos da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Walter, Laura Otto

Resposta Imune dos Pacientes Infectados pelo SARS-CoV
2: Um Estudo Transversal / Laura Otto Walter ;
orientadora, Maria Cláudia Santos-Silva, coorientador,
Eduardo Monguilhott Dalmarco, 2022.
132 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. COVID-19. 3. SARS-CoV-2. 4. Sistema
imune. 5. Citometria de fluxo. I. Santos-Silva, Maria
Cláudia. II. Dalmarco, Eduardo Monguilhott . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmácia. IV. Título.

Laura Otto Walter

Resposta Imune dos Pacientes Infectados pelo SARS-CoV-2: Um Estudo Transversal

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Alex Freire Sandes, Dr.
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Carlos R. Zárate-Bladés, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Izabel Galhardo Demarchi, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Farmácia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.^a Maria Cláudia Santos da Silva, Dr.^a
Orientadora

Florianópolis

2022

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado em um momento muito delicado do cenário mundial, frente à uma pandemia que mobilizou nações e trouxe muitas dificuldades. Assim, não posso deixar de agradecer a todos os que nos deram as mãos para que este trabalho se tornasse possível.

Agradeço primeiramente a Deus e à minha família. Meus pais, Silvio e Josselene, minha irmã e melhor amiga Ana Carolina e meu cunhado André, minha madrinha Rosenete e família, e ao meu marido Gustavo, por todo o incentivo e por sempre estarem ao meu lado, nos momentos bons e ruins da vida.

Agradeço à minha orientadora, Prof.^a Maria Cláudia Santos da Silva, que me acolheu há tantos anos e sempre incentivou o meu crescimento. Obrigada pelas oportunidades, por sempre ter um horário disponível nos momentos em que eu precisei, por demonstrar preocupação comigo mesmo nos assuntos que ultrapassam o doutorado. Foi uma honra poder aprender com uma profissional tão competente e comprometida.

Agradeço ao meu coorientador, Prof. Eduardo Monguilhott Dalmarco, que sempre esteve presente em todas as etapas do projeto e contribuiu com o meu crescimento acadêmico.

Agradeço aos meus colegas do LOEH, que foram tantos nesses anos todos. À Íris, Mariana e Chandra que me ensinaram tanto e desde a graduação foram pessoas nas quais eu me espelhei e que admiro muito; às meninas, Ana, Amanda, Lisandra, Camila, Dani, Helo, Rafa, Isabel, Nati, Bruna e ao João e ao Sandro, que tornaram os meus dias no laboratório mais leves e felizes. Sentirei saudade das nossas conversas, risadas e cafés.

Agradeço aos demais integrantes do Projeto COVID-19: Julia, Eduarda, Tainá e Mariano, do LAPI; à Prof.^a Ana e Prof.^a Iara; às médicas Dra. Ivete, Dra. Patrícia e Dra. Magali; e a todos os profissionais do HU que participaram da coleta das amostras e atendimento aos pacientes. Foi incrível trabalhar com profissionais tão competentes como vocês.

Agradeço aos professores membros da banca examinadora da qualificação, Maria Luiza Bazzo, Ziliani Da Silva Buss e Carlos Rodrigo Zárate Bladés, que contribuíram para a melhoria deste trabalho. Agradeço também aos professores membros da banca da defesa, Carlos Rodrigo Zárate Bladés, Izabel Galhardo Demarchi e Alex Freire Sandes pela disponibilidade em avaliar esta tese.

Por fim, agradeço ao PPGFar, CNPq e CAPES pelas oportunidades e pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

A COVID-19 é uma infecção respiratória causada pelo SARS-CoV-2 e marcada por uma resposta inflamatória intensa e desregulação imunológica nos casos mais graves. A fim de esclarecer melhor a relação entre as alterações do sistema imune periférico e a gravidade da doença, este estudo teve como objetivo avaliar o perfil imunológico dos pacientes com COVID-19. Para isso, 157 pacientes com COVID-19 foram estratificados em doença leve (n = 36), moderada (n = 30), grave (n = 32) e crítica (n = 59). Os componentes celulares e citocinas circulantes foram avaliados por citometria de fluxo. As concentrações de óxido nítrico (NO) e mieloperoxidase (MPO) foram medidas por testes colorimétricos. Os resultados foram comparados com 30 controles saudáveis. Diante disso, os pacientes com COVID-19 apresentaram neutrofilia relativa e absoluta, com sinais de mielopoiese de emergência, principalmente nos quadros mais graves. Os neutrófilos também apresentaram aumento da expressão de CD62L, nos quadros moderado à crítico, quando comparados ao grupo controle e pacientes leves. Além disso, foi observado o aumento da relação neutrófilo-linfócito (RNL) nesses pacientes, devido ao aumento dos neutrófilos e redução de linfócitos. A redução de linfócitos ocorreu em linfócitos T e B, mas principalmente nas células T, que não apresentaram aumento na sua diferenciação, apenas nos pacientes com quadro leve. Dentro do compartimento de células T, em pacientes com quadro leve a crítico, também foi observada a redução das células T regulatórias (Treg), o que pode perturbar o equilíbrio entre as funções reguladoras e efectoras do sistema imune, pois essas células evitam uma resposta imune exacerbada. O compartimento de células B também apresentou diversas alterações, com redução das células B de memória (BM) e aumento de plasmablastos, especialmente nos pacientes com quadros mais graves de COVID-19. Os pacientes com COVID-19 também apresentaram sinais de imunossupressão, observados pela redução da expressão de HLA-DR (MHC-II) em monócitos nos pacientes com quadro grave e crítico. Além disso, esses pacientes apresentaram aumento da frequência de monócitos clássicos (cMo) e redução de monócitos não clássicos (ncMo). Essas células também demonstraram aumento de marcadores atípicos, como o CD56, o que parece estar associado com a gravidade da doença. Em relação ao compartimento de células dendríticas (DCs), os pacientes com COVID-19, com quadro moderado à crítico, apresentaram redução das DCs plasmocitoides (pDC) e aumento das DCs clássicas (cDC). No entanto, os valores absolutos das DCs se demonstraram reduzidos nesses pacientes. Por fim, os pacientes com COVID-19 apresentaram aumento de MPO, interleucina (IL)-12, IL-6, IL-10 e IL-8, acompanhado de redução de IL-17A e NO. As concentrações elevadas de IL-10 e a contagem relativa de neutrófilos demonstraram estar relacionados à mortalidade, o que torna esses parâmetros possíveis biomarcadores de prognóstico para os pacientes com COVID-19. Os resultados deste estudo indicam a presença de efeitos no sistema imune induzidos pela COVID-19, que parecem estar relacionados à fisiopatologia da doença.

Palavras-chave: COVID-19; SARS-CoV-2; sistema imune; citometria de fluxo.

ABSTRACT

COVID-19 is a respiratory infection caused by SARS-CoV-2 and marked by an intense inflammatory response and immune dysregulation in the most severe cases. To clarify the relationship between peripheral immune system changes and disease severity, this study aimed to assess the immune profile of patients with COVID-19. For this, 157 patients with COVID-19 were stratified into mild (n = 36), moderate (n = 30), severe (n = 32) and critical (n = 59) disease. Cellular components and circulating cytokines were evaluated by flow cytometry. Nitric oxide (NO) and myeloperoxidase (MPO) levels were measured by colorimetric tests. The results were compared with 30 healthy controls. Therefore, patients with COVID-19 presented relative and absolute neutrophilia, with signs of emergency myelopoiesis, especially in the most severe cases. Neutrophils also showed increased expression of CD62L, in moderate to critical conditions, when compared to the control group and mild patients. In addition, an increase in the neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) was observed in these patients, due to an increase in neutrophils and a reduction in lymphocytes. Lymphocyte reduction occurred in T and B lymphocytes, but mainly in T cells, which did not show an increase in their differentiation, only in patients with mild symptoms. Within the T cell compartment, in patients with mild to critical conditions, a reduction in regulatory T cells (Treg) was also observed, which can disturb the balance between the regulatory and effector functions of the immune system, since these cells avoid an exacerbated immune response. The B cell compartment also showed several changes, with a reduction in memory B cells (BM) and an increase in plasmablasts, especially in patients with more severe cases. Patients with COVID-19 also showed signs of immunosuppression, observed by reduced expression of HLA-DR (MHC-II) in monocytes in patients with severe and critical condition. In addition, these patients showed an increased frequency of classical monocytes (cMo) and a reduction of non-classical monocytes (ncMo). These cells also showed an increase in atypical markers, such as CD56, which seems to be associated with the severity of the disease. Regarding the compartment of dendritic cells (DCs), patients with COVID-19, with a moderate to critical condition, showed a reduction in plasmacytoid DCs (pDCs) and an increase in classical DCs (cDCs). However, the absolute values of DCs were reduced in these patients. Finally, patients with COVID-19 had an increase in MPO, interleukin (IL)-12, IL-6, IL-10, and IL-8, accompanied by a reduction in IL-17A and NO. IL-10 concentrations and relative neutrophil counts have been shown to be related to mortality, which makes these parameters possible prognostic biomarkers for patients with COVID-19. The results of this study indicate the presence of systemic effects induced by COVID-19, which appear to be related to the pathophysiology of the disease.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; immune system; flow cytometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mutações em aminoácidos da região RBD de diferentes cepas de SARS-CoV-2. .	19
Figura 2 - Entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira e replicação viral.....	20
Figura 3 - Espectro clínico da COVID-19.....	25
Figura 4 - Sistema imune inato e adaptativo.	26
Figura 5 - Formas de reconhecimento de processos inflamatórios e/ou infecciosos por linfócitos NK.	31
Figura 6 - Maturação dos linfócitos T $\alpha\beta$ no timo.....	33
Figura 7 - Diferenciação T-dependente de células B.	36
Figura 8 - Resposta imune em pacientes com COVID-19.	38
Figura 9 - Contagem absoluta dos leucócitos do SP de pacientes com COVID-19.....	52
Figura 10 - Contagem relativa dos leucócitos do SP de pacientes com COVID-19.	53
Figura 11 - Avaliação dos neutrófilos do SP de pacientes com COVID-19.	54
Figura 12 - Alterações no compartimento monocítico no SP de pacientes com COVID-19. ..	56
Figura 13 - Expressão de HLA-DR em monócitos do SP de pacientes com COVID-19.	58
Figura 14 - Expressão de CD56 e CD62L em monócitos do SP de pacientes com COVID-19.	60
Figura 15 - Alterações no compartimento de DCs no SP de pacientes com COVID-19.	61
Figura 16 - Valores absolutos e relativos da contagem de células NK, NK56++ e NKT.	63
Figura 17 - Grau de maturação de linfócitos T no SP de pacientes com COVID-19.....	66
Figura 18 - Alterações na ativação de linfócitos T no SP de pacientes com COVID-19.....	67
Figura 19 - Frequências de células Treg no SP de pacientes com COVID-19.....	69
Figura 20 - Alterações no compartimento de linfócitos B do SP de pacientes com COVID-19.	71
Figura 21 - Concentrações plasmáticas de MPO e NO em pacientes com COVID-19.....	73
Figura 22 - Concentrações plasmáticas de citocinas em pacientes com COVID-19.....	75
Figura 23 - Curva ROC dos parâmetros relacionados com a mortalidade em pacientes com COVID-19.	78
Figura 24 - Sobrevida acumulada em 30 dias após o diagnóstico em pacientes com COVID-19.	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Painel de anticorpos utilizado no estudo.....	42
Quadro 2 - Volume de amostra utilizada para os tubos 2, 3, 4 e 6 para a marcação de anticorpos.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos pacientes com COVID-19.	47
Tabela 2 - Resultados laboratoriais dos pacientes com COVID-19.	49
Tabela 3 - Expressão de HLA-DR na superfície de monócitos.....	58
Tabela 4 - Contagem relativa e absoluta das subpopulações de linfócitos T.	64
Tabela 5 - Valores absolutos de células Treg no SP de pacientes com COVID-19.....	70
Tabela 6 - Anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgM e IgG no SP de pacientes com COVID-19.....	73
Tabela 7 – Ponto de corte, sensibilidade e especificidade dos parâmetros relacionados a mortalidade em pacientes com COVID-19.	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT Alanina Aminotransferase

ANOVA Análise de Variância

AST Aspartato Aminotransferase

AUC Área Sob a Curva

BCR, do inglês *B cell receptor*

BM B de Memória

BM-CS, do inglês *class-switched-BM*

BN B Naïve

BV421 Brilliant Violet 421

CBA Cytometric Bead Array

cDCs Células Dendríticas Clássicas/Mieloides

CFU-GM Unidade Formadora De Colônia De Granulócitos e Monócitos

CG Centro Germinativo

CM Memória Central

cMo Monócitos Clássicos

COVID-19 do inglês, *Coronavirus Disease 2019*

DAMPS Padrões Moleculares Associados a Danos

DCs Células Dendríticas

E Envelope

ECA2 Enzima Conversora de Angiotensina 2

EDTA/K3 Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético/Tripotássico

EM Efetora de Memória

EMRA Efetora Terminal CD45RA+

EROs Espécies Reativas de Oxigênio

FITC Isotiocianato de Fluoresceína

FR Frequência Respiratória

GM-CSF Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

HCl Ácido Clorídrico

HE Hemaglutinina Esterase

HIV Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA Antígeno Leucocitário Humano

HRP Peroxidase de Rábano

HS Sulfato de Heparan

IFM Intensidade de Fluorescência Média

IFN Interferon

Ig Imunoglobulina

IL Interleucina

IMC Índice de Massa Corporal

iMo Monócitos Intermediários

iNKT Células NKT Invariantes

LDH Lactato Desidrogenase

LPS Lipopolissacarídeo

M Membrana

MALT Tecidos Linfoides Associados à Mucosa

MDA5 Proteína 5 Associada à Diferenciação De Melanoma

MERS Síndrome Respiratória do Oriente Médio

MHC Complexo Principal de Histocompatibilidade

MO Medula Óssea

MoDCs Células Dendríticas Derivadas De Monócitos

MPO Mieloperoxidase

N Nucleocapsídeo

NaOH Hidróxido De Sódio

ncMo Monócitos Não Clássicos

NETs Armadilhas Extracelulares De Neutrófilos

NK do inglês, *natural killer*

NLRs do inglês, *NOD-like receptors*

NO Óxido Nítrico

NO₂. Nitrito

NO₃. Nitrato

NRP-1 Neuropilina-1

NS-BM do inglês, *non Switched*-BM

OMS Organização Mundial da Saúde

PacB Pacific Blue

PacO Pacific Orange

PAMPs Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBMC Células Mononucleares do Sangue Periférico

PBS Tampão Fosfato-Salino

PCR Proteína C Reativa

pDCs Células Dendríticas Plasmocitoides

PE Ficoeritrina

PECy7 Ficoeritrina Cy7

PerCP Cy5-5 Peridina-Clorofila-Proteína

PRRs Receptores de Reconhecimento de Padrões

RIG-I Gene I Induzível por Ácido Retinóico

RNI Razão Normalizada Internacional

RNL Razão Neutrófilo-Linfócito

RT-PCR Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa em Tempo Real

S do inglês, *spike*

SARS-CoV-2 Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2

SMF Sistema Mononuclear Fagocitário

SNC Sistema Nervoso Central

SP Sangue Periférico

SpO₂ Saturação de Oxigênio

SRAG Síndrome Respiratória Aguda Grave

TAP Tempo de Atividade da Protrombina

Tc Linfócito T Citotóxico

TC Tomografia Computadorizada

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGI Trato Gastrointestinal

Th Linfócito T Auxiliar

TiMas Macrófagos Tissulares

TLR Receptor do Tipo Toll

TMPRSS2 Serino Protease Transmembrana Tipo 2

TNF Fator de Necrose Tumoral

Treg Linfócito T Regulatório

UTI Unidade de Terapia Intensiva

VCl₃ Cloreto de Vanádio

VHS Velocidade de Hemossedimentação

VoC do inglês, *variants of concern*

ZnSO₄ Sulfato de Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1	COVID-19	18
3.2	SARS-COV-2	18
3.2.1	Estrutura viral e patogênese	19
3.3	DIAGNÓSTICO DA COVID-19	23
3.4	SISTEMA IMUNE E CÉLULAS IMUNES CIRCULANTES.....	25
3.4.1	Granulócitos	27
3.4.2	Monócitos e DCs	28
3.4.3	Linfócitos NK e NKT	30
3.4.4	Linfócitos T	32
3.4.5	Linfócitos B	35
3.5	ALTERAÇÕES NO SISTEMA IMUNE NA COVID-19.....	37
4	METODOLOGIA.....	40
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	40
4.2	SELEÇÃO DOS PACIENTES E GRUPO CONTROLE	40
4.3	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO	40
4.3.1	Marcação celular com anticorpos	41
<i>4.3.1.1</i>	<i>Detecção das proteínas de superfície (Tubos 1, 2, 3, 5 e 6).....</i>	<i>42</i>
<i>4.3.1.2</i>	<i>Marcação das células Treg com o fator de transcrição FoxP3 (Tubo 4)</i>	<i>43</i>
4.3.2	Aquisição das amostras no citômetro de fluxo.....	43
4.4	QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE CITOCINAS.....	44

4.5	QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MPO	44
4.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NO)	45
4.7	AVALIAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI-SARS-COV-2	45
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO E EXAMES LABORATORIAIS	47
5.2	AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE NO SP	51
5.2.1	Celularidade total e avaliação dos neutrófilos	51
5.2.2	Monócitos.....	56
5.2.3	DCs	60
5.2.4	Células NK e NKT	62
5.2.5	Linfócitos T	63
5.2.6	Linfócitos B	70
5.2.7	Citocinas, NO e MPO	73
5.3	ASSOCIAÇÃO ENTRE ALTERAÇÕES NO SISTEMA IMUNE E MORTALIDADE.....	77
6	CONCLUSÕES.....	80
7	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	81
8	PERSPECTIVAS.....	81
	REFERÊNCIAS.....	82
	APÊNDICE A – Questionário aplicado para a coleta de dados dos pacientes	100
	APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	102
	APÊNDICE C - Informações técnicas dos reagentes	107
	APÊNDICE D – Avaliação da celularidade total das amostras (Tubo 1)	108
	APÊNDICE E – Avaliação do grau de maturação dos linfócitos t e expressão de CD62L em monócitos e neutrófilos (Tubo 2)	110
	APÊNDICE F – Avaliação do grau de ativação dos linfócitos T (Tubo 3).....	111
	APÊNDICE G – Avaliação dos linfócitos Treg (Tubo 4)	112

APÊNDICE H – Avaliação dos linfócitos B (Tubo 5).....	113
APÊNDICE I – Avaliação dos subtipos de monócitos e DCs e grau de maturação dos neutrófilos (Tubo 6).....	114
APÊNDICE J – Avaliação das citocinas, MPO e NO.....	116
APÊNDICE K – Relação dos parâmetros avaliados com a mortalidade	117
ANEXO A - Aprovação no comitê de ética em pesquisa (CEP).....	121
ANEXO B – Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 1	122
ANEXO C – Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 2	123
ANEXO D – Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 3	125
ANEXO E – Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 4	126
ANEXO F – Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 5	127
ANEXO G – Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 6.....	128

1 INTRODUÇÃO

A COVID-19 (do inglês, *coronavirus disease 2019*) é uma infecção do trato respiratório causada pelo novo coronavírus, denominado coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2, do inglês *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) (GABUTTI et al., 2020). No início de 2020, a COVID-19 foi considerada uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que já perdura por mais de dois anos (WHO, 2020). Até setembro de 2022, no Brasil, foram registrados cerca de 34,7 milhões de casos e mais de 687 mil óbitos pela doença. Nesse mesmo período, no estado de Santa Catarina, foram contabilizados 1,82 milhões de casos e mais de 22 mil óbitos (BRASIL, 2022).

As manifestações clínicas mais comuns da COVID-19 são febre, mialgia, tosse e falta de ar, além de outros sintomas, como náuseas, vômitos, diarreia, anosmia e ageusia. No entanto, o quadro clínico dos pacientes varia desde assintomático até quadros graves, no qual desenvolvem a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG). Nesse contexto, o sistema imune do hospedeiro possui um papel não só na defesa contra o vírus, mas também para o agravamento da doença, pois os pacientes graves apresentam um quadro de inflamação exacerbada o que pode levar a graves danos teciduais locais (principalmente nos pulmões) e sistêmicos, e ao desencadeamento de eventos tromboembólicos e falência múltipla de órgãos (CAO et al., 2020; DORWARD et al., 2020; MERAD et al., 2022; WU, Z. et al., 2020).

Uma resposta imune eficaz contra o SARS-CoV-2 requer o envolvimento de células do sistema imune inato e adaptativo. Porém, ao contrário do que se observa na maioria das respostas antivirais, os pacientes com COVID-19, principalmente os casos graves, apresentam algumas variações na sua resposta imune, como redução na contagem de linfócitos e aumento da contagem de neutrófilos, o que leva a uma alta relação neutrófilo/linfócito (RNL), a qual já é considerada um marcador de prognóstico da doença (LIU et al., 2020; SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020). Além disso, os pacientes com quadros mais graves apresentam altas concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL)-6, IL-1 β , IL-2, IL-8 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e desenvolvem um quadro de hipercitocinemia (DEL VALLE et al., 2020; DIAO et al., 2020; LEISMAN et al., 2020). Apesar da resposta inflamatória acentuada nos casos mais graves da doença, a resposta imune desses pacientes não é efetiva, pois o vírus possui diversos mecanismos de evasão imune. Além disso, os pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 apresentam uma resposta anti-inflamatória desregulada, o que gera dificuldade na resolução do processo inflamatório, que muitas vezes perdura em pacientes

graves mesmo após a redução da carga viral (CHRISTIE et al., 2021; KOUWAKI et al., 2021; OH; SHIN, 2021; TAEFEHSHOKR et al., 2020; XIA et al., 2020).

O desenvolvimento de quadros graves é mais comum em pacientes com idade elevada e/ou que apresentam comorbidades como obesidade, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e doenças pulmonares crônicas. Porém, diversos indivíduos podem ter agravamento da doença, assim como ocorrem casos de pessoas com comorbidades que apresentam apenas sintomas leves da doença (MERAD et al., 2022; WU, C. et al., 2020). Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de pesquisas que avaliem a resposta imune dos pacientes com COVID-19, desde os casos leves até as manifestações mais graves da doença. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil imune de pacientes com COVID-19.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o comportamento das células circulantes do sistema imune, dos anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2, das citocinas plasmáticas e dos mediadores inflamatórios como biomarcadores de prognóstico em indivíduos infectados por SARS-CoV-2.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar, em indivíduos infectados por SARS-CoV-2, os seguintes parâmetros:

- Frequências absolutas e relativas de populações celulares circulantes em sangue periférico, tais como subtipos de linfócitos T, B e NK, células dendríticas (DCs), monócitos e neutrófilos;
- Concentrações plasmáticas das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IL-17A, IFN- γ e TNF- α ;
- Concentrações dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgM e IgG no plasma;
- Concentrações de óxido nítrico (NO) e atividade da mieloperoxidase (MPO) plasmáticos;
- Verificar a associação entre os parâmetros laboratoriais e o desfecho clínico dos pacientes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 COVID-19

A COVID-19 é uma doença respiratória de etiologia viral, causada pelo β -coronavírus SARS-CoV-2. Trata-se de um vírus altamente transmissível, motivo pelo qual rapidamente se espalhou pelo mundo e deu origem à uma pandemia no início de março de 2020, apenas três meses após o primeiro caso da doença, relatado em Wuhan, na China (VELAVAN & MEYER, 2020; ZHOU et al., 2020). O primeiro caso de COVID-19 no Brasil foi confirmado em fevereiro de 2020, no entanto, amostras de novembro de 2019 do esgoto de Florianópolis já apresentavam a presença de RNA viral, o que sugere que o vírus já estava em circulação no país (BRASIL, 2020a; FONGARO et al., 2021).

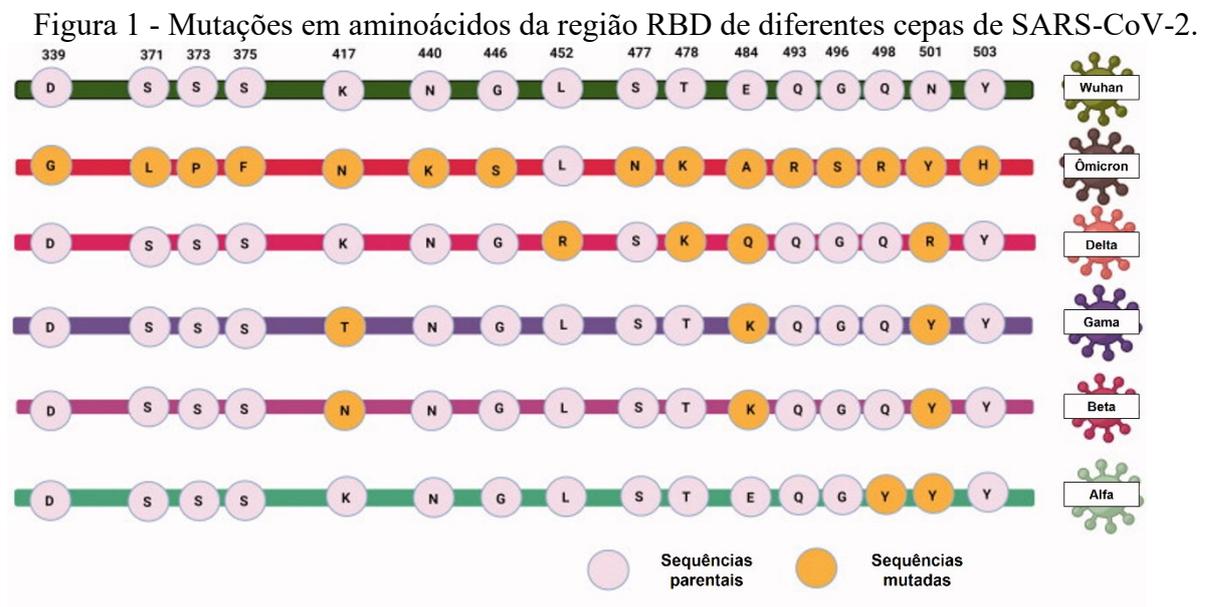
3.2 SARS-COV-2

Os coronavírus pertencem à família *Coronaviridae* e são divididos em quatro subfamílias: alfa, beta, gama e delta. Os alfa e beta coronavírus são originários de mamíferos, enquanto as subfamílias gama e delta foram identificadas em porcos e aves (VELAVAN & MEYER, 2020; WALKER et al., 2019; SCHOEMAN & FIELDING, 2019). O SARS-CoV-2 é o sétimo coronavírus responsável por causar infecção em humanos, e o surto de COVID-19 pode ser comparado a outros surtos de coronaviruses, como o de SARS (2003-2004), que também ocorreu na China e da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS) em 2012, na Arábia Saudita. As três doenças possuem semelhanças quanto às suas características clínicas e acredita-se que tenham acometido humanos via transmissão zoonótica (ZHOU et al., 2020; HU et al., 2021).

Os morcegos são importantes hospedeiros naturais de alfacoronavírus e betacoronavírus. Nesse contexto, a sequência genômica do SARS-CoV-2 possui 96,2% de similaridade com o coronavírus RaTG13, detectado em morcegos *Rhinolophus affinis*, na China (ZHOU et al., 2020; HU et al., 2021). No entanto, acredita-se que o vírus, antes de ser transmitido aos humanos, tenha passado por um hospedeiro intermediário, como no caso das civetas de palma, para SARS, e dos camelos, para MERS, pois todos os primeiros casos relatados de COVID-19 possuíram relação direta com o mercado Huanan Seafood Wholesale Market, situado em Wuhan (ESAKANDARI et al., 2020; ZHANG & HOLMES, 2020).

Devido à alta capacidade de mutação do SARS-CoV-2, até o momento, diversas variantes foram relatadas. As variantes que causam alterações na transmissão, infectividade e

gravidade da doença são consideradas variantes de preocupação (VoC, do inglês *variants of concern*) (WHO, 2022). Dentro de todas as variantes encontradas até o momento, cinco possuem destaque por se enquadrarem como VoCs e foram denominadas: alfa (B.1.1.7), beta (B.1.351), gama (P.1), delta (B.1.617.2) e ômicron (B.1.1.529). Essas variantes possuem diferenças quanto à taxa de transmissão e agravo da doença, o que torna o tratamento e a busca por vacinas efetivas um desafio, pois todas apresentam mutações na proteína Spike (proteína S), que é alvo de grande parte das vacinas oferecidas até o momento (RAMBAUT et al., 2020; O'TOOLE et al., 2021). A primeira VoC relatada foi a variante alfa, com o primeiro caso detectado no Reino Unido em 2020, e aumento de cerca de 50% na transmissibilidade do vírus, enquanto as variantes gama e delta, anunciadas em janeiro e maio de 2021, se demonstraram ainda mais transmissíveis e letais, principalmente no Brasil. Atualmente, o mundo vivencia um surto da variante ômicron, a VoC mais transmissível até o momento, porém com sintomas mais brandos e menor letalidade. Além disso, a VoC ômicron é a que possui mais mutações no domínio RBD da proteína S, quando comparada à cepa de Wuhan (Figura 1) (BRIZZI et al., 2022; FERNANDES et al., 2022).



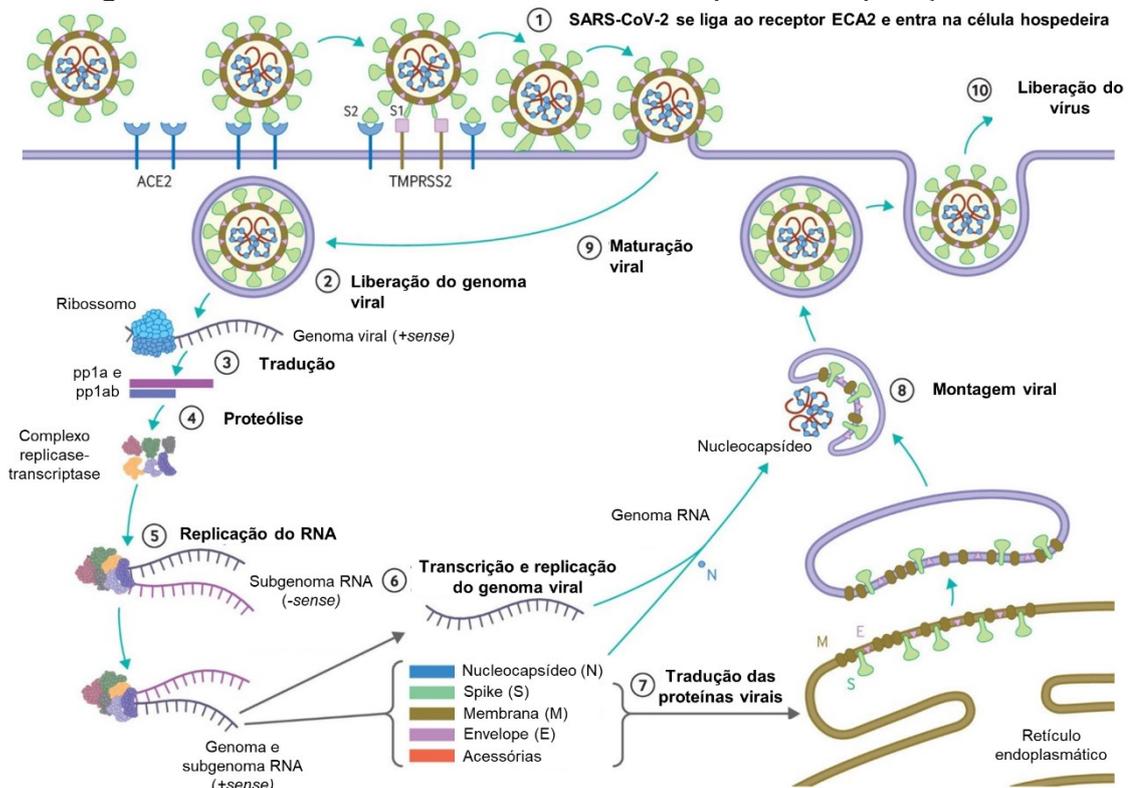
Fonte: Adaptado de FERNANDES et al., 2022.

3.2.1 Estrutura viral e patogênese

A proteína S é uma glicoproteína presente na superfície dos coronavírus, responsável pela estrutura morfológica desses vírus se assemelhar à uma coroa. A estrutura viral do SARS-

CoV-2 também é formada por diversas outras proteínas, com destaque para a proteína de membrana (M), envelope (E), hemaglutinina esterase (HE) e nucleocapsídeo (N) (JACOFISKY et al., 2020; UJIKE & TAGUCHI, 2015). A proteína S não só confere a estrutura que dá nome ao vírus, mas também é um fator importante para a sua infectividade, pois é uma peça essencial para a interação do vírus com os receptores do hospedeiro, principalmente a proteína ECA2 (enzima conversora de angiotensina 2), relatada como principal porta de entrada do vírus nas células hospedeiras (HOFFMANN et al., 2020) (Figura 2). Outras proteínas presentes na célula hospedeira relacionadas com a entrada viral são o CD26 (dipeptidase), as ciclofilinas, ezrina, entre outros fatores de adesão (ESAKANDARI et al., 2020; SINGHAL, 2020).

Figura 2 - Entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira e replicação viral.



(1) O vírus adentra a célula hospedeira ao se ligar no receptor ECA2, com o auxílio da proteína TMPRSS2. Isso leva à fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira e à liberação do genoma viral (2). Os estágios (3-7) mostram as etapas restantes da replicação viral, que levam à montagem viral, maturação e liberação do vírus. Fonte: Adaptado de CEVIK et al., 2020.

A proteína S possui duas subunidades funcionais principais, S1 e S2. Para conseguir adentrar as células do hospedeiro, a subunidade S1 do domínio de ligação ao receptor (RBD) se liga ao receptor ECA2. O complexo formado pela ligação da subunidade S1 ao receptor

ECA2 é clivado pela protease TMPRSS2 (serino protease transmembrana tipo 2), cathepsina-L e furina, o que permite a fusão da membrana viral com a membrana celular hospedeira, processo conduzido pela subunidade S2. Assim, o vírus adentra a célula, e o RNA viral é liberado para replicação e tradução em um processo conduzido pela própria célula hospedeira, o que permite a exocitose de novas partículas virais (BEYERSTEDT et al., 2021; JACKSON et al., 2022). Acredita-se que outros receptores possam atuar como cofatores desse processo, como por exemplo o sulfato de heparan (HS) e a neuropilina-1 (NRP-1), o que potencializa a infectividade do SARS-CoV-2 (BAGGEN et al., 2021; MAYI et al., 2021).

O receptor ECA2 é expresso em diversos tecidos do corpo humano, principalmente no trato gastrointestinal (TGI), tecido pulmonar e na mucosa do trato respiratório. O trato respiratório está altamente ligado com a fisiopatologia da doença e com a forma de transmissão do SARS-CoV-2 (LAKE, 2020; SUNGNAK et al., 2020). A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre pela fala, espirros, tosse, situações que espalhem as gotículas contendo o vírus ou que gerem a formação de aerossóis e permitam que o vírus seja liberado de um hospedeiro contaminado e cheguem até um novo alvo, seja por inalação das gotículas que contém as cepas virais ou por contato com superfícies contaminadas, e extensão desse contato até a mucosa nasal, oral ou ocular (RIOU & ALTHAUS, 2020).

Em cerca de 80% dos pacientes, o processo inflamatório é controlado e o vírus é eliminado antes de causar maiores complicações ao hospedeiro, o que ocasiona apenas quadros leves. Entretanto, em alguns pacientes a resposta inflamatória persiste e a manutenção do microambiente pró-inflamatório gera lesão não apenas nas células infectadas, mas também em outras células do epitélio pulmonar, o que faz com que aproximadamente 15% dos pacientes evoluam para casos de pneumonia grave, e, com que os demais 5% evoluam para quadros clínicos críticos, associados à hiperinflamação pulmonar e insuficiência respiratória (CAO et al., 2020; DORWARD et al., 2020; WU et al., 2020a). Até o momento, ainda não se sabe ao certo todos os motivos que levam os pacientes ao agravo da doença, mas esses eventos são principalmente associados à algumas comorbidades, entre elas a senescência, obesidade, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e doenças pulmonares crônicas (WU, C. et al., 2020).

Ao entrar em contato com as células epiteliais do trato respiratório superior via receptor ECA2, o SARS-CoV-2 começa a sua replicação e subsequente migração para o trato respiratório inferior, até as células do epitélio alveolar. Nos alvéolos pulmonares, as principais

células alvo para o vírus, devido à alta expressão de ECA2 em sua superfície, são os pneumócitos tipo II (ZHANG et al., 2020; VERDECCHIA et al., 2020). No tecido pulmonar, a infecção viral gera o influxo de leucócitos, principalmente monócitos e neutrófilos, e aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-10, IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Esses eventos visam eliminar o patógeno, bem como recrutar células do sistema imune adaptativo (BÉRANGÈRE et al., 2020; WIERSINGA et al., 2020; XU et al., 2020).

A enzima ECA2 faz parte do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), responsável pela regulação da pressão arterial e homeostase eletrolítica. No SRAA, a ECA2 possui a função de catalisar a conversão de angiotensina II em angiotensina (1-7), que exerce efeitos vasodilatadores, anti-inflamatórios e antifibróticos pela da ligação ao seu receptor. Com a utilização da ECA2 pelo SARS-CoV-2, ocorre a redução da disponibilidade dessa enzima e consequentemente o excesso de angiotensina II, que, por sua vez, possui atividade pró-inflamatória, pró-fibrótica e estimula a vasoconstrição (FERRARIO; TRASK; JESSUP, 2005; SANCHIS-GOMAR et al., 2019; VOORS et al., 1998). No tecido pulmonar, o processo inflamatório causado pela COVID-19 gera extravasamento de líquido para o espaço intersticial e alvéolos pulmonares, o que pode culminar em uma lesão severa no tecido pulmonar e pneumonia, além de edema intersticial, hipoxemia e formação de microtrombos devido a lesão endotelial (ACKERMANN et al., 2020; CICERI et al., 2020; MOSLEH et al., 2020). Esses eventos podem ser intensificados pela concentração elevada de angiotensina II que causa o aumento da permeabilidade vascular e do sinal pró-inflamatório (BOURGONJE et al., 2020; HAMMING et al., 2004; IMAI et al., 2005; ZHANG et al., 2020).

Todos esses fatores contribuem para um ambiente hiperinflamatório, que lesa não apenas as células infectadas pelo vírus, mas também outras células do epitélio pulmonar. Os achados histopatológicos do tecido pulmonar de pacientes com COVID-19 grave revelam dano alveolar bilateral difuso, formação de membrana hialina, descamação de pneumócitos e deposição de fibrina (BÖSMÜLLER, et al., 2021; CHEN N. et al., 2020; PANNONE et al., 2021). Esses eventos prejudicam a capacidade de difusão de oxigênio e levam à SRAG, marcada pela hipercitocinemia e uma intensa resposta inflamatória não só no tecido pulmonar, mas também sistêmica (CHEN N. et al., 2020; HU et al., 2020; MEHTA et al., 2020; WU, Z. et al., 2020; YAO et al., 2020).

Um dos fatores que contribui com a lesão a múltiplos órgãos causada pelo SARS-CoV-2 é a ampla expressão da ECA2 em diversos outros tecidos, como sistema nervoso central

(SNC) e rins, o que causa dano direto aos tecidos pela infecção viral (LAKE, 2020; SUNGNAK et al., 2020). Além disso, a intensa resposta imune a nível sistêmico leva ao dano endotelial, formação de microtrombos, hipercoagulabilidade e diversas complicações como embolia pulmonar e infarto do miocárdio, além do desenvolvimento da sepse viral, que contribui para a falência de múltiplos órgãos, e, em alguns casos, ocasiona óbito do paciente (GUPTA et al., 2020; KLOK et al., 2020; TACHIL et al., 2020; TANG et al., 2020; WIERSINGA et al., 2020).

3.3 DIAGNÓSTICO DA COVID-19

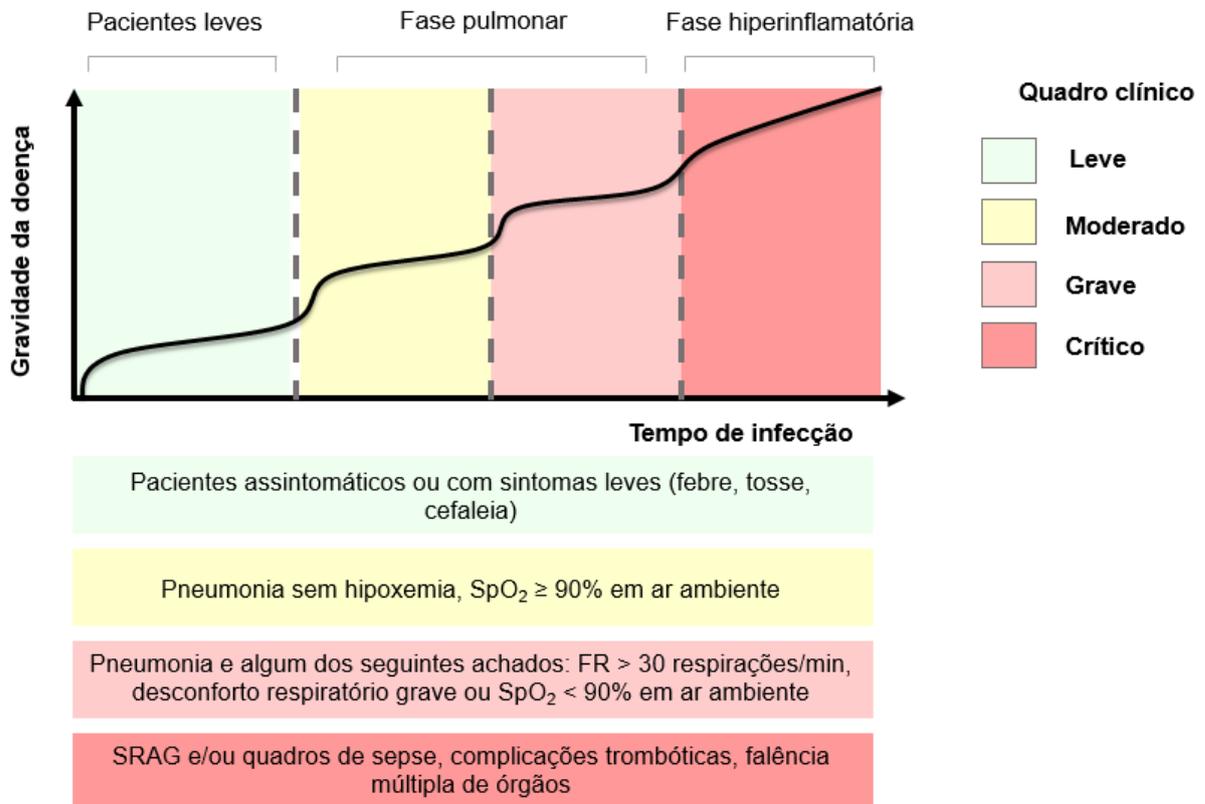
A detecção precoce da infecção por SARS-CoV-2 é essencial para interromper a cadeia de transmissão da doença e para fornecer em tempo hábil os cuidados e suporte aos pacientes infectados. De forma geral, o período de incubação da COVID-19 leva em média de cinco a seis dias e pode chegar até 14 dias. Os testes diagnósticos são recomendados em cerca de três dias após o início dos sintomas e são realizados pela detecção do RNA viral pela reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-PCR, do inglês *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) ou pela detecção do antígeno viral, ambos coletados por swab de nasofaringe. Os testes imunológicos para identificação de anticorpos imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG) contra o SARS-CoV-2 são recomendados apenas após o sétimo dia de sintomas (BRASIL, 2020; WIERSINGA et al., 2020).

Os sintomas mais comuns da COVID-19 são febre, tosse, dispneia, mialgia e fadiga, mas diversos outros sintomas são relatados, como dor de cabeça, diarreia, náuseas, vômito, anosmia, hipogeusia, entre outros (CEVIK et al., 2020; BRASIL, 2020b). Em situações de diagnóstico molecular inconclusivo ou para classificação prognóstica, outros testes podem ser realizados, como exames bioquímicos e de imagem. As alterações laboratoriais mais comuns em pacientes com COVID-19 são concentrações elevadas de proteína C reativa (PCR), aumento da velocidade de hemossedimentação (VHS) e marcadores inflamatórios elevados. O hemograma varia de acordo com o quadro clínico do paciente, mas pode apresentar contagem normal ou aumentada de leucócitos, linfopenia, neutrofilia, entre outras alterações. Outros exames laboratoriais podem estar alterados em casos mais graves, como o aumento plasmático de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH), creatinina, aumento do tempo de protrombina e de dímero-D, mas essas alterações não são observadas em todos os pacientes. Em casos com evolução clínica desfavorável, é possível identificar opacidade, lesões pulmonares e fibrose por tomografia computadorizada (TC) do

tórax. O raio X do tórax é útil nos casos de suspeita de pneumonia (PARANJPE et al., 2020; ZHU et al., 2020; SINGHAL, 2020).

A COVID-19 possui um amplo espectro clínico e suas apresentações clínicas variam de acordo com a gravidade da doença. De acordo com a OMS, a COVID-19 pode ser estratificada em doença leve, moderada, grave e crítica (Figura 3). No estágio inicial da doença, os pacientes sintomáticos normalmente apresentam quadros leves, com sintomas semelhantes a quadros gripais, sem presença de pneumonia. Os pacientes com quadro clínico moderado, já entram na fase pulmonar da doença e apresentam pneumonia (febre, tosse, dispneia, taquipneia), porém sem hipóxia, com saturação de oxigênio ($SpO_2 \geq 90\%$ em ar ambiente). Já os pacientes com COVID-19 grave, apresentam uma resposta inflamatória mais intensa, com sinais de pneumonia e ao menos um dos seguintes achados: frequência respiratória (FR) > 30 respirações/min, desconforto respiratório grave ou $SpO_2 < 90\%$ em ar ambiente. O quadro clínico dos pacientes críticos é marcado pela fase hiperinflamatória, SRAG e/ou quadros de sepse e complicações trombóticas agudas, que podem levar à falência de múltiplos órgãos (SIDDIQI; MEHRA, 2020; WHO, 2021). Assim, uma resposta imune adequada é essencial para o controle efetivo da doença, e pesquisas que compreendam melhor o papel da imunidade inata e adaptativa em cada fase da COVID-19 são necessárias.

Figura 3 - Espectro clínico da COVID-19.



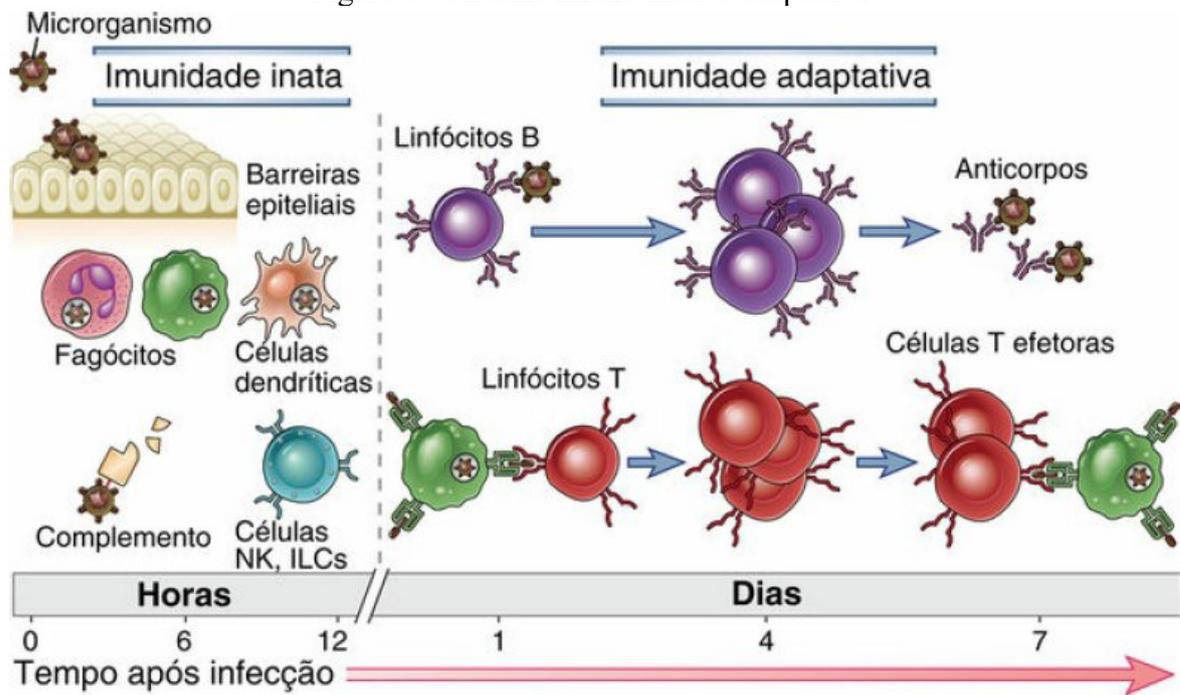
A COVID-19 pode ser dividida em doença leve, moderada, grave e crítica, de acordo com a sua apresentação clínica. O quadro leve compreende os pacientes com sintomas brandos ou assintomáticos. Os quadros moderado e grave apresentam complicações pulmonares como pneumonia e presença de hipoxemia. Já o quadro crítico é a fase em que o paciente apresenta SRAG e inflamação exacerbada, com complicações extra-pulmonares. SpO_2 : Saturação de oxigênio; FR: frequência respiratória. Fonte: A autora.

3.4 SISTEMA IMUNE E CÉLULAS IMUNES CIRCULANTES

As células do sistema imune fazem parte do arsenal de defesa do organismo humano contra microrganismos, que é dividido em sistema imune inato e adaptativo (Figura 4). O sistema imune inato é considerado a linha de frente da defesa do hospedeiro, na qual os seus componentes funcionam como sentinelas e são ativados diante de sinais de perigo, como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular pattern*) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*), os quais são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*), e se comunicam por meio de citocinas e contato direto com outras células (ABBAS et al., 2017; IWASAKI; MEDZHITOV, 2015;

ZINDEL et al., 2020). Trata-se de uma resposta rápida, que pode contribuir diretamente na resposta inflamatória, via fagocitose e secreção de moléculas biologicamente ativas, ou de forma indireta, ao ativar as células da imunidade adaptativa via apresentação de antígeno. Os principais componentes celulares da imunidade inata periférica são as células fagocitárias (monócitos/macrófagos e neutrófilos), as células dendríticas (DCs), as células natural killer (NK) e os mastócitos. Além disso, o sistema imune inato também possui como componentes importantes as barreiras físicas e químicas, como as superfícies epiteliais, e proteínas sanguíneas, como as proteínas do sistema complemento e outros mediadores da inflamação (ABBAS et al., 2017; SUN et al., 2020).

Figura 4 - Sistema imune inato e adaptativo.



Os mecanismos da imunidade inata fornecem a defesa inicial contra infecções. As respostas imunes adaptativas se desenvolvem mais tarde e requerem a ativação de linfócitos. Fonte: ABBAS et al., 2017.

O sistema imune adaptativo, por sua vez, é composto principalmente por linfócitos T e B e seus mediadores humorais, como citocinas e anticorpos, e é conhecido por sua especificidade a antígenos, resposta lenta, maior memória imunológica e baixa proporção de células circulantes responsivas. A resposta imune adaptativa aumenta em magnitude e capacidade defensiva a cada exposição sucessiva a um Ag específico (NETEA et al., 2020; ABBAS et al., 2017). Assim, embora alguns patógenos sejam capazes de resistir à resposta

imune inata, essa situação geralmente é revertida pela ação do sistema imune adaptativo, que possui maior especificidade. Além disso, o sistema imune inato e adaptativo são amplamente interligados. Ao mesmo tempo em que a resposta imune inata fornece sinais de ativação e apresentação de antígeno às células do sistema imune adaptativo, as respostas adaptativas também são capazes de intensificar a resposta imune inata, o que torna o combate aos patógenos muito mais efetivo (ABBAS et al., 2017; IWASAKI; MEDZHITOV, 2015; SUN et al., 2020). As células do sistema imune são amplamente distribuídas pelo sangue periférico (SP) e tecidos, e essas quantidades podem variar de acordo com características individuais, como idade, hábitos de vida, exposições à antígenos e características genéticas (BLANCO et al., 2018; BRODIN; DAVIS, 2017).

3.4.1 Granulócitos

Os granulócitos, produzidos na medula óssea (MO) por células-tronco mieloides pluripotentes, são componentes importantes da imunidade inata. Fazem parte desse grupo os neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Os neutrófilos compreendem de 50 a 70% do total de leucócitos circulantes em humanos. Essas células atuam como sentinelas do sistema imune inato e podem ser rapidamente mobilizados para locais de inflamação e/ou infecção e assim exercer uma grande variedade de funções antimicrobianas e pró-inflamatórias, como degranulação, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), fagocitose e formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *neutrophil extracellular traps*) (BRINKMANN, 2018; GAZENDAM; ROOS; KUIJPERS, 2016; LIEW; KUBES, 2019; ROSALES; URIBE-QUEROL, 2017).

Os neutrófilos são conhecidos como a primeira linha de defesa, por serem os primeiros leucócitos a migrarem para os tecidos afetados e devido à sua atividade microbicida potente. No entanto, pesquisas realizadas na última década relatam uma ampla heterogeneidade fenotípica e funcional de neutrófilos, que além das atividades antimicrobianas, possui a capacidade de modular a resposta imune adaptativa, por meio da interação direta ou pela produção de citocinas que afetam células dendríticas e linfócitos, com a possibilidade não só de estímulos pró-inflamatórios, mas também supressores (AARTS et al., 2019; AARTS; KUIJPERS, 2018; ROSALES, 2020; VEGLIA; SANSEVIERO; GABRILOVICH, 2021). De forma geral, os neutrófilos circulantes são células em estágio final de maturação. No entanto, diante de estímulos inflamatórios e aumento do recrutamento dessas células, pode ser identificada a presença de neutrófilos imaturos no SP. Em relação aos marcadores de superfície,

essa diferenciação pode ser realizada pela expressão do CD16 (FcγRIII), expresso em maior intensidade nos neutrófilos maduros (CHERIAN et al., 2010).

Os basófilos também fazem parte dos granulócitos e possuem semelhança fenotípica com os mastócitos teciduais. São células que se encontram em pequena quantidade no SP (<1%) e possuem como função primária a sua atividade em respostas a alérgenos, compreendendo a maior fonte de histamina no SP, e proteção contra infecções parasitárias. Além disso, os basófilos possuem um papel importante na ponte entre a imunidade inata e adaptativa pela secreção de IL-4, que estimula a migração de eosinófilos, diferenciação de monócitos em macrófagos, ativação de células B e diferenciação de células T CD4⁺ em células T *helper 2* (Th2). Assim, essas células podem contribuir para a exacerbação e modulação da resposta inflamatória (CHIRUMBOLO, 2012; MARONE et al., 2020; SHAH et al., 2021).

Assim como os basófilos, os eosinófilos auxiliam na resposta contra infecções parasitárias, especialmente contra helmintos. Essas células constituem aproximadamente 0,5 a 1% dos leucócitos no SP, mas essas proporções aumentam para 3-5% em pessoas com sintomas alérgicos e podem apresentar valores ainda maiores em parasitoses. Os eosinófilos expressam receptores do sistema complemento (CD11b), receptores Fc (FcαR, FcγRII, FcεRI e FcεRII) e receptores de reconhecimento de PAMPs, incluindo vários receptores do tipo Toll (TLR). Assim, uma vez ativados, liberam uma variedade de mediadores solúveis, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, e contribuem para iniciação, propagação e resolução da resposta inflamatória, além de possuírem um importante papel no reparo tecidual. Dessa forma, essas células contribuem para diversos processos fisiológicos e patológicos dependendo de sua localização e estado de ativação (CHUSID, 2018; HIRORITO, 2011; RIGONI; COLOMBO; PUCILLO, 2018; ROSENBERG et al., 2013).

3.4.2 Monócitos e DCs

O sistema mononuclear fagocitário (SMF) é composto por três grupos celulares: monócitos, macrófagos e DCs, bem como seus progenitores presentes na MO. Essas células desempenham funções essenciais na homeostase tecidual além da regulação e resolução da resposta imune. No SP, as células do SMF são representadas em maioria pelos monócitos. Inicialmente, os progenitores de monócitos são formados na MO a partir de uma célula progenitora comum, a unidade formadora de colônia de granulócitos e monócitos (CFU-GM), que também é responsável pela produção de neutrófilos, DCs, eritrócitos e megacariócitos (AKASHI et al., 2000; MANZ et al., 2022; WOLF et al., 2019). A maior parte das populações

de macrófagos teciduais são produzidas no saco vitelino, durante o desenvolvimento embrionário, e mantidas por autoproliferação ao longo da vida adulta, com função importante no reparo tecidual (GINHOUX et al., 2014; GUILLIAMS et al., 2013; HASHIMOTO et al., 2013; PATEL et al., 2017; SOUCIE et al., 2016). Já uma menor proporção dessas células derivam de monócitos circulantes, que migram para os tecidos, onde realizam sua diferenciação terminal em macrófagos e atuam em mecanismos de defesa do hospedeiro (LAMBERT, 2017).

Os monócitos compreendem cerca de 10% dos leucócitos no SP e atuam como biossensores para diferentes PAMPs e DAMPs por meio de TLRs e moléculas relacionadas. Dessa forma, quando ativados, os monócitos induzem uma rápida produção de citocinas, que regulam a inflamação local, e quimiocinas, que atraem e ativam células efetoras, além do papel dessas células na fagocitose de patógenos e apresentação de antígenos (LAMBERT; SACK, 2017; LEE et al., 2017). Os monócitos circulantes representam uma população heterogênea, que pode ser subdividida em três classificações, de acordo com a sua função e expressão fenotípica em: monócitos clássicos (cMo; CD14⁺⁺ CD16⁻), intermediários (iMo; CD14⁺ CD16⁺) e não clássicos (ncMo; CD14^{neg/+fraco} CD16⁺) (LAMBERT, 2017; ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010).

Os cMo compõem cerca de 85% do total de monócitos circulantes e são rapidamente recrutados para locais de inflamação. São células importantes na resposta contra patógenos, detecção inata e de respostas imunes e alta capacidade de adesão e migração. Os 15% dos monócitos restantes, são compostos pelos iMo e ncMo, também conhecidos como macrófagos tissulares (TiMas). Os iMo são células especializadas na apresentação de antígenos, por apresentarem maior expressão de moléculas MHC-II. Além disso, são células que realizam secreção de diversas citocinas, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-10, e estão envolvidas na regulação da apoptose (BELGE et al., 2002; CROS et al., 2010; KAPELLOS et al., 2019; LEE et al., 2017; WONG et al., 2011). Os ncMo também possuem alta capacidade de apresentação de antígenos e são considerados “guardiões da vasculatura”, pois atuam na remoção de restos celulares e no reparo do endotélio durante a homeostase. Essas células também são especializadas em fagocitose mediada por fatores do sistema complemento e por receptores de Ig (FcR), além da participação em respostas antivirais (KAPELLOS et al., 2019; SCHMIDL et al., 2014; WOLF et al., 2019). Os iMo e ncMo têm origem a partir dos cMo de forma linear, que ocorre inicialmente de cMo para iMo, que posteriormente se diferenciam em ncMo. Alguns estudos acreditam que esse processo aconteça inteiramente na circulação (teoria da

diferenciação), enquanto outros acreditam que aconteça nos tecidos (teoria da migração). Além disso, uma terceira teoria defende que essa diferenciação aconteça de forma mista, inicialmente na circulação (cMo a iMo), e posteriormente nos tecidos (iMo a ncMo) (DAMASCENO et al., 2019; PATEL et al., 2017; TAK et al., 2017).

As DCs, outro componente do SMF, estão presentes em pequenas quantidades no SP. Embora os monócitos possam se diferenciar em DCs (moDCs), especialmente durante a inflamação, a maioria dos tecidos quiescentes contém populações residentes significativas de DCs, que podem ser encontradas também em órgãos linfoides. Essas células são consideradas APCs profissionais e são responsáveis pela apresentação de antígenos às células T, o que leva à diferenciação e ativação de linfócitos T *náive* (COLLIN; BIGLEY, 2018; PATENTE et al., 2019). No SP, as DCs podem ser divididas em dois principais subtipos: clássicas ou mieloides (cDCs; CD11c⁺⁺ CD123^{neg}) e plasmocitoides (pDCs; CD11c^{neg} CD123⁺). De acordo com a expressão de CD141 e CD1c as cDCs ainda podem ser subdivididas em cDC1 (CD141⁺) e cDC2 (CD1c⁺). As células cDC1 possuem um papel antiviral e antitumoral e são responsáveis pela apresentação de antígenos às células T CD8⁺ via MHC-I, além de promover respostas Th1 e NK pela secreção de IL-12 (COLLIN; BIGLEY, 2018). As cDC2 também participam da apresentação de antígenos para linfócitos T, especialmente às células T CD4⁺, que subsequentemente podem se diferenciar em Th1, Th2, Th17 e T reg (COLLIN; BIGLEY, 2018; PATENTE et al., 2018; ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010). Já as pDCs, possuem como principal função a produção de interferon tipo I (principalmente IFN- α e IFN- β), além de interferon tipo III (IFN- γ) e citocinas, e assim, são especializadas em detectar e responder à processos infecciosos, principalmente virais (BAO; LIU, 2013; SWIECKI; COLONNA, 2015; O'KEEFFE et al., 2019).

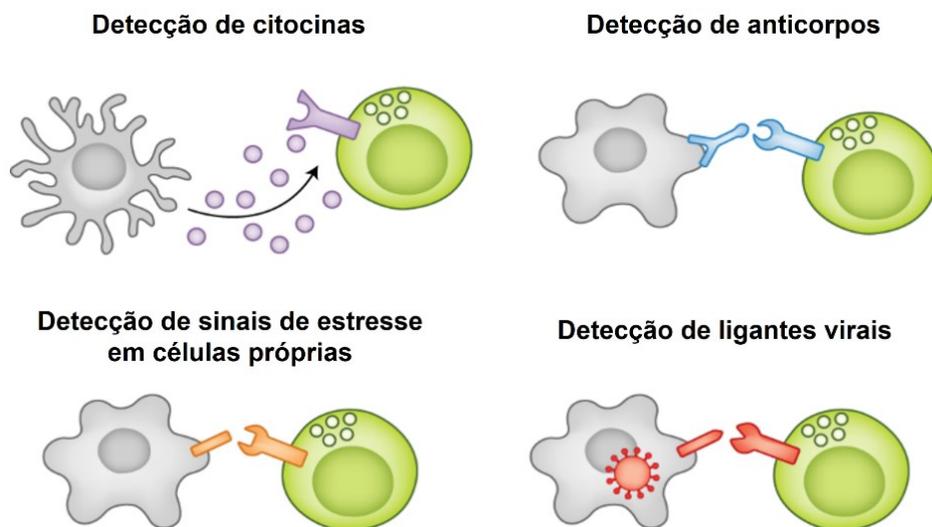
3.4.3 Linfócitos NK e NKT

As células NK fazem parte do grupo dos linfócitos, mas são consideradas componentes da resposta imune inata, por não apresentarem receptores de antígenos rearranjados em sua superfície celular. Essas células constituem cerca de 5 a 15% de todas as células mononucleares do SP, e estão presentes em tecidos como fígado, pulmão, baço e MO. Além do seu reconhecido efeito citotóxico, que reconhece e elimina células infectadas, as células NK também participam da homeostase imunológica. Isso ocorre devido ao fato das células NK possuírem em sua superfície receptores de ativação e inibição, que atuam como sensores do microambiente em

que estão inseridas e permitem identificar sinais de perigo ou patógenos (GUO et al., 2018; HAMMER; RÜCKERT; ROMAGNANI, 2018).

Os receptores inibitórios presentes na superfície das células NK ligam-se ao MHC-I e, assim, mantêm o mecanismo de tolerância para células hospedeiras saudáveis. Para detectar sinais inflamatórios durante a infecção viral, as células NK usam diversas estratégias (Figura 5). Uma delas se deve ao fato dessas células expressarem diversos receptores para citocinas, como IFN- α , IL-12, IL-15 e IL-18, que aumentam após serem secretadas por células acessórias durante a infecção e desempenham um papel crucial na ativação das células NK, bem como na mediação da proteção contra o vírus. Além disso, as células NK podem ser ativadas por células revestidas por anticorpos, detectadas pelo CD16 (Fc γ RIII). As células NK também podem detectar células próprias em condições de estresse, em um processo que envolve receptores de ativação e detecção de perigo, como NKG2D, bem como reconhecer células infectadas ao se ligar diretamente à proteínas codificados por vírus via receptores específicos, em um processo de reconhecimento denominado “*missing self*”, devido à regulação negativa de MHC-I, que ocorre frequentemente em infecções virais e no desenvolvimento de tumores (COSTA-GARCIA et al., 2015; HAMMER; RÜCKERT; ROMAGNANI, 2018; KÄRRE, 2008).

Figura 5 - Formas de reconhecimento de processos inflamatórios e/ou infecciosos por linfócitos NK.



As células NK podem detectar processos inflamatórios e/ou infecciosos devido aos diversos receptores que expressam em sua superfície, o que permite que identifiquem citocinas secretadas por células acessórias, células revestidas por anticorpos por meio da ligação cruzada com o CD16, além de receptores de estresse em células próprias e ligantes virais externalizados em células infectadas. Fonte: Adaptado de HAMMER; RÜCKERT; ROMAGNANI, 2018

Fenotipicamente, os linfócitos NK são identificadas pela expressão do marcador CD56, uma glicoproteína de adesão célula-célula, envolvida na interação das células NK com as células-alvo (OBOSHI et al., 2016). Além disso, não expressam marcadores de outras linhagens linfocitárias, como CD19 (linfócitos B) e CD3 (linfócitos T). Cerca de 90% das células NK no SP expressam também CD16 (CD56⁺ CD16⁺) e compreendem as células mais maduras e com maior capacidade citotóxica, já os 10% de células NK restantes, apresentam superexpressão de CD56 (CD56⁺⁺), ausência da expressão de CD16 e possuem uma menor atividade citotóxica, mas grande capacidade de produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-10 (CALIGIURI, 2008; POLI et al., 2009).

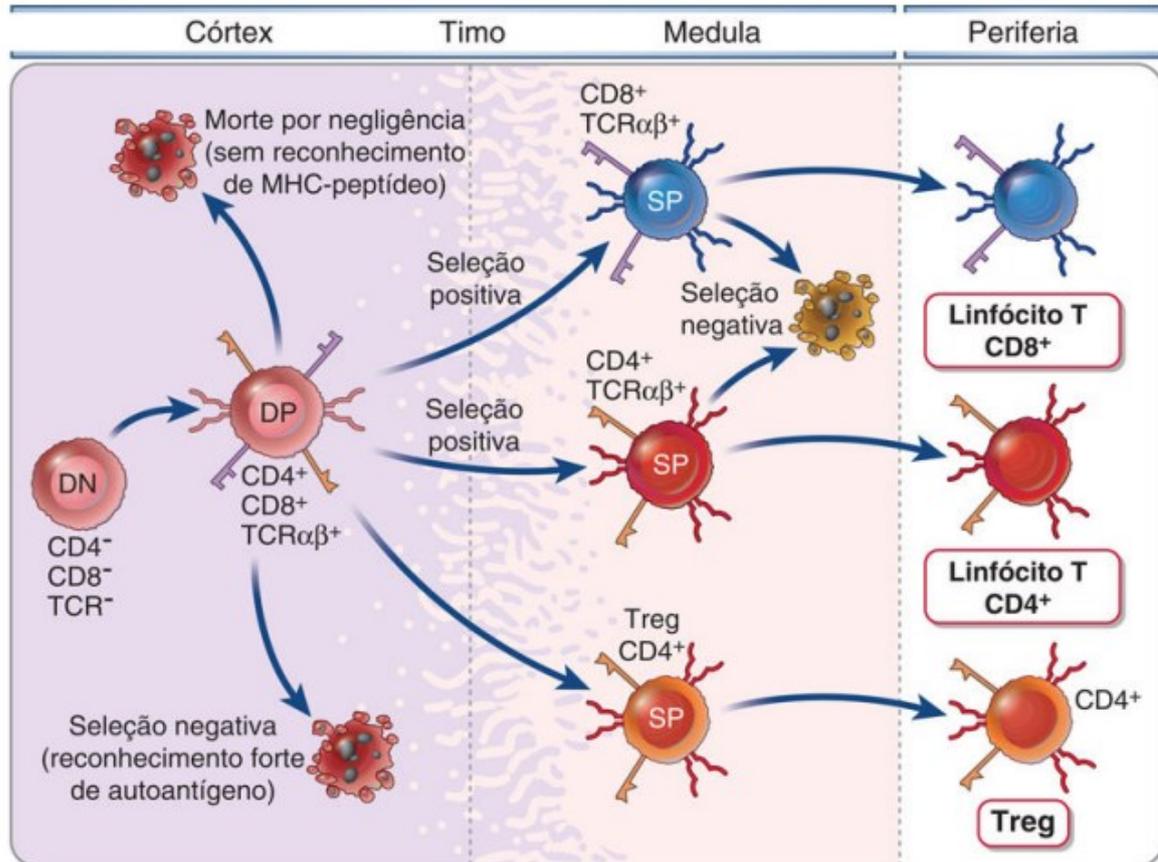
A expressão de CD56 em alguns linfócitos T (CD3⁺) levou à definição de um subconjunto de células T, denominado células NKT. Assim, as células NKT consistem em uma população que expressa tanto marcadores de células T, quanto de células NK. No entanto, o termo NKT atualmente é aplicado à duas populações celulares distintas: para as células NKT invariáveis (iNKT) e células NKT-like. As células iNKT, também conhecidas como NKT clássicas ou CD1d dependentes, apresentam um TCR único, semi-invariante, composto predominantemente por cadeias V α 24J α 18 e V β 11, que reconhecem glicolipídios (α -galactosilceramida) apresentados pela molécula MHC-like CD1d. Já as células NKT-like, também conhecidas como NKT não-clássicas ou CD1d independentes, são linfócitos T que expressam marcadores associados às células NK e apresentam um fenótipo de memória efetora altamente especializado. As células iNKT representam apenas 0,01 a 1,0% do total de células T do SP. Assim, compartimento de células NKT no SP é composto majoritariamente de células NKT-like (MONTROYA et al., 2007; PELLICCI; KOAY; BERZINS, 2020; PERALBO; ALONSO; SOLANA, 2007; VAN ACKER et al., 2017).

3.4.4 Linfócitos T

Os linfócitos T compreendem cerca de 75% do total de linfócitos no SP (SHERWOOD, 2018). Trata-se de células mononucleares que expressam um receptor de células T (TCR, do inglês *T cell receptor*) funcional, composto pela molécula CD3. Os TCRs expressos na superfície de células T possuem uma região constante e outra variável, formada por recombinação gênica, que permite que identifiquem com especificidade diversos antígenos, apresentados por moléculas MHC-I e II. Cerca de 95% dos linfócitos T são compostos por cadeias α e β ($\alpha\beta$), e os demais, pelas cadeias γ e δ ($\gamma\delta$) (MESQUITA et al., 2010; SHERWOOD,

2018). Os linfócitos T são produzidos inicialmente na MO, maturam no timo e chegam ao SP já como células maduras (Figura 6).

Figura 6 - Maturação dos linfócitos T $\alpha\beta$ no timo.



Os linfócitos T são produzidos inicialmente na MO e seguem para o timo, como progenitores de células T $\alpha\beta$ duplo-negativas (DN). No córtex tímico, essas células passam a expressar TCRs e os receptores CD4 e CD8. Os processos de seleção no estágio duplo-positivo (DP) eliminam as células autorreativas e as que não são capazes de reconhecer MHC. Assim, essas células passam pela seleção positiva e se tornam simples-positivas (SP), sendo liberadas então na circulação. Fonte: ABBAS et al., 2017.

Os linfócitos T maduros podem ser divididos em células Th ($CD4^+$) e células T citotóxicas (Tc, $CD8^+$). Adicionalmente, alguns linfócitos T permanecem duplo-positivos (DP, $CD4^+CD8^+$) ou tornam-se duplo-negativos (DN, $CD4^{neg}CD8^{neg}$). Os linfócitos Tc possuem um papel importante em respostas contra patógenos e interagem com o MHC-I de células APCs, o que leva à sua ativação. Uma vez ativadas, essas células secretam $TNF-\alpha$, $IFN-\beta$, perforinas e granzimas B, o que permite a formação de poros e indução da apoptose em células infectadas (ELLMIEIER; HAUST; TSCHISMAROV, 2013). As células Th, por sua vez, auxiliam na ativação de linfócitos B e outras células do sistema imune e são estimuladas mediante interação

com MHC-II, o que permite que se diferenciem de acordo com as citocinas que produzem em células Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4 e IL-10), Th17 (IL-17), Th9 (IL-9) e Th22 (IL-22) (SCHIFFRIN, 2014; ZHU & ZHU, 2020). As células Th também podem ser subclassificadas células em T regulatórias (Treg), as quais possuem um papel cada vez mais destacado na regulação das respostas imunes, devido à sua capacidade de suprimir respostas imunes inatas e adaptativas (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). Essas células expressam o fator de transcrição FoxP3, além dos marcadores de superfície CD25, CD127 e CTLA4. As células Treg ainda podem ser subdivididas de acordo com a expressão de CD45RA em Treg naïve ou latente (CD45RA⁺) e Treg de memória ou ativada (CD45RA^{neg}) (GEGINAT et al., 2013; MIYARA et al., 2009; SANTEGOETS et al., 2015; SCHIFFRIN, 2014).

Os linfócitos Th e Tc presentes no SP também podem ser subclassificados de acordo com o seu grau de diferenciação. As células T naïve (CD45RA⁺ CCR7⁺ CD27⁺ CD45RO^{neg} CD62L⁺) compreendem os linfócitos que recém deixaram o timo e ainda não foram expostos a nenhum estímulo antigênico por APCs. Uma vez estimuladas, essas células viram linfócitos T de memória central (CM, CD45RA^{neg} CCR7⁺ CD27⁺ CD45RO⁺ CD62L⁺), que são células ainda com baixa capacidade efetora, mas com alto potencial de expansão e produção de IL-2. No SP também podemos encontrar as células T efetoras de memória (EM, CD45RA^{neg} CCR7^{neg} CD27^{neg} CD45RO⁺ CD62L^{neg}), que produzem IFN- γ e migram para outros tecidos mediante estímulos inflamatórios. Além disso, também são encontradas as células efetoras terminais (EMRA, CD45RA⁺ CCR7^{neg} CD27^{neg} CD45RO^{neg} CD62L^{neg}), que voltam a expressar CD45RA e apesar do seu baixo potencial de expansão, possuem uma alta capacidade citotóxica. Ao fim da resposta inflamatória, algumas células T de memória permanecem na circulação, prontas para orquestrar uma resposta rápida e específica caso o organismo seja submetido ao mesmo antígeno no futuro. Essa memória imunológica organizada pelas células T, é conhecida como imunidade celular (AHLERS; BELYAKOV, 2010; GEGINAT et al., 2013; KUMAR; CONNORS; FARBER, 2018; SALLUSTO et al., 2000; SHERWOOD, 2018).

Para que as células T sejam ativadas e se diferenciem, são necessários dois sinais de ativação. O primeiro deles, ocorre pela interação do TCR com as moléculas de MHC-I ou II. O segundo sinal de ativação ocorre pela interação do CD28 presente na superfície dos linfócitos T, que interage com o CD80 (B7-1) ou CD86 (B7-2) presentes na superfície das células APCs. Somente após os dois sinais de ativação ocorrerem, que as células T são efetivamente ativadas e passam a produzir IL-2, que além de estimular a própria célula secretora, contribui com o estímulo à expansão clonal de outras células (BERNARD; LAMY; ALBERTI, 2002; KUMAR;

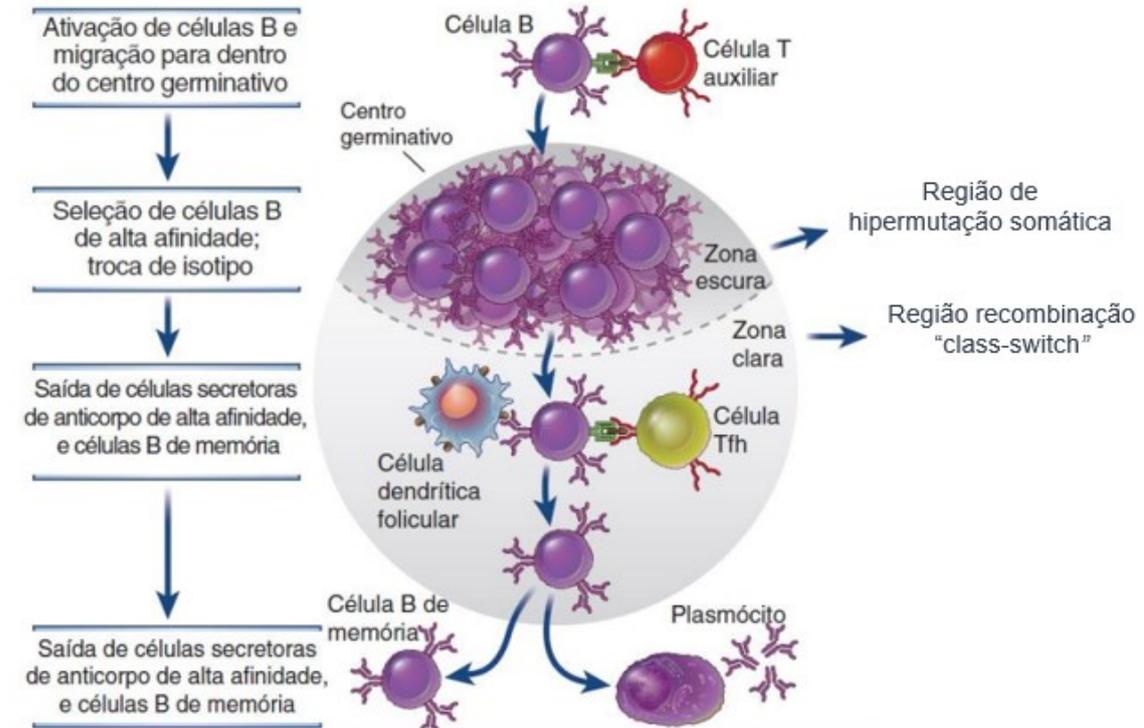
CONNORS; FARBER, 2018; SMITH-GARVIN; KORETZKY; JORDAN, 2009). Assim, é possível classificar o grau de ativação das células T de acordo com proteínas que expressam na membrana, especialmente o glicopéptido CD57. As células T naïve expressam o CD28 de forma constitutiva em sua superfície, e após o estímulo antigênico persistente, as células T CM recém diferenciadas ($CD28^+ CD57^{neg}$) se transformam em células terminais ($CD28^{neg} CD57^+$) (KARED et al., 2016; STRIOGA; PASUKONIENE; CHARACIEJUS, 2011). Assim, a expressão de CD57 indica ativação imune persistente de células T terminais que não apresentam mais capacidade proliferativa. Outro marcador que pode ser utilizado para avaliar a ativação de células T é o HLA-DR (MHC-II), utilizado por alguns estudos como um marcador tardio de ativação das células T (REVENFELD et al., 2016).

3.4.5 Linfócitos B

Os linfócitos B são elementos centrais da imunidade humoral e protegem o hospedeiro contra uma imensa variedade patógenos. O desenvolvimento das células B ocorre inicialmente na MO até o estágio de linfócitos B naïve, que posteriormente são liberados no SP e expressam o receptor de células B (BCR, do inglês *B cell receptor*) formado por isotipos IgD e IgM. Cerca de 60 a 70% das células B circulantes são linfócitos B naïve, que migram entre os órgãos linfoides secundários e tecidos linfoides associados a mucosa (MALT), onde podem terminar a sua diferenciação. Esse processo de maturação das células B ocorre mediante um estímulo antigênico, que pode ocorrer de forma independente de APCs, ao interagirem com antígenos na sua forma nativa, ou pode ocorrer via apresentação de antígeno por outras células nos órgãos linfoides (diferenciação T-dependente) (BHATTACHARYA, 2018; COOPER, 2015; PEREZ-ANDRES et al., 2010).

Ao entrarem nos órgãos linfoides, os linfócitos B podem ser expostos a diferentes antígenos por APCs ou células Th, e depois de estimulados, continuam seu processo de maturação no centro germinativo (CG) (Figura 7). Na zona escura do CG, as células B entram em processo de expansão clonal, hipermutação somática e troca de classes de Ig, o que gera uma alta afinidade entre o BCR e o antígeno de interesse. Posteriormente, na zona clara do CG, ocorre a checagem da afinidade do BCR pelo antígeno (maturação por afinidade) e a geração de células B de memória (BM) e células plasmáticas, que além do SP, podem residir em órgãos linfoides secundários ou migrar para a MO (HONG et al., 2018; LEBIEN; TEDDER, 2008; PEREZ-ANDRES et al., 2010; PIEPER; GRIMBACHER; EIBEL, 2013).

Figura 7 - Diferenciação T-dependente de células B.



Quando expostos a um antígeno por células Th, os linfócitos B entram no CG e iniciam o seu processo de diferenciação. Essas células entram em processo de expansão clonal, hipermutação somática e troca de classes de Ig, em constante migração entre a zona clara e zona escura do CG. Ao fim do processo de diferenciação, são formadas células BM e células plasmocitárias, com alta afinidade para um antígeno específico. Fonte: Adaptado de ABBAS et al., 2017.

As células BM que sofreram troca de classe de Ig (BM-CS, do inglês *class-switched*) perdem a expressão de IgD e IgM e passam a apresentar outras Ig, como IgG, IgA e IgE. Já as células BM que não sofreram troca de classe (BM-NS, do inglês *non-switched*) seguem expressando IgD e IgM, ou somente IgM. As células BM compõem cerca de 20 a 30% das células B no SP, onde cerca de metade sofre troca de classe (BHATTACHARYA, 2018; COOPER, 2015; PEREZ-ANDRES et al., 2010). Cerca de 96% das células BM que tiveram contato antigênico T-dependente expressam CD27 em sua superfície e as células que não possuem essa molécula são denominadas células BM duplo-negativas (BM-DN), pela ausência de expressão de IgD e CD27. Acredita-se que essas células se diferenciem em linfócitos BM de forma T-independente, via contato com antígenos polissacarídicos ou proteínas do sistema complemento (ABBAS et al., 2017; BERKOWSKA et al., 2011; FECTEAU; CÔTÉ; NÉRON, 2006).

Os plasmablastos representam o último estágio de diferenciação dos linfócitos B, e compreendem de 1 a 3% das células B circulantes. Essas células são identificadas pela

expressão de CD38 (CD38⁺⁺), além da fraca expressão de CD19 e expressão heterogênea de CD20 e completam a sua diferenciação em plasmócitos, que são células que já não apresentam mais capacidade de proliferação, no entanto, são capazes de secretar anticorpos com alta especificidade antigênica (BHATTACHARYA, 2018; PEREZ-ANDRES et al., 2010; SHERWOOD, 2018). Por fim, no SP também pode ser encontrada uma pequena quantidade de células B imaturas e células B transicionais. As células B transicionais estão em transição entre os linfócitos B imaturos e naïve, são funcionalmente imaturas e caracterizadas pela expressão de IgM, além de CD24 e CD38 (SALZER; SACK; FUCHS, 2019; SIMS et al., 2005).

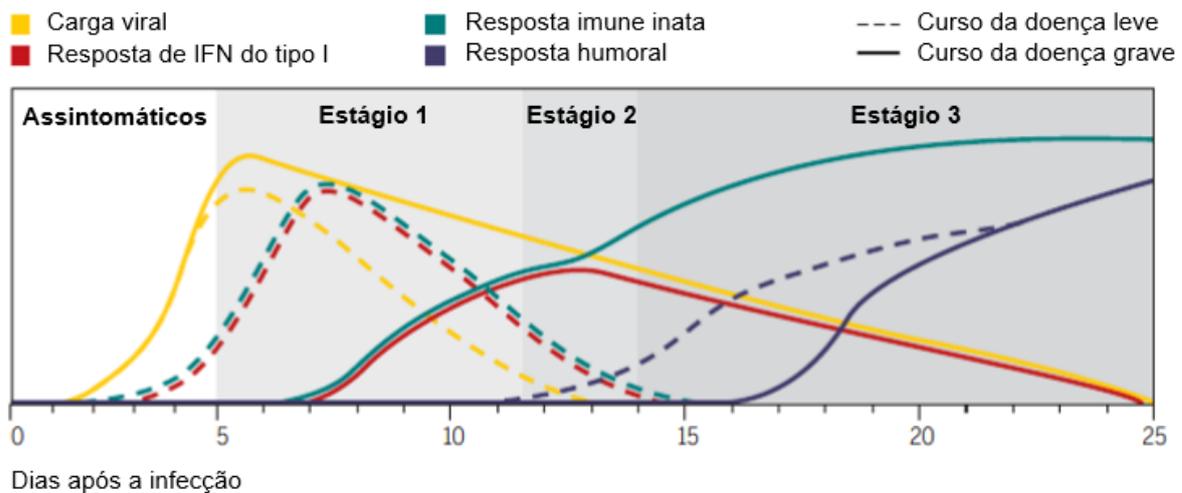
3.5 ALTERAÇÕES NO SISTEMA IMUNE NA COVID-19

A resposta imune do hospedeiro é essencial para o controle da infecção viral nos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, mas também pode contribuir com a fisiopatologia da doença. As alterações no sistema imune dos pacientes com COVID-19 já se iniciam no primeiro contato do vírus com as células do epitélio respiratório, onde a proteína E da superfície viral é reconhecida pelos TLR2. Após a endocitose realizada pelas células epiteliais, as partículas virais são reconhecidas por TLRs presentes no endossoma (TLR4, TLR3, TLR7 e TLR8), que reconhecem o RNA viral e algumas proteínas virais, como a proteína S. No citosol, o RNA viral também é detectado pelas proteínas RIG-I (gene I induzível por ácido retinóico) e MDA5 (proteína 5 associada à diferenciação de melanoma) (MDKHANA et al., 2021; SHIRATO; KIZAKI, 2021; ZHENG et al., 2021). A identificação dos PAMPs por esses PRRs leva à ativação de vias pró-inflamatórias e fatores de transcrição, como o fator nuclear κ B (NF- κ B) e fatores reguladores de IFN (IRFs, do inglês *interferon regulatory factors*), que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF e pró-IL-1 β , além do fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, do inglês *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*). Além disso, a ativação de outra classe de PRRs, os receptores do tipo NOD (NLRs, do inglês *NOD-like receptors*), como o NLRP3, pode levar a ativação de inflamassomas (CHRISTIE et al., 2021).

Quando bem-sucedida, a resposta imune inata resulta na proteção do hospedeiro ou resolução rápida e eficaz da doença, como ocorre nos casos leves e assintomáticos. No entanto, em alguns pacientes, essa sinalização pró-inflamatória ocorre de forma descontrolada e isso causa a perpetuação e progressão da doença. Para isso, o SARS-CoV-2 possui diversos mecanismos de evasão imune que interferem na resposta imune inata, como o bloqueio da sinalização da produção de IFN e do reconhecimento de PAMPs pelos PRRs, o que prejudica

a ativação de diversas vias essenciais para uma resposta antiviral efetiva. Dessa forma, os pacientes com quadros mais graves da doença apresentam um atraso na resposta de IFN do tipo I e da resposta imune inata e adaptativa, além de manterem uma carga viral elevada por mais tempo (Figura 8) (CHRISTIE et al., 2021; KOUWAKI et al., 2021; OH; SHIN, 2021; TAEFEHSHOKR et al., 2020; XIA et al., 2020).

Figura 8 - Resposta imune em pacientes com COVID-19.



Os pacientes com apresentação clínica mais grave da COVID-19 demonstram atraso na resposta imune inata e humoral, bem como atraso na resposta de IFN do tipo I e manutenção de altos níveis de carga viral mais tempo. Os casos leves estão representados pela linha tracejada, enquanto os casos graves são representados pela linha contínua. Estágio 1: pacientes com quadro leve. Estágio 2: quadro moderado. Estágio 3: quadros grave e crítico. IFN: interferon. Fonte: Adaptado de CHRISTIE et al., 2021.

Como citado anteriormente, algumas comorbidades contribuem para o agravamento da COVID-19, como pacientes com obesidade ou senescência, reconhecidas como condições que apresentam uma resposta inflamatória aumentada. Além disso, acredita-se que as características genéticas de cada indivíduo também podem contribuir para o desenvolvimento de doenças mais graves, como redução na atividade de alguns genes como por exemplo *TLR7*, *IFNAR2* e *CXCR6*, o que está relacionado com uma resposta imune inata prejudicada (DAI et al., 2021; PAIRO-CASTINEIRA et al., 2021; VELAVAN et al., 2021). No entanto, ainda restam muitas dúvidas sobre a fisiopatologia da COVID-19, como por exemplo, não se sabe exatamente por que pessoas hígdidas agravam, enquanto outras com diversas comorbidades apresentam apenas quadros leves. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil imune de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, nos diferentes quadros clínicos da doença. Espera-se,

dessa forma, contribuir para uma melhor compreensão da fisiopatologia da doença, o que no futuro possam ser uteis no desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento para a COVID-19.

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo observacional transversal com componente prospectivo.

4.2 SELEÇÃO DOS PACIENTES E GRUPO CONTROLE

Este estudo incluiu um total de 30 controles saudáveis e 157 pacientes com COVID-19. As amostras foram coletadas de agosto de 2020 a junho de 2021 e os pacientes hospitalizados foram atendidos no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e no Hospital Nereu Ramos, ambos situados em Florianópolis. Todos os pacientes incluídos no estudo tiveram o diagnóstico de COVID-19 confirmado por RT-PCR ou teste de antígeno e as amostras foram coletadas em até 15 dias após o teste diagnóstico. Foram coletados via prontuário ou mediante questionário (Apêndice A) os dados demográficos, idade, sexo, histórico médico, sintomas, TC de tórax e achados laboratoriais de todos os pacientes e a gravidade da doença foi classificada como leve, moderada, grave ou crítica de acordo com as diretrizes divulgadas pela OMS (WHO, 2021).

Pacientes com câncer, indivíduos soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), gestantes e pessoas que receberam vacinas contra o SARS-CoV-2 foram excluídos do estudo. Os critérios de exclusão para os controles saudáveis incluíram histórico de neoplasia, infecções nos últimos sete dias antes da coleta, consumo excessivo de álcool, *diabetes mellitus*, doenças autoimunes e doenças inflamatórias crônicas. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo CEPESH/UFSC nº CAAE 31124820.1.0000.0121 maio/2020; Anexo A) e todos os participantes do estudo leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice B).

4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO

Para todos os pacientes incluídos no estudo, foram coletados dois tubos de SP de 4 mL contendo o anticoagulante EDTA/K3 (Greiner Bio-One, Alemanha). Um dos tubos coletados foi destinado à análise das células do sistema imune por citometria de fluxo, enquanto o segundo tubo foi utilizado para a separação do plasma, que foi armazenado a -80°C para posterior análise do perfil de citocinas, atividade da mieloperoxidase (MPO), concentração de óxido nítrico (NO)

e anticorpos anti-SARS-CoV-2 (IgM e IgG). Todas as amostras foram processadas dentro do período de 24 h.

4.3.1 Marcação celular com anticorpos

Para a avaliação dos valores relativos e absolutos das células do sistema imune no SP, foi utilizado o método de plataforma dupla. Os valores absolutos de leucócitos foram obtidos pelo analisador de células hematológicas Sysmex XE-2100D (Sysmex Corporation, Japão), enquanto o citômetro FACSCanto II (BD Biosciences, EUA), equipado com o software FACS Diva 8.0 (BD Biosciences, EUA) foi utilizado para a obtenção dos valores relativos dos leucócitos e suas subpopulações.

A marcação das células com anticorpos foi baseada em um painel de oito cores (CARDOSO & SANTOS-SILVA, 2019). O painel consiste no uso de seis tubos, com oito a dez anticorpos cada, e permite a avaliação de diversos componentes celulares do sistema imune (Quadro 1). O volume utilizado de amostra, bem como o seu procedimento de marcação, variou de acordo com a finalidade da análise de cada tubo. O Tubo 1 foi delineado para avaliar o perfil leucocitário da amostra e foram utilizados 100 μ L de SP para a marcação das proteínas de interesse (Quadro 2). Já os Tubos 2-4 foram utilizados para avaliação da ativação e diferenciação dos linfócitos T, bem como a identificação dos linfócitos Treg. Como alguns pacientes com COVID-19 apresentam linfopenia no SP, o volume de amostra utilizada variou de 200 – 300 μ L, de acordo com a contagem absoluta de linfócitos no hemograma (Quadro 2). Para a avaliação dos linfócitos B (Tubo 5), e, para isso, foram utilizados 1,5 mL de SP e as células mononucleares foram isoladas por gradiente de densidade com o uso de Ficoll-Hypaque 1077 (Sigma-Aldrich, Alemanha). Já o Tubo 6 teve como objetivo principal a avaliação dos subtipos de monócitos e DCs, que naturalmente se encontram em baixas concentrações no SP. Dessa forma, para esse tubo, foram utilizados 200 – 300 μ L de SP, de acordo com a contagem absoluta de leucócitos no hemograma, conforme apresentado no Quadro 2. As informações detalhadas sobre os anticorpos utilizados estão apresentadas no Apêndice C.

Quadro 1 - Painel de anticorpos utilizado no estudo.

Tubo	PacB	PacO	FITC	PE	PerCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APCH7
1	CD20/ CD4	CD45	CD8	CD56	CD5	CD19/ TCR $\gamma\delta$	CD3	CD38
2	HLA-DR	CD45	CD62L	CCR7	CD4	CD45RA	CD3	CD8
3	HLA-DR	CD45	CD57	CD28	CD4	CD45RA	CD3	CD8
4	CD3	CD45	CD127	CD25	CD4	CD45RA	FoxP3	CD8
5	CD20	CD45	IgD	CD24	CD27	CD19	IgM	CD38
6	HLA-DR	CD45	CD16	CD123	CD11c	CD10	CD14	CD3/ CD19/ CD20

APC: alofocianina; APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PacB: Pacific Blue/V450; PacO: Pacific Orange/V500; PE: ficoeritrina; PECy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5-5: peridina-clorofila-proteína; Ig: imunoglobulina; Lin: linhagem. *CD4 está conjugado a brilliant violet 421 (BV421) e FoxP3 a Alexa Fluor 647 (AF647). Fonte: CARDOSO & SANTOS-SILVA, 2019.

Quadro 2 - Volume de amostra utilizada para os tubos 2, 3, 4 e 6 para a marcação de anticorpos.

Tubos 2, 3 e 4	
Linfócitos/mm ³	Volume de SP
Até 1.000	300 μ L
1.000 a 1.500	280 μ L
1.501 a 2.500	250 μ L
Mais de 2.500	200 μ L
Tubo 6	
Leucócitos/mm ³	Volume de SP
Até 4.000	300 μ L
4.000 a 5.000	280 μ L
5.001 a 7.000	250 μ L
Mais de 7.000	200 μ L

4.3.1.1 Detecção das proteínas de superfície (Tubos 1, 2, 3, 5 e 6)

Após estabelecidos os volumes a serem utilizados em cada tubo, as amostras foram adicionadas em tubos de poliestireno e foi dado início ao protocolo de marcação com os anticorpos direcionados às proteínas de interesse. Os Tubos 1, 2, 3, 5, e 6 visam a análise de proteínas de superfície. Dessa forma, após a adição do volume de amostra adequado aos tubos de poliestireno, foram pipetados os anticorpos monoclonais de interesse. Após a adição dos anticorpos, os tubos foram homogeneizados em vórtex e incubados por 30 minutos em

temperatura ambiente e na ausência de luz. Ao fim do período de incubação, foram adicionados 2 mL de solução lisante de hemácias (BD Biosciences, EUA) e a amostra foi incubada novamente no escuro por 15 minutos. Após a hemólise, os tubos foram centrifugados por cinco minutos a 2000 rpm, o sobrenadante foi descartado e a amostra foi centrifugada novamente com 2 mL de tampão fosfato-salino (PBS), por 5 minutos a 2000 rpm. Por fim, o sobrenadante foi retirado e as células foram ressuspensas em 300 µL de PBS. Para todas as amostras foi realizado um tubo sem adição de anticorpos (branco), utilizado como controle negativo.

4.3.1.2 Marcação das células Treg com o fator de transcrição FoxP3 (Tubo 4)

As células Treg foram identificadas com o auxílio de marcadores de superfície, em conjunto com o fator de transcrição Foxp3, localizado na região intranuclear das células. Assim, para a marcação das proteínas com os anticorpos de interesse, foi utilizado o kit *Transcription Factor Buffer Set* (BD Biosciences, EUA). Primeiramente, 200 – 300 µL de SP foram adicionados em tubos de poliestireno e foram adicionados os anticorpos direcionados às proteínas de membrana. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente e na ausência de luz e então foi adicionado 1 mL de PBS frio, e os tubos foram centrifugados por cinco minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi removido e o *pellet* celular foi ressuspensado em 1 mL da solução *Fix/Perm Buffer* e incubado por 35 minutos em geladeira. Após o período de incubação, foi adicionado 1 mL da solução *Perm/Wash* e os tubos foram centrifugados por seis minutos a 2000 rpm, na temperatura de 2-8°C. Ao fim da centrifugação, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 2 mL da solução *Perm/Wash* e centrifugadas novamente por seis minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi então ressuspensado em 100 µL da solução *Perm/Wash*, foi adicionado o anticorpo monoclonal anti-Foxp3 e a amostra foi incubada por 35 minutos em geladeira. Ao fim da incubação, foram adicionados 2 mL da solução *Perm/Wash* e os tubos foram centrifugados por seis minutos a 2000 rpm, na temperatura de 2-8°C, este processo foi repetido por mais uma vez. Por fim, o sobrenadante foi ressuspensado em 300 µL de PBS e imediatamente adquirido no citômetro de fluxo.

4.3.2 Aquisição das amostras no citômetro de fluxo

Após a marcação com os anticorpos de interesse, procedeu-se para a aquisição dos tubos no citômetro FACSCanto II (BD Biosciences, EUA), equipado com o software FACS Diva 8.0 (BD Biosciences, EUA). Para o Tubo 1, foram adquiridos 200 mil eventos totais. Já

para os Tubos 2-4, que visam avaliar os linfócitos T, a amostra foi adquirida até chegar a 100 mil eventos de células CD3⁺ (*stopping gate*). Para o Tubo 5, que visa avaliar os linfócitos B, a amostra foi adquirida até chegar a 100 mil eventos de células CD19⁺ (*stopping gate*), e, por fim, para o Tubo 6, foram adquiridos um milhão de eventos totais. A estratégia de *gating* foi realizada conforme proposto por Cardoso e Santos-Silva (2019) (Anexos B-G) e a análise dos dados foi realizada pelo software Infinicyt 2.0 (Cytognos, Espanha). Todos os anticorpos utilizados foram previamente titulados e uma compensação padrão automática foi aplicada a cada aquisição. O desempenho do citômetro de fluxo foi verificado diariamente com o uso de esferas de calibração (BD Biosciences, EUA).

4.4 QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE CITOCINAS

A quantificação das concentrações plasmáticas de IL-12p70, IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-17A, IL-4, IL-2, TNF- α e IFN- γ foi realizada pelos kits *Human Inflammatory Cytokine Cytometric Bead Array* (CBA) e o *BD™ Human Th1/Th2/Th17* (BD Biosciences, EUA). O método é baseado na captura das citocinas de interesse por esferas de tamanho e fluorescência conhecidos, onde cada esfera é conjugada a um anticorpo específico, destinado para a citocina de interesse. Esses anticorpos são conjugados à ficoeritrina (PE), que fornece um sinal fluorescente proporcional à quantidade de analito encontrada na amostra. Para a realização do método, foram utilizados 50 μ L do plasma armazenado a -80 °C e o procedimento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. Em conjunto com as amostras dos pacientes analisados, foi realizada uma curva padrão de 0 a 5.000 pg/mL, o que permitiu o cálculo da concentração de cada citocina avaliada. As aquisições dos tubos foram realizadas em um citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, EUA) e a os dados foram analisados no software *FCAP Array™* (BD Biosciences).

4.5 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MPO

A atividade da MPO foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Rao et al. (1993). O método é baseado na capacidade da enzima MPO em reduzir o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O complexo formado por essa redução reage com a *o*-dianisidina, que atua como doador de hidrogênio e dá origem a um produto de cor amarela, mensurável no comprimento de onda de 450 nm. Para a realização do ensaio, foram utilizados 20 μ L do plasma armazenado a -80 °C, que foram transferidos para uma placa de 96 poços. Em seguida, as amostras foram incubadas, em temperatura ambiente, com 180 μ L da solução reagente (0,167 mg/mL de *o*-dianisidina, 2HCl e 0,0005% de H₂O₂) por 15 minutos. Ao fim do período de

incubação, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 15 µL de azida sódica (1%) e foi realizada a medição colorimétrica (450 nm) em um leitor de microplacas (HEALES, China). A atividade enzimática foi determinada por interpolação de uma curva padrão de concentrações conhecidas de MPO (0,7 – 140 mU/mL).

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NO)

As concentrações de NO no plasma de pacientes com COVID-19 foi avaliada de forma indireta pela reação de Griess (GREEN et al., 1982), que avalia a formação de seus metabólitos nitrito (NO₂-) e nitrato (NO₃-). Esse método utiliza o cloreto de vanádio, que possui a capacidade de converter NO₂- e NO₃-. Esse metabólito, em conjunto com o reagente de Griess, gera uma coloração rosada, detectável no comprimento de onda de 540 nm. Para a realização do ensaio, foram utilizados 300 µL do plasma armazenado a -80 °C, que foi primeiramente submetido à desproteinização com 30 µL de solução de sulfato de zinco (ZnSO₄, 20%). Após a adição do sulfato de zinco, as amostras foram incubadas *overnight* na temperatura de -20°C e então foram adicionados 6 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 2,5 N em cada amostra, que foram centrifugadas por 15 min a 2500 rpm. Após a centrifugação, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços. Em cada poço, foram adicionados 100 µL de solução cloreto de vanádio (VCl₃, 0,8%) e ácido clorídrico (HCl, 3M). Após um período de incubação de 20 minutos, foram adicionados 100 µL do reagente de Griess (sulfanilamida 1%, ácido fosfórico 5% e N-(1-naftil) etilenodiamina 0,1%) e a amostra foi incubada por 40 minutos à 37°C em banho-maria. Por fim, a placa foi lida em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm (HEALES, China). Para o cálculo da concentração de NO₂- e o NO₃- foram realizadas curvas padrão com concentrações conhecidas de NO₂- (0 - 150 µM).

4.7 AVALIAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI-SARS-COV-2

A avaliação qualitativa dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgG e IgM foi realizada por pelos kits comerciais *Human anti-2019 nCoV(N+S) IgM ELISA kit* e *Human anti-2019 nCoV(N+S) IgG ELISA kit* (FineTest, China) e o teste foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. O método de detecção é baseado em um ensaio imunoenzimático indireto, onde as placas de 96 poços são revestidas com as proteínas N e S do SARS-CoV-2 e, após a adição da amostra, são adicionados os anticorpos anti-IgM ou anti-IgG humano conjugados à uma peroxidase (HRP, do inglês *horseradish peroxidase*). A ligação antígeno-

anticorpo é revelada pela adição de um substrato da HRP, que gera um produto de cor azul e se torna amarelo após a adição da solução de parada. A densidade ótica foi avaliada em um leitor de microplacas (HEALES, China) no comprimento de onda de 450 nm.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis contínuas foram comparadas pela análise de variância (ANOVA) com teste *post-hoc* de Bonferroni no caso de distribuição paramétrica. As variáveis não paramétricas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. As variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado. O valor de $P \leq 0,05$ foi considerado significativo. As variáveis foram comparadas com o desfecho (óbito/sobrevivência) pelo teste U de Mann-Whitney, e os resultados significativos foram submetidos à regressão logística multivariada. A sensibilidade, especificidade e ponto de corte das variáveis em relação ao desfecho foram avaliados por meio da curva característica de operação do receptor (ROC, do inglês *receiver operating characteristic*). A curva de sobrevida com pontos de corte estabelecidos foi avaliada pela curva de Kaplan-Meier com teste log-rank. A análise estatística foi realizada usando MedCalc versão 20.015 (Bélgica).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO E EXAMES LABORATORIAIS

Neste estudo, foram incluídos 187 indivíduos: 30 controles saudáveis e 157 pacientes diagnosticados com COVID-19, os quais foram classificados de acordo com a apresentação clínica da doença, em leve (n = 36), moderada (n = 30), grave (n = 32) e crítica (n = 59). A coleta das amostras de SP dos pacientes foi realizada de agosto de 2020 até junho de 2021, assim, foram incluídos pacientes infectados principalmente pelas variantes alfa (B.1.1.7), beta (B.1.351) e gama (P.1), que foram as principais VoCs circulantes no Brasil nesse período. Os resultados apresentados representam o curso natural da doença, sem interferência do efeito da vacina na resposta imune, pois os pacientes incluídos neste estudo não receberam nenhuma dose da vacina até o momento da coleta.

A mediana de idade do grupo controle, com predominância do sexo masculino (66%), foi de 54 anos (31 – 66 anos). As características clínicas e demográficas dos pacientes com COVID-19 estão descritas na Tabela 1. A mediana de idade dos pacientes com COVID-19 foi de 55 anos (22 - 98 anos). Os pacientes com quadro clínico moderado a crítico apresentaram mediana de idade superior quando comparados aos pacientes leves ($P < 0,001$) e as comorbidades mais relatadas entre os pacientes foram hipertensão arterial (47,1%, $P < 0,001$), obesidade (35,7%, $P = 0,290$) e *diabetes mellitus* (28,7%, $P = 0,003$), onde hipertensão arterial e *diabetes mellitus* foram observadas principalmente em pacientes em pacientes mais graves.

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos pacientes com COVID-19.

Variável	Todos (n = 157)	Leve (n = 36)	Moderado (n = 30)	Grave (n = 32)	Crítico (n = 59)	P
Idade (anos), mediana (mín. - máx.)	55,0 (22,0 – 98,0)	37,50 (22,0 – 71,0) a	52,0 (32,0 – 74,0) b	56,5 (25,0 – 93,0) b	60,0 (39,0 – 98,0) b	<0,001
Gênero						
Feminino, n (%)	72 (45,9%)	22 (61,1%)	9 (30,0%)	15 (46,9%)	26 (44,1%)	0,090
Masculino, n (%)	85 (54,1%)	14 (38,9%)	21 (70,0%)	17 (53,1%)	33 (55,9%)	
Comorbidades						
Hipertensão arterial, n (%)	74 (47,1%)	2 (5,6%)	12 (40,0%)	21 (65,6%)	39 (66,1%)	<0,001
<i>Diabetes mellitus</i> , n (%)	45 (28,7%)	3 (8,3%)	6 (20,0%)	12 (37,5%)	24 (40,7%)	0,003
Obesidade (IMC \geq 30 kg/m ²), n (%)	56 (35,7%)	4 (11,1%)	8 (26,7%)	8 (25,0%)	36 (22,9%)	0,290
Cardiopatas, n (%)	12 (7,6%)	3 (8,3%)	2 (6,7%)	3 (9,4%)	4 (6,8%)	0,967
Doença autoimune, n (%)	6 (3,8%)	1 (2,8%)	0	1 (3,1%)	4 (6,8%)	0,430
Doença renal, n (%)	5 (3,2%)	0	1 (3,3%)	1 (3,1%)	3 (5,1%)	0,598
Doença pulmonar, n (%)	16 (10,2%)	1 (2,8%)	1 (3,3%)	5 (15,6%)	9 (15,3%)	0,094

Outros, n (%)	16 (10,2%)	0	8 (26,7%)	3 (9,4%)	5 (8,5%)	0,004
---------------	------------	---	-----------	----------	----------	-------

IMC: índice de massa corporal. Outras comorbidades incluem doença hepática, acidente vascular cerebral e infarto agudo do miocárdio. As variáveis não paramétricas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. As variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado. $P \leq 0,05$ foi considerado significativo.

Apesar dos resultados apresentados não mostrarem diferenças entre o gênero masculino e feminino quando os pacientes foram classificados de acordo com a gravidade da doença ($P = 0,090$), outros estudos na literatura relatam que a COVID-19 possui diferenças quanto à gravidade e mortalidade de acordo com o sexo e a idade do indivíduo infectado. Em um estudo realizado por Dudley e Lee (2020), no qual foi realizada uma análise estratificada por sexo, foi observado que mesmo após o ajuste por idade, os efeitos das comorbidades na mortalidade por COVID-19 foram maiores em homens em comparação com mulheres (DUDLEY & LEE, 2020). Além disso, uma análise de dados multicêntrica no estado de São Paulo, que avaliou mais de 30 mil pacientes diagnosticados com COVID-19, observou que a doença induziu mais alterações laboratoriais em homens do que em mulheres. No entanto, ambos os sexos apresentaram diversos parâmetros alterados em indivíduos com idade ≥ 61 anos. Além disso, o mesmo estudo observou que dos pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI), 74% do total eram homens, e 57% dos pacientes totais possuíam mais de 60 anos, com faixa etária com variação de 20 a 88 anos (TEN-CATEN et al., 2021).

Uma das principais características da COVID-19 é a resposta inflamatória intensa. Dessa forma, alterações como elevação da PCR e LDH estão presentes em grande parte dos pacientes infectados (POURBAGHERI-SIGAROODI et al., 2020; TEN-CATEN et al., 2021; ZHANG et al., 2020). Neste estudo, foram avaliados os parâmetros laboratoriais apenas dos pacientes que necessitaram de hospitalização ou realizaram coleta ambulatorial quando foram atendidos na emergência (Tabela 2). Assim, nos pacientes avaliados, foi observado um aumento da PCR em relação aos valores de referência (3 mg/L) em todos os grupos, de quadro clínico moderado a crítico. Quando comparados os grupos, os pacientes críticos apresentaram o maior aumento desse marcador, com diferença estatística em relação aos pacientes com quadro clínico moderado ($P = 0,006$). A PCR é uma proteína de fase aguda, que tem seus valores elevados em resposta a lesões e inflamações teciduais. Além disso, essa proteína é capaz de ativar o sistema complemento e intensificar a resposta inflamatória pela indução da produção de citocinas pró-inflamatórias. Assim, a PCR já é apresentada como um marcador de prognóstico na COVID-

19, correlacionada de forma positiva com a gravidade da doença (CHEN W. et al., 2021; MOSQUERA-SULBARAN et al., 2021; STRINGER et al., 2021).

Tabela 2 - Resultados laboratoriais dos pacientes com COVID-19.

Variável	n	Todos	n	Leve	n	Moderado	n	Grave	n	Crítico	P
Ureia (mg/dL)	116	40,0 (14,0 – 391,0)	-	-	26	38,5 (22,0 – 92,0)	32	35,5 (18,0 – 127,0)	58	44,0 (15,0 – 391,0)	0,109
Creatinina (mg/dL)	117	0,94 (0,34 – 2,76)	-	-	27	1,01 (0,60 – 2,14)	32	0,90 (0,51 – 1,95)	58	0,90 (0,34 – 2,76)	0,322
Dímero-D (ng/mL)	93	1.073,0 (190,0 – 35000,0)	-	-	18	1.031,5 (210,0 – 35000,0)	24	794,0 (190,0 – 4163,0)	51	1.311,0 (313,0 – 35000,0)	0,113
PCR (mg/L)	117	87,30 (0,86 – 352,10)	-	-	27	51,00 (4,20 – 302,60) a	32	94,25 (1,70 - 271,40) a, b	58	95,20 (0,86 – 352,10) b	0,008
LDH (U/L)	67	340 (151 – 645)	-	-	14	273 (151 - 506) a	19	303 (162 - 645) a, b	34	383 (177 – 612) b	0,033
Eritrócitos milhões/mm ³	157	4,37 (2,44 – 7,85)	36	4,52 (3,87 – 5,79) a	30	4,48 (2,82 – 7,85) a, b	32	4,54 (3,19 – 5,55) a	59	4,12 (2,44 – 5,90) b	0,002
Hemoglobina (g/dL)	157	12,80 (6,90 – 21,70)	36	13,65 11,40 – 16,80) a	30	13,35 (9,10 – 21,70) a	32	13,50 (10,00 – 16,40) a	59	12,10 (6,90 – 15,90) b	<0,001
Hematócrito (%)	157	39,10 (21,40 – 67,10)	36	40,75 (34,10 – 53,70) a	30	39,15 (25,30 – 67,10) a, b	32	40,55 (31,10 – 49,10) a, b	59	36,70 (21,40 – 49,30) b	0,002
Plaquetas/mm ³	157	261,000 (20,000 – 740,000)	36	260,500 (20,000 – 459,000)	30	249,500 (91,000 – 604,000)	32	259,500 (72,000 – 547,000)	59	267,000 (107,000 – 740,000)	0,584
Troponina	43	12,63 (0,01 – 2381,20)	-	-	9	19,15 (4,60 – 262,57)	10	14,94 (0,01 – 95,10)	24	10,22 (0,01 – 2381,20)	0,561
PBNP (pg/mL)	53	328 (35 - 11949)	-	-	11	517 (44 - 4885)	11	324 (35 - 10400)	31	305 (40 - 11494)	0,441
TP (seg.)	64	11,85 (10,00 – 104,80)	-	-	15	12,10 (10,30 – 104,80) a	8	11,15 (10,00 – 12,10) b	41	12,00 (10,50 – 14,70) a,b	0,041
RNI	64	1,06 (0,89 – 11,19)	-	-	15	1,11 (0,94 – 11,19) a	8	0,98 (0,89 – 1,09) b	41	1,06 (0,93 – 1,70) a	0,010
TTPa (seg.)	53	27,40 (20,00 – 45,50)	-	-	11	27,40 (2500 – 31,80)	6	28,70 (20,00 – 36,60)	36	27,20 (20,00 – 45,50)	0,763

(continuação)

BT (mg/dL)	65	0,30 (0,10 – 2,30)	-	-	9	0,50 (0,30 – 2,30)	6	0,40 (0,20 – 0,60)	50	0,30 (0,10 – 1,10)	0,283
BD (mg/dL)	65	0,20 (0,03 – 1,30)	-	-	9	0,10 (0,05 – 1,30)	6	0,15 (0,05 – 0,30)	50	0,20 (0,03 – 0,80)	0,747
BI (mg/dL)	65	0,20 (0,00 – 1,00)	-	-	9	0,30 (0,10 – 1,00) a	6	0,21 (0,10 – 0,50) a, b	50	0,20 (0,00 – 0,62) b	0,041

Os resultados estão expressos em mediana (intervalo). PBNP: peptídeo natriurético cerebral; TP: tempo de protrombina; RNI: razão normalizada internacional; TTPa: tempo de tromboplastina parcial ativada; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta. As diferenças foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis com o teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. $P \leq 0,05$ foi considerado significativo. Letras diferentes indicam valores que são significativamente diferentes entre si.

No presente estudo, todos os grupos avaliados (moderado a crítico) apresentaram concentração de LDH acima do valor de referência (120 a 246 U/L). Valores elevados dessa enzima foram observados nos pacientes com pior quadro clínico (crítico), que apresentaram diferença significativa quando comparados aos pacientes moderados ($P = 0,029$). Assim como a PCR, altas concentrações de LDH também são relacionadas como marcador prognóstico na COVID-19. Essa enzima está presente no citoplasma das células, o que a torna um importante marcador de lise celular. Diante disso, estudos na literatura relataram que pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 com valores elevados de LDH possuem uma maior probabilidade de agravo da doença e piores desfechos (HENRY et al., 2020; LI et al., 2020).

Outro parâmetro laboratorial avaliado neste estudo, foi o dímero-D. Os pacientes com quadro clínico moderado já apresentaram valores elevados de dímero-D, que foi observado acima do valor de referência (500 ng/mL) em todos os grupos avaliados. No entanto, não foi observada diferença em relação ao quadro clínico, quando os grupos de moderado a crítico foram comparados, o que indica que esse marcador não é capaz de distinguir a gravidade da doença nos pacientes avaliados. O dímero-D é um dos principais marcadores utilizados para a investigação da ocorrência de eventos tromboembólicos, pois reflete de forma indireta a ativação do sistema hemostático. Dessa forma, acredita-se que esse marcador, quando elevado, indique um pior prognóstico para os pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 (POURBAGHERI-SIGAROODI et al., 2020; ZHANG Z. et al., 2020). Vale ressaltar que o dímero-D é um marcador sensível, porém não específico para eventos trombóticos. Altos valores desse marcador podem ser observados em inflamações agudas e crônicas, além de outras situações como doenças hepáticas e cirurgias recentes, independente da ocorrência de eventos trombóticos (AUDITEAU et al., 2022). Outros estudos também observaram

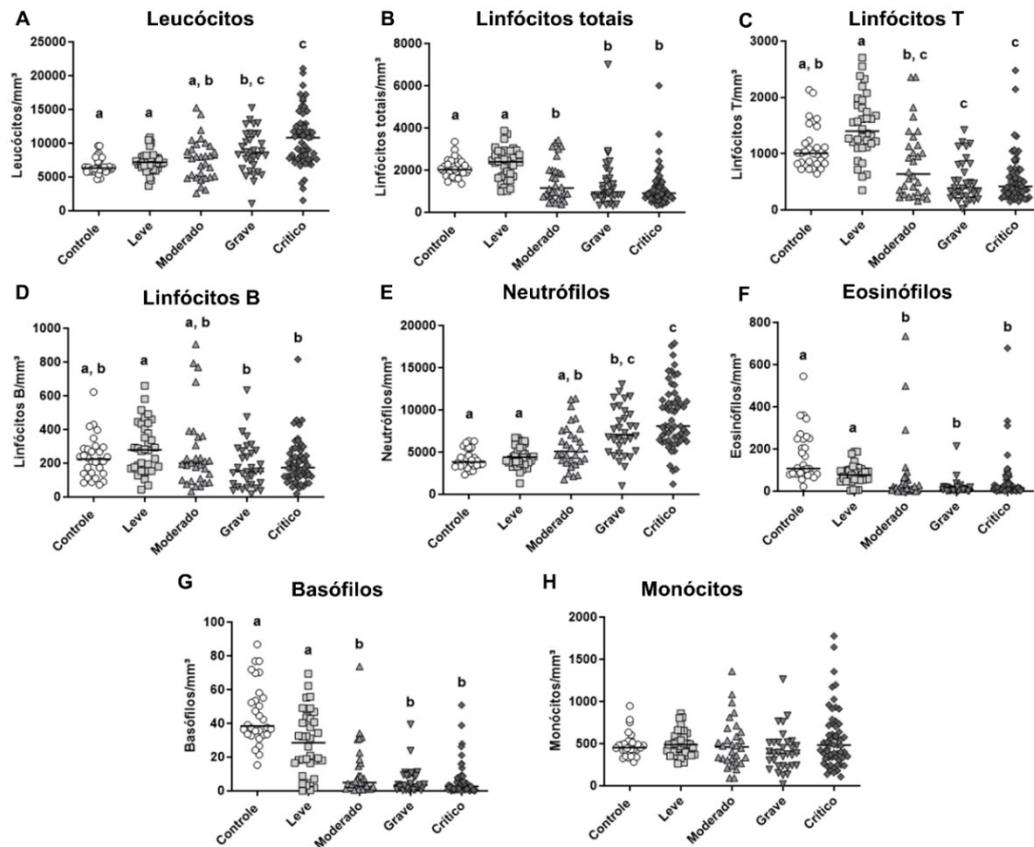
concentrações de dímero-D elevadas no SP de pacientes admitidos com COVID-19, mesmo os de menor gravidade, sem distinção entre os pacientes que desenvolveram trombose aguda e aqueles que não desenvolveram (AURON; PORRES-AGUILAR; CAMERON, 2022; WEINBERG et al., 2021). Os demais parâmetros avaliados (Tabela 2) se apresentaram dentro dos valores de referência.

5.2 AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE NO SP

5.2.1 Celularidade total e avaliação dos neutrófilos

Como pode ser observado na Figura 9A, os pacientes com COVID-19 apresentaram aumento na contagem absoluta de leucócitos, quando comparados ao controle, nos quadros clínicos grave e crítico ($P < 0,001$). O valor absoluto de linfócitos se apresentou reduzido a partir dos pacientes moderados (Figura 9B; $P < 0,001$), com maior redução de linfócitos T (Figura 9C), especialmente nos pacientes com quadro grave e crítico ($P < 0,001$). Os pacientes com COVID-19 não apresentaram redução na contagem absoluta de linfócitos B, quando comparados ao grupo controle. No entanto, os pacientes com quadro grave e crítico apresentaram contagens mais baixas quando comparados aos pacientes leves (Figura 9D; $P = 0,015$). Em relação aos granulócitos, foi observado um aumento de neutrófilos e redução de basófilos e eosinófilos, nos pacientes com quadro moderado a crítico (Figura 9E-G). As informações detalhadas sobre a celularidade total estão apresentadas no Apêndice D.

Figura 9 - Contagem absoluta dos leucócitos do SP de pacientes com COVID-19.

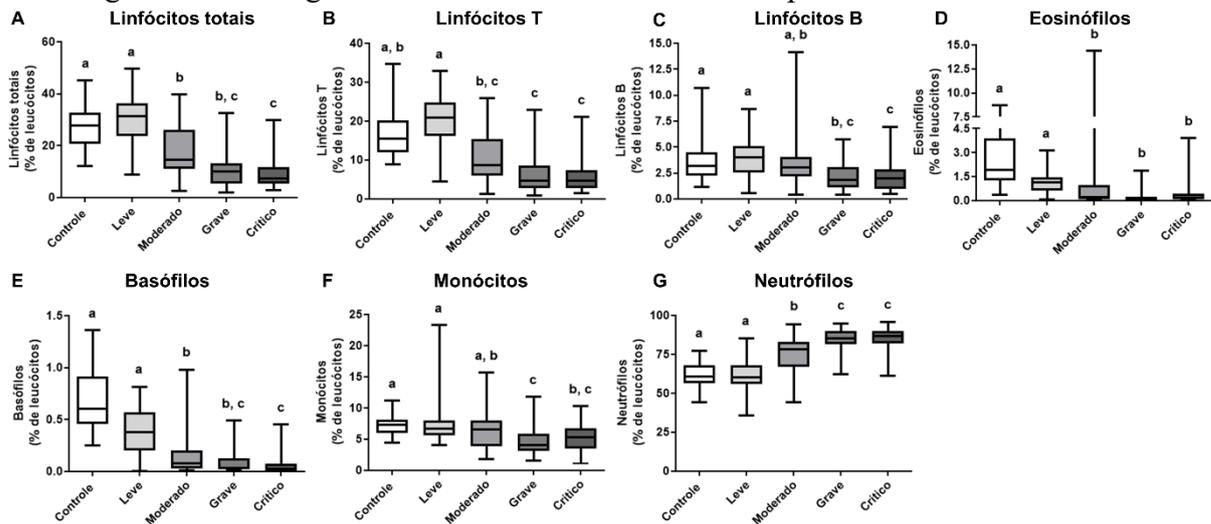


Valores absolutos da contagem de leucócitos no SP de pacientes com COVID-19. As linhas traçadas representam a mediana de cada grupo. As variáveis foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$).

Além dos valores absolutos, a contagem relativa de leucócitos também foi avaliada (Figura 10). Assim, os pacientes com COVID-19 apresentaram uma redução nos valores relativos de linfócitos, quando comparados com o grupo controle e pacientes leves, especialmente nos pacientes com doença crítica (Figura 10A; $P < 0,001$). Essa redução foi observada tanto em linfócitos T (Figura 10B), quanto em linfócitos B (Figura 10C). Em relação aos linfócitos T, foi observada uma redução significativa dos valores relativos, quando comparados aos controles saudáveis, nos quadros clínicos grave e crítico ($P < 0,001$). Já quando comparados os grupos de pacientes infectados, foi observada diferença significativa entre os pacientes com quadro clínico leve em comparação aos pacientes com quadro moderado a crítico, devido ao aumento de linfócitos T em pacientes com quadro clínico leve. Quanto aos linfócitos B, foi observada uma redução no valor relativo dessas células apenas nos pacientes graves e críticos, quando comparados com o grupo controle ($P < 0,001$). No compartimento mieloide, também foi observada a redução dos valores relativos de eosinófilos (Figura 10D, P

< 0,001) e basófilos (Figura 10E, $P < 0,001$) quando comparados os pacientes de quadro moderado a crítico, em relação aos pacientes leves e grupo controle. A contagem relativa de monócitos também apresentou uma pequena redução nos pacientes graves e críticos (Figura 10F, $P < 0,001$).

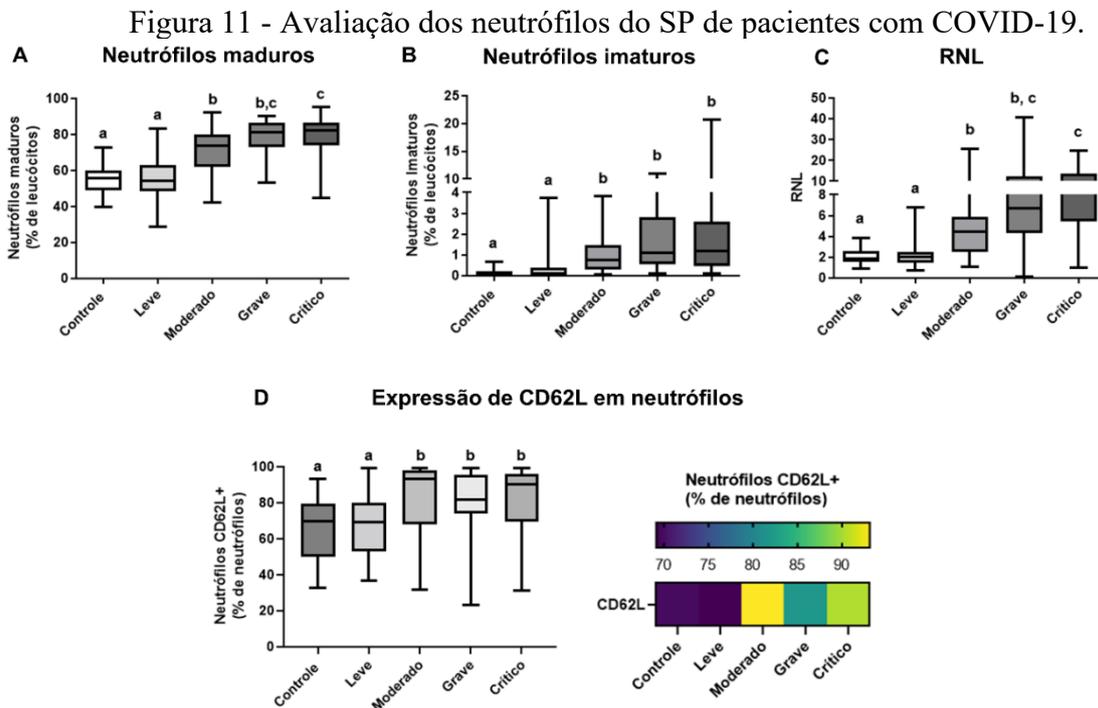
Figura 10 - Contagem relativa dos leucócitos do SP de pacientes com COVID-19.



Contagem relativa dos linfócitos totais (A), linfócitos T (B), linfócitos B (C), eosinófilos (D), basófilos (E), monócitos (F) e neutrófilos (G) de pacientes com COVID-19. As variáveis foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

Ao contrário do que foi observado para as demais células citadas, quando avaliados os valores relativos da contagem de neutrófilos, foi observado um aumento gradativo na porcentagem dessas células de acordo com a gravidade da doença, nos pacientes de quadro moderado a crítico, em comparação aos pacientes leves e grupo controle (Figura 10G, $P < 0,001$). Como é possível observar na Figura 11A, nos grupos avaliados, grande parte dos leucócitos encontrado no SP foram neutrófilos maduros, que assim como apresentado na Figura 10, estavam em maior quantidade nos pacientes com quadros mais graves da doença, nos quais o valor da mediana de neutrófilos maduros excede 80% do total de leucócitos. Os pacientes com quadro moderado a crítico também apresentaram um aumento de neutrófilos imaturos ($P < 0,001$). O aumento da contagem de neutrófilos, em conjunto com a redução da contagem de linfócitos, levou a valores elevados de RNL nos pacientes com COVID-19, de quadro clínico

moderado a crítico, especialmente nos casos mais graves (Figura 11C). Além disso, nesses pacientes, foi observado um aumento na expressão de CD62L nos neutrófilos (Figura 11D, $P < 0,001$).



Valores relativos de neutrófilos maduros (A) e imaturos (B), RNL (C) e expressão de CD62L em neutrófilos de pacientes e controles com COVID-19. As cores no mapa de calor (D) representam a mediana da porcentagem de expressão de CD62L nos neutrófilos, que varia de azul escuro para menor expressão a amarelo para maior expressão. As variáveis foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). A RNL foi calculada pela divisão da contagem absoluta de neutrófilos pela contagem absoluta de linfócitos. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

Diante do exposto, é possível observar que a COVID-19 leva à diversas alterações no perfil das células imunes no SP dos pacientes infectados e que essas alterações já começam nos pacientes com quadro clínico moderado. Desde o início de 2020, os primeiros estudos publicados no início da pandemia demonstraram que o COVID-19 se comporta de forma diferente de outras infecções virais, com alto número de neutrófilos e redução na contagem de linfócitos (CHEN G. et al., 2019; DENG et al., 2020; QIN et al., 2020). Isso leva à uma RNL aumentada, o que já se tornou uma marca registrada da doença e um indicador de prognóstico. Devido a isso, a resposta imune tem sido relacionada à imunopatogênese da COVID-19, o que

estimulou o surgimento de diversos estudos para avaliar o perfil imune desses pacientes (CHEN G. et al., 2019; DIAO et al., 2020; LIU et al., 2020; SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020).

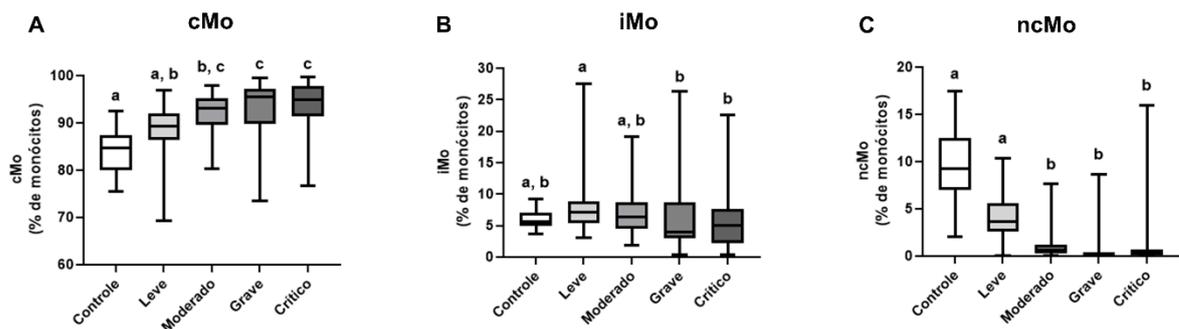
Nesse sentido, os neutrófilos foram destacados como células ativas no desenvolvimento da COVID-19 (CAVALCANTE-SILVA et al., 2021; GUAN et al., 2020; SINGH et al., 2021; WANG J. et al., 2020). Os granulócitos são as células mais abundantes no SP e estão entre as primeiras células a serem recrutadas para combater infecções, como mediadores tanto da resposta imune inata quanto a adaptativa (LIEW; KUBES, 2019; REUSCH et al., 2021). Como o presente estudo, outros estudos também relataram um aumento na contagem de neutrófilos em pacientes com COVID-19 e mielopoiese de emergência com liberação de neutrófilos imaturos (SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020; SILVIN et al., 2020). Além disso, há evidências de que essas células são mais ativadas nos casos mais graves da doença e contribuem para a imunotrombose pela formação de NETs. Todas essas características são consideradas como fatores de pior prognóstico em pacientes com COVID-19 (DENNISON et al., 2021; OBERMAYER et al., 2021; SILVIN et al., 2020; SINGH et al., 2021; WANG J. et al., 2020)

Os resultados deste estudo também destacaram o aumento da expressão de CD62L (L-selectina) em neutrófilos de pacientes com condições moderadas a críticas. A L-selectina é uma molécula de adesão expressa em vários leucócitos, e está envolvida na fixação dos leucócitos ao endotélio e no “rolamento” dos granulócitos, o que facilita a migração para os sítios inflamatórios. Supõe-se que a L-selectina também esteja envolvida na amplificação do processo inflamatório, o que permite que os neutrófilos aderentes recrutem neutrófilos adicionais (IVETIC; GREEN; HART, 2019; NAUSEEF, 2014; RAHMAN et al., 2021). Um estudo realizado por Schulte-Schrepping et al. (2020) avaliou o imunofenótipo de neutrófilos no SP de pacientes com COVID-19 e relatou um aumento de neutrófilos com perfil supressor (expressão de PD-L1 elevada e regulação negativa de CD62L) em pacientes infectados com SARS-CoV-2 (SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020). No presente estudo, em pacientes com progressão avançada da doença, observou-se aumento de neutrófilos com perfil predominantemente maduro e expressão aumentada de CD62L, o que sugere se tratar de células com estímulo migratório para sítios inflamatórios, como os pulmões, que possuem um aumento intenso na contagem de neutrófilos em pacientes com COVID-19, de acordo com a progressão da doença e dano tecidual relacionado (BALE; DONEEN; VIGERUST, 2020).

5.2.2 Monócitos

As APCs fazem a ligação necessária entre a resposta imune inata e adaptativa, via apresentação de antígenos para células efetoras e produtoras de anticorpos (WORBS, HAMMERSCHMIDT; FÖRSTER, 2017). Os monócitos e as DCs são conhecidos como APCs profissionais e desempenham um papel essencial em uma resposta eficaz a um agente infeccioso (KAPELLOS et al., 2019). Em nosso estudo, foram avaliadas as frequências de monócitos e DCs e seus subtipos. Embora os valores absolutos de monócitos não tenham diferido entre os grupos avaliados, foram observadas alterações relevantes dentro do compartimento monocítico (Figura 12A-C). Como esperado, o grupo controle teve cMo como o principal subtipo, seguido por ncMo e iMo. No entanto, os pacientes com COVID-19 tiveram uma frequência maior de iMo do que ncMo. Embora tenha sido observado um aumento significativo de cMo, principalmente nos casos moderados a críticos ($P < 0,001$; Figura 12A), também houve uma grande redução na quantidade de ncMo, de até 30 vezes em pacientes críticos quando comparados com os controles saudáveis ($P < 0,001$; Figura 12C). Os valores dos iMo não diferiram do grupo controle (Figura 12B). No entanto, em relação aos grupos com COVID-19, os pacientes com doença leve apresentaram maiores porcentagens de iMo do que pacientes com doença grave ($P = 0,046$) ou crítica ($P = 0,026$). As informações detalhadas sobre os resultados do compartimento monocítico estão apresentadas no Apêndice I.

Figura 12 - Alterações no compartimento monocítico no SP de pacientes com COVID-19.

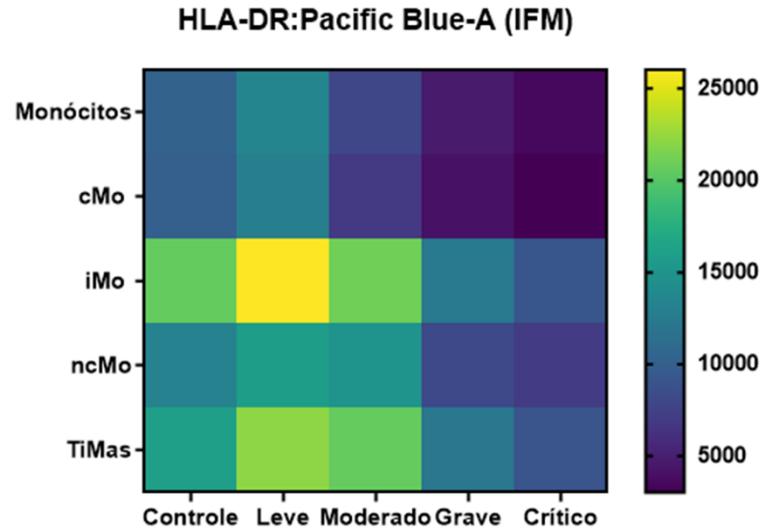


Valores relativos de monócitos e seus subtipos cMo (A), iMo (B) e ncMo (C). As variáveis foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil. cMo: monócitos clássicos; iMo: monócitos intermediários; ncMo: monócitos não clássicos

De todos os subconjuntos de monócitos, os cMo são os mais abundantes na circulação e participam ativamente da resposta contra patógenos, com papel pró-inflamatório e alta capacidade de migração transendotelial. Os ncMo, por sua vez, são especializados em fagocitose mediada por complemento e FcR, migração transendotelial e respostas antivirais. De forma geral, os ncMo têm menos funções inflamatórias, como a remoção de restos celulares e reparo endotelial durante a homeostase (VANDERBEKE et al., 2021. WEN et al., 2020). Outros estudos também avaliaram o compartimento monocítico no SP de pacientes com COVID-19 e relataram um aumento de cMo e uma redução de ncMo, o que se demonstrou altamente relacionado com formas mais graves da doença (KNOLL; SCHULTZE; SCHULTE-SCHREPPING, 2021; LEE et al., 2020; ZHANG B. et al., 2020). Além disso, esses estudos sugeriram que os cMo mostram sinais de ativação na circulação (KNOLL; SCHULTZE; SCHULTE-SCHREPPING, 2021; LEE et al., 2020; WILK et al., 2020). No entanto, um estudo transcriptômico realizado no SP de pacientes com COVID-19 relatou que a principal fonte de produção de citocinas não parece ser originada de células presentes na circulação, devido à baixa expressão desses genes no SP, mas sim de células epiteliais, monócitos e macrófagos em estado migratório para os pulmões (BENLYAMANI et al., 2020).

Uma das razões pelas quais os monócitos são considerados APCs profissionais é a expressão de MHC-II na sua superfície (KAPELLOS et al., 2019). Assim, além de avaliar a frequência de monócitos e seus subtipos em pacientes com COVID-19, nosso estudo também avaliou a expressão de HLA-DR (MHC-II) na superfície dessas células (Figura 13 e Tabela 3). Entre os grupos de pacientes com COVID-19, em pacientes com quadro clínico leve, foram observados altos valores de expressão de HLA-DR nos monócitos. Esses valores diminuíram em pacientes moderados ($P = 0,030$) e reduziram ainda mais significativamente em pacientes críticos ($P < 0,001$). Em comparação com os controles, pacientes graves e críticos mostraram uma redução significativa na expressão de HLA-DR em monócitos ($P < 0,001$). Em relação aos subtipos de monócitos, resultados semelhantes foram observados, com aumento da expressão de HLA-DR em cMo, iMo e ncMo de pacientes leves quando comparados a pacientes graves e críticos, que apresentaram redução significativa na expressão dessa proteína ($P < 0,001$). Essa redução ocorreu principalmente em cMo, o que levou ao aumento da relação HLA-DR TiMas/cMo em pacientes moderados a críticos ($P < 0,001$).

Figura 13 - Expressão de HLA-DR em monócitos do SP de pacientes com COVID-19.



As cores no mapa de calor representam a mediana da IFM de HLA-DR nos monócitos, que varia de azul escuro para menor expressão, a amarelo para maior expressão. IFM: imunofluorescência média; cMo: monócitos clássicos; iMo: monócitos intermediários; ncMo: monócitos não clássicos; TiMas: macrófagos tissulares (iMo + ncMo).

Tabela 3 - Expressão de HLA-DR na superfície de monócitos.

Variável	Controle	Leve	Moderado	Grave	Crítico	P
HLA-DR Monócitos (IFM)	10.137,13 (3.099,94 – 27.788,00) a, b	13.430,71 (3.296,89 – 61.158,30) a	7.834,26 (2.566,30 – 2.1453,32) b, c	4.624,53 (1.205,99 – 16.104,05) c, d	3.448,52 (800,93 – 12.059,95) d	<0,001
HLA-DR cMo (IFM)	9.852,00 (2.701,23 – 18.734,22) a, b	12.843,70 (3.073,18 – 54.038,00) a	6.727,81 (2.406,28 – 20.213,15) b, c	4.017,48 (1.028,70 – 13.844,52) c, d	3.017,52 (776,03 – 10.545,47) d	<0,001
HLA-DR iMo (IFM)	20.547,49 (4.095,82 – 42.651,44) a, b	26.011,35 (4.722,27 – 128.723,13) a	20.972,72 (5.025,08 – 41.716,97) a, b	12.319,16 (3.096,65 – 55.557,77) b, c	9.131,65 (1.190,56 – 43.963,02) c	<0,001
HLA-DR ncMo (IFM)	13.054,77 (5.597,31 – 29.060,58) a	15.649,56 (3.521,43 – 91.910,08) a	14.847,65 (3.697,07 – 40.548,87) a	7.980,51 (14.24,24 – 29.335,06) b	7.016,01 (7.016,01 – 28.984,43) b	<0,001
HLA-DR TiMas (IFM)	15.824,14 (6.289,47 – 29.529,78) a, b	22.128,84 (4.363,37 – 109.464,50) a	20.583,81 (5.025,08 – 39.684,46) a, b	12.041,37 (2.937,77 – 54.376,65) b	8.890,53 (1.190,56 – 41.129,34) c	<0,001
HLA-DR iMo/cMo (razão)	2,12 (0,71 - 3,76) a, b	2,00 (1,13 - 4,55) a	3,02 (0,81 - 7,99) c	3,30 (1,33 - 12,05) c	3,28 (0,92 - 12,34) b, c	<0,001
HLA-DR ncMo/cMo (razão)	1,44 (0,91 - 2,53)	1,29 (0,69 - 3,73)	1,92 (0,00 - 5,21)	1,37 (0,00 - 7,09)	1,71 (0,00 - 9,24)	0,409

(continuação)

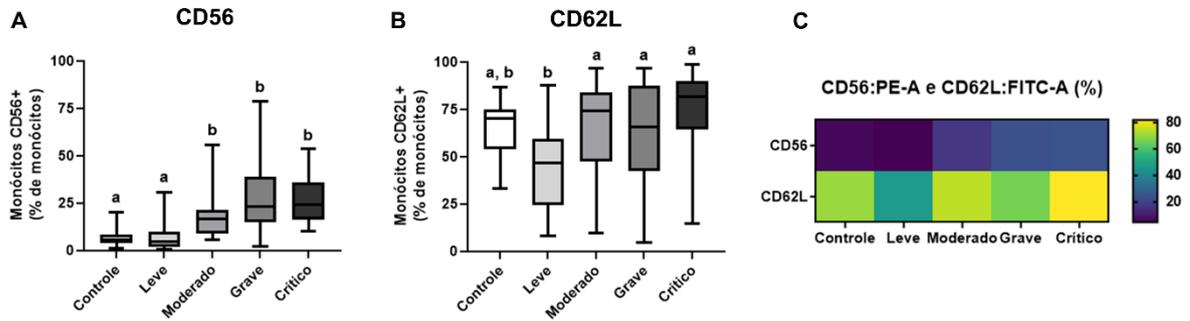
HLA-DR TiMas/cMo (razão)	1,67 (1,07 - 2,78) a	1,75 (1,07 - 4,35) a	2,88 (0,82 - 7,55) b	3,15 (1,22 - 12,05) b	3,11 (0,91 - 11,90) b	<0,001
--------------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------	--------------------------	--------------------------	--------

Os resultados estão expressos em mediana (intervalo). As variáveis foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). cMo: monócitos clássicos; iMo: monócitos intermediários; ncMo: monócitos não clássicos; TiMas: macrófagos tissulares (iMo + ncMo); IFM: imunofluorescência média.

A redução intensa na expressão de HLA-DR em pacientes com COVID-19, especialmente nos casos graves e críticos, indica susceptibilidade a imunossupressão nesses pacientes. Essa redução de HLA-DR ocorreu principalmente no cMo, o que levou ao aumento da relação TiMas/cMo. Assim, apesar de estarem aumentados em quantidade no compartimento monocítico, os cMo não estão desempenhando uma de suas funções primárias, que é a apresentação de antígenos às células Th (KAPELLOS et al., 2019). Os monócitos são células extremamente plásticas e podem exercer atividades pró e anti-inflamatórias. O resultado dessas duas forças se reflete no nível de expressão de HLA-DR na superfície dessas células, o que torna a expressão de HLA-DR em monócitos circulantes (mHLA-DR) um marcador de imunossupressão induzida por sepse (WACK, 2021; ZHOU; YE, 2021). Estudos revelaram que a perda de mHLA-DR também é acompanhada por uma redução de ncMo em pacientes com COVID-19 grave ou crítico, o que correlaciona esse marcador com a gravidade da doença (DENG et al., 2020; PADGETT et al., 2020).

A expressão das moléculas de adesão CD56 e CD62L em monócitos também foi avaliada (Figura 14A-C). Em pacientes com COVID-19, de quadro moderado a crítico, foi observado um aumento na expressão de CD56 quando comparados com os pacientes leves e do grupo controle (Figura 14A, $P < 0,001$). Em relação à expressão de CD62L nessas células, os pacientes leves apresentaram redução dessa molécula de adesão quando comparados aos grupos moderados a críticos (Figura 14B, $P < 0,001$). No entanto, nenhuma diferença foi observada entre os pacientes com COVID-19 e o grupo controle.

Figura 14 - Expressão de CD56 e CD62L em monócitos do SP de pacientes com COVID-19.



A expressão de CD56 (A) e CD62L (B) está representada pela porcentagem da população total de monócitos que expressam essas proteínas. As cores no mapa de calor (C) representam a mediana da porcentagem de expressão de CD56 e CD62L nos monócitos totais, que varia de azul escuro para menor expressão, a amarelo para maior expressão. As variáveis foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil. IFM: imunofluorescência média; cMo: monócitos clássicos; iMo: monócitos intermediários; ncMo: monócitos não clássicos.

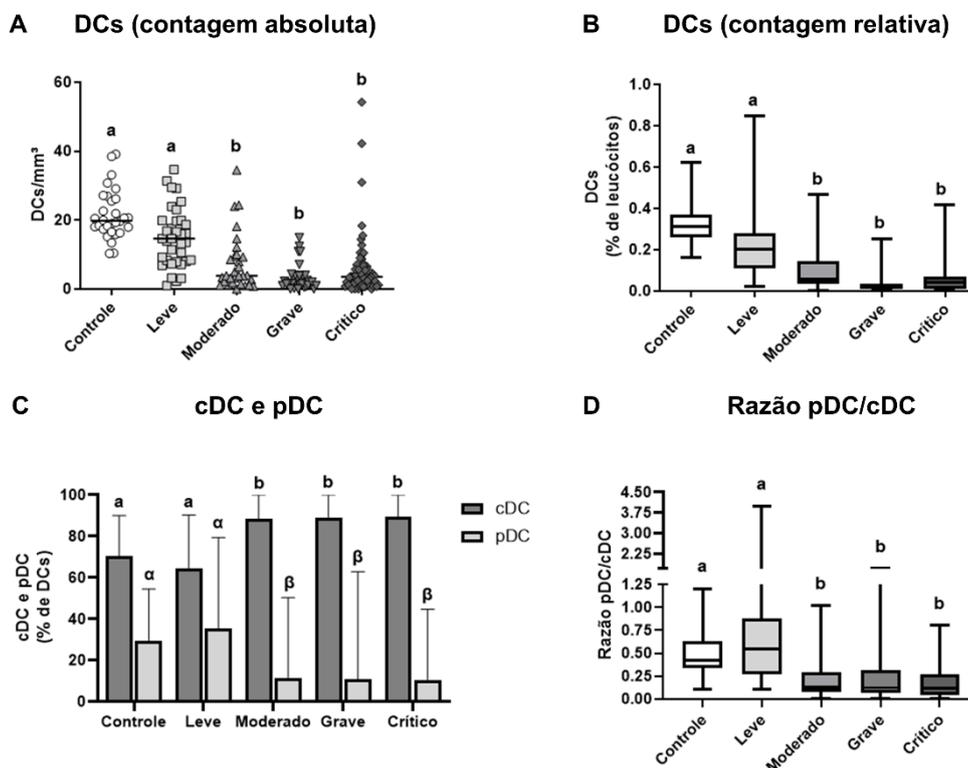
O CD56 é uma molécula de adesão, utilizada principalmente para a identificação de células NK, mas que também pode ser expressa em outras células do sistema imune, inclusive monócitos. Os monócitos CD56⁺ possuem uma alta capacidade fagocitária, com propriedades citotóxicas, e são encontrados em maior quantidade em diversas doenças infecciosas, autoimunes ou em neoplasias (VAN ACKER et al., 2017; MEHTA et al., 2020; MILUSH et al., 2009). Outros estudos também encontraram um aumento de monócitos CD56⁺ em pacientes com COVID-19, especialmente nos quadros mais graves da doença. Além disso, observaram que esses monócitos apresentam secreção ativa de IFN- γ , granzima B, TNF- α e IL-6, apesar de demonstrarem sinais de imunossupressão, como a redução de HLA-DR (CAMPANA et al., 2022; DUTT et al., 2022). Segundo Campana e colaboradores (2022), essas células também apresentam alta expressão de L-selectina (CD62L). Dessa forma, o aumento desses monócitos com expressão de CD56, está associado com a gravidade da COVID-19.

5.2.3 DCs

As células dendríticas também são consideradas APCs profissionais, além de seu importante papel na detecção de patógenos e na secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias (COLLIN; BIGLEY, 2018). Neste estudo, os pacientes com quadro clínico moderado a crítico apresentaram redução nos valores absolutos e relativos das DCs, quando comparados ao grupo

controle e pacientes leves ($P < 0,001$; Figura 15A-B). As DCs também foram subclassificadas em cDC e pDC, e sua relação com a gravidade da doença foi avaliada. Curiosamente, ao considerar apenas o compartimento de DCs, um aumento na porcentagem de cDC foi observado em pacientes com COVID-19 moderado a crítico ($P < 0,001$). Assim, também foi observada uma diminuição da quantidade de pDCs dentro do compartimento de DCs, o que levou à uma redução significativa na relação pDC/cDC nesses pacientes ($P < 0,001$).

Figura 15 - Alterações no compartimento de DCs no SP de pacientes com COVID-19.



(A, B) Valores absolutos e relativos de DCs. (C, D) Subtipos de DCs em pacientes com COVID-19. As variáveis foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil. DC: células dendríticas; pDC: células dendríticas plasmocitóides; cDC: células dendríticas clássicas/mielóides.

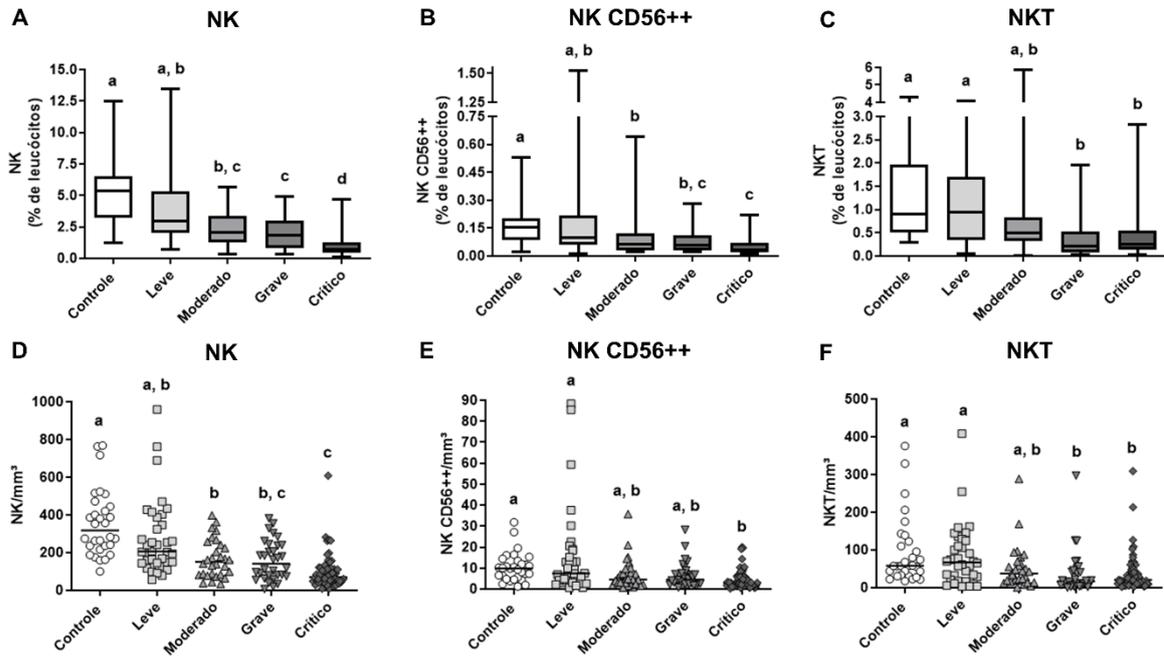
Essa redução também foi encontrada em outros estudos presentes na literatura (BENLYAMANI et al., 2020; WILK et al., 2020; ZHANG B. et al., 2020). Além disso, esses estudos também observaram nas DCs uma redução na expressão de genes sensores inatos em pacientes infectados com SARS-CoV-2 e de uma redução na expressão de genes relacionados

ao MHC-II. Além disso, um estudo *in vitro* observou que a exposição ao SARS-CoV-2 causou um aumento das vias pró-apoptóticas em pDCs (BENLYAMANI et al., 2020; SAICHI et al., 2021; WANG J. et al., 2020; WILK et al., 2020; ZHANG B. et al., 2020). Esses achados demonstram não apenas uma redução nas DCs, mas também uma função prejudicada dessas células em pacientes com COVID-19.

5.2.4 Células NK e NKT

Em relação às células NK, diversas alterações também foram encontradas. Foi observada uma redução significativa nos valores relativos de células NK (Figura 16A; $P < 0,001$) e NK CD56⁺⁺ (Figura 16B; $P = 0,003$) a partir dos pacientes com quadro clínico moderado, quando comparados aos pacientes do grupo controle. As células NKT também apresentaram redução na contagem relativa, mas a partir dos pacientes com quadro grave, quando comparadas ao grupo controle (Figura 16C; $P < 0,001$). Essas células também apresentaram redução na contagem absoluta, especialmente nos pacientes com quadro grave e crítico (Figura 16D-F). As células NK são linfócitos efetores inatos, com papel importante em infecções virais agudas. Outros estudos também relatam a redução de células NK e NK CD56⁺⁺ em pacientes com COVID-19 (CHEN et al., 2020; KURI-CERVANTES et al., 2020; QIN et al., 2020; VANDERBEKE et al., 2021; WILK et al., 2020). Além disso, esses estudos relatam que no SP de pacientes mais graves, essas células apresentam marcadores de exaustão e se demonstram ineficazes para cumprir seu papel citotóxico. Já nos pulmões, as células NK se encontram ativadas de forma anormal, contribuindo com a inflamação local (DEL TORO-ARREOLA et al., 2020; MAUCOURANT et al., 2020; WILK et al., 2020). Outros estudos ao redor do mundo também relatam a redução de células NKT, principalmente em casos mais graves de COVID-19, e descrevem que essas células apresentam aumento na expressão de marcadores pró-apoptóticos, além de receptores para a proteína S (CD26 e CD147) e alta capacidade de secreção de IFN- γ , IL-4 e IL-10 (KREUTMAIR et al., 2021; YANG et al., 2020; ZINGAROPOLI et al., 2021).

Figura 16 - Valores absolutos e relativos da contagem de células NK, NK56⁺⁺ e NKT.



Os valores relativos (A-C) e absolutos (D-F) das células NK, NK CD56⁺⁺ e NKT no SP de pacientes com COVID-19 e controles saudáveis foram obtidos via plataforma dupla. As linhas traçadas representam a mediana de cada grupo. As variáveis foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$).

5.2.5 Linfócitos T

Como demonstrado nas Figuras 9 e 10, os pacientes com COVID-19 apresentaram redução na contagem absoluta e relativa de linfócitos, principalmente nos casos mais graves da doença. Além disso, os linfócitos T também foram analisados de acordo com os subtipos T CD4⁺, T CD8⁺, T $\gamma\delta$ ⁺, T DP (CD4⁺CD8⁺) e T DN (CD4⁺CD8⁻). Conforme apresentado na Tabela 4, os pacientes com COVID-19 apresentam redução na contagem relativa e absoluta tanto de linfócitos T CD4⁺, quanto de linfócitos T CD8⁺. Quando comparado ao grupo controle, a redução de linfócitos T CD4⁺ ocorre de forma significativa a partir dos pacientes graves ($P < 0,001$), enquanto a redução de linfócitos T CD8⁺ já apresenta uma diferença significativa a partir dos pacientes com quadro clínico moderado ($P < 0,001$). Resultados semelhantes foram observados para os linfócitos T $\gamma\delta$ ⁺, T DP e T DN, que reduziram de forma significativa quando comparados ao grupo controle ($P < 0,001$). A razão CD4/CD8 apresentou aumento significativo quando comparados os pacientes críticos com os controles saudáveis ($P = 0,006$), o que

demonstra que no restante dos casos, a redução de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ocorre em proporções semelhantes.

Tabela 4 - Contagem relativa e absoluta das subpopulações de linfócitos T.

Variável	Controle	Leve	Moderado	Grave	Crítico	P
T CD4+ (% de leucócitos)	9,39 (4,15 – 19,55) a, b	12,51 (3,07 – 26,03) a	4,86 (0,82 – 20,74) b, c	2,68 (0,57 – 14,97) c, d	3,05(0,85 – 13,44) d	<0,001
T CD4+/mm ³	609,90 (341,96 – 1550,09) a, b	857,93 (240,69 – 1817,76) a	408,73 (97,99 – 1988,97) b, c	245,27 (18,41 – 929,64) c	286,56 (71,67 – 1578,44) c	<0,001
T CD8+ (% de leucócitos)	5,08 (2,36 – 13,65) a	6,76 (1,22 – 15,39) a	2,87 (0,48 – 10,91) b	1,36 (0,21 – 7,38) b, c	1,13 (0,05 – 7,18) c	<0,001
T CD8+/mm ³	334,52 (150,57 – 839,47) a	489,58 (95,64 – 1178,86) a	169,88 (29,46 – 979,16) b	99,22 (4,50 – 458,30) b	112,33 (4,54 – 842,93) b	<0,001
T γδ (% de leucócitos)	0,83 (0,07 – 2,66) a, b	0,45 (0,10 – 4,71) a	0,21 (0,03 – 0,99) b, c	0,12 (0,01 – 1,10) c	0,10 (0 – 3,19) c	<0,001
T γδ/mm ³	59,26 (4,06 – 153,48) a	30,09 (6,78 – 363,05) a	15,87 (1,45 – 90,09) b	10,33 (0,10 – 84,70) b	8,95 (0,77 – 104,63) b	<0,001
T DP (% de leucócitos)	0,11 (0,04 – 1,10) a	0,10 (0 – 0,41) a	0,04 (0,01 – 1,30) b	0,02 (0 – 0,13) b	0,03 (0 – 0,33) b	<0,001
T DP/mm ³	6,48 (2,50 – 71,06) a	6,86 (0 – 34,06) a	2,89 (0,48 – 198,25) b	2,54 (0 – 7,17) b	2,71 (0 – 41,82) b	<0,001
T DN (% de leucócitos)	0,11 (0,03 – 0,26) a, b	0,26 (0 – 2,77) a	0,05 (0,01 – 0,22) b, c	0,03 (0,01 – 0,18) c	0,04 (0,01 – 0,16) c	<0,001
T DN/mm ³	6,96 (1,97 – 17,32) a	18,43 (0 – 179,54) b	5,31 (1,00 – 18,20) a, c	2,85 (0,31 – 18,29) c	3,57 (0,76 – 20,41) c	<0,001
Razão CD4/CD8	1,69 (0,78 – 4,13) a	1,89 (0,73 – 4,56) a, b	1,97 (0,75 – 7,95) a, b	2,23 (0,70 – 7,59) a, b	2,22 (0,98 – 6,30) b	0,006

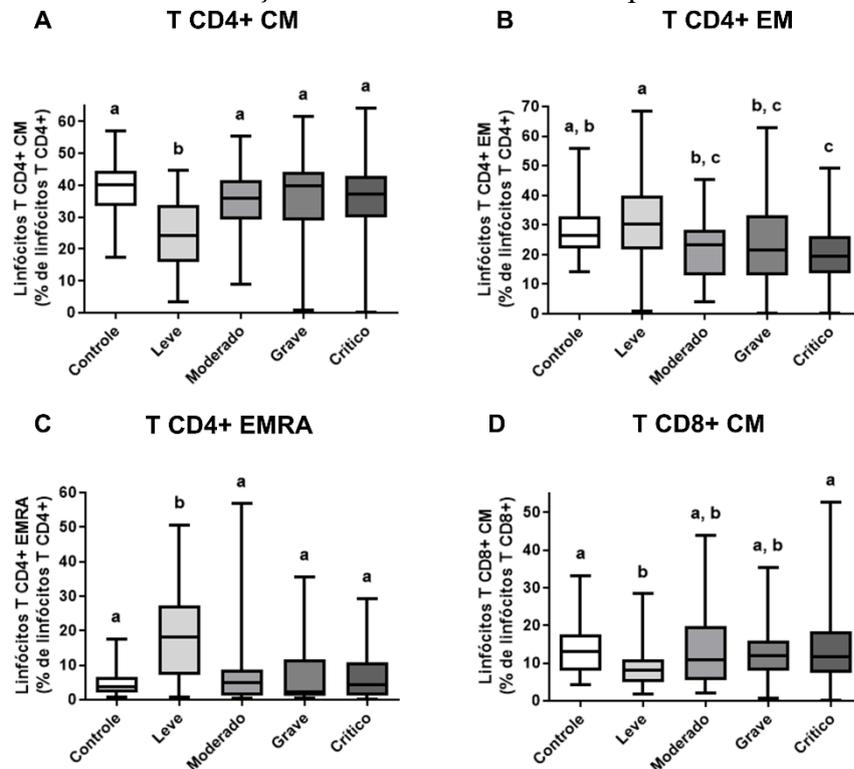
Os resultados estão expressos em mediana (intervalo). As variáveis foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). T CD4⁺: linfócitos T CD4⁺; T CD8⁺: linfócitos T CD8⁺; T DP: linfócitos T duplo-positivos (CD4⁺ CD8⁺); T DN: linfócitos T duplo-negativos (CD4⁻ CD8⁻); T γδ: linfócitos T TCR γδ⁺.

Outros estudos também relatam a redução de linfócitos T no SP dos pacientes com COVID-19, especialmente nos casos mais graves da doença. Essa redução ocorre em todos os subtipos linfocitários, mas alguns estudos sugerem que ocorra principalmente em linfócitos T CD8⁺, o que causa um aumento da razão CD4/CD8 nos pacientes graves. Isso contrasta com os achados típicos em pacientes com outras infecções respiratórias virais, como influenza e SARS, onde a linfocitopenia está presente, porém com razão CD4/CD8 diminuída (CHEN et al., 2020; DIAO et al., 2020; ODAK et al., 2020; QIN et al., 2020; VANDERBEKE et al., 2021; WANG J. et al., 2020). Diante disso, diversas hipóteses já foram levantadas para justificar a redução dos linfócitos nos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, como a migração dessas células para

sítios inflamatórios; aumento da apoptose dos linfócitos, devido ao aumento da via de sinalização P53 e Fas nessas células; e redução da proliferação celular (CHEN & WERRY, 2020; LAING et al., 2020; WANG J. et al., 2020). Além disso, os pacientes com COVID-19 apresentam aumento do cortisol sérico, que já havia sido sugerido como causa de linfopenia em pacientes com SARS, pois o tratamento com corticoesteroides também pode reduzir transitoriamente o número de linfócitos, enquanto aumenta os neutrófilos e monócitos na circulação periférica (AMIRI-DASHATAN et al., 2022; KALFAOGLU et al., 2021).

Neste estudo, os linfócitos T também foram avaliados de acordo com o seu grau de maturação, subdivididos em: linfócitos T naïve, CM, EM e EMRA. Em relação ao compartimento de linfócitos T CD4⁺, não houve alteração nos valores relativos das células T CD4⁺ naïve. Os pacientes com quadro clínico leve apresentaram aumento de linfócitos T CD4⁺ CM (Figura 17A; P < 0,001) e EMRA (Figura 17C; P < 0,001), quando comparados aos demais grupos avaliados. Já os pacientes com doença crítica, demonstraram redução apenas nos linfócitos T CD4⁺ EM, quando comparados ao controle (Figura 17B; P < 0,001). Quanto aos linfócitos T CD8⁺, foi observada nos pacientes leves uma redução dos linfócitos T CM, significativa quando comparada aos pacientes críticos e do grupo controle (Figura 17D; P = 0,012). Quando avaliados os valores absolutos dessas células (Apêndice E), foi observada uma redução de linfócitos T CD4⁺ naïve (P < 0,001) e EM (P < 0,001) nos pacientes com quadro clínico mais grave, e um aumento de linfócitos T CD4⁺ EMRA nos pacientes leves, quando comparados ao grupo controle (P < 0,001). Já em relação aos valores absolutos de linfócitos T CD8⁺, foi observada uma redução dos linfócitos naïve (P < 0,001), CM (P < 0,001) e EMRA (P < 0,001) nos pacientes com quadro clínico moderado a crítico.

Figura 17 - Grau de maturação de linfócitos T no SP de pacientes com COVID-19.

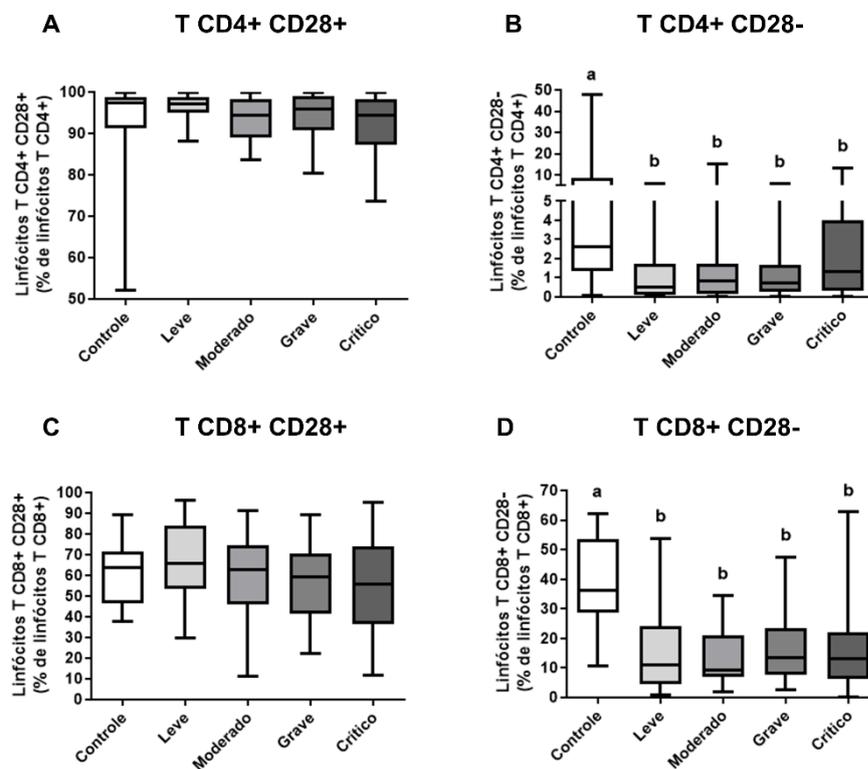


Valores relativos de linfócitos dentro do compartimento T CD4⁺ (A-C) e TCD8⁺ (D). As variáveis foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil. T CD4⁺ CM: linfócitos T CD4⁺ de memória central; T CD4⁺ EM: linfócitos T CD4⁺ efetores de memória; T CD4⁺ EMRA: linfócitos T CD4⁺ efetores terminais; T CD8⁺ CM: linfócitos T CD8⁺ de memória central.

A redução das células T CD4⁺ CM nos pacientes leves, ocorreu devido ao aumento de células T CD4⁺ EM e EMRA, e isso reflete o aumento da diferenciação e ativação dessas células nesses pacientes, que, no geral, possuem uma resposta imune mais efetiva. Apesar dos linfócitos T nos pacientes com COVID-19 apresentarem pouca ou nenhuma diferença quanto à sua diferenciação, os pacientes com quadro moderado a grave apresentaram redução absoluta dessas células. Apenas os pacientes com quadros leves parecem demonstrar uma mobilização/diferenciação efetiva de linfócitos T. Isso pode ocorrer devido à redução de HLA-DR em monócitos (Tabela 3), além da redução absoluta das demais APCs, o que prejudica a apresentação de antígenos às células T, etapa essencial para a sua diferenciação.

Além do grau de maturação, os linfócitos T também foram avaliados quanto à sua ativação, pelos marcadores CD28, CD57 e HLA-DR. O CD28 é um receptor co-estimulatório, expresso de forma constitutiva nos linfócitos T naïve, e responsável pela ativação de linfócitos T antígeno-mediada, bem como pela proliferação e sobrevivência das células T (MALY; SCHIRMER, 2015; MOU et al., 2014). Nos grupos avaliados, não houve diferença no valor relativo das células CD28⁺ dentro do compartimento T CD4⁺ e T CD8⁺ (Figura 18A e C). No entanto, foi observada uma redução significativa do valor absoluto dessas células, quando comparadas ao controle, principalmente nos pacientes com quadro grave e crítico (Apêndice F; $P < 0,001$).

Figura 18 - Alterações na ativação de linfócitos T no SP de pacientes com COVID-19.



Avaliação da expressão do marcador coestimulatório CD28 no compartimento de células T CD4⁺ (A-B) e T CD8⁺ (C-D) do SP de pacientes com COVID-19. As variáveis foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

Durante seu curso de ativação, algumas células T perdem a expressão da molécula CD28. Essas células T CD28⁻ são geralmente experientes em exposição antigênica e altamente

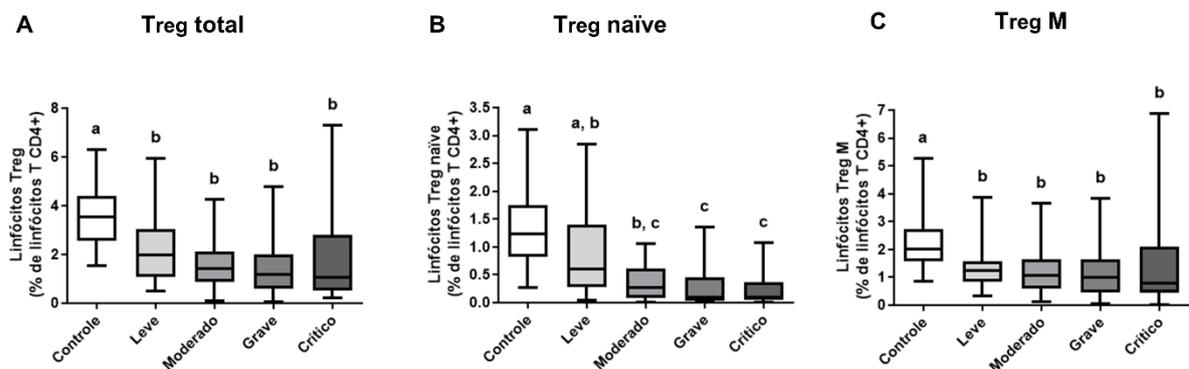
diferenciadas, no entanto, exibem diversidade reduzida de receptores antigênicos (TCR), proliferação defeituosa e um tempo de vida replicativa mais curto, ao mesmo tempo em que apresentam citotoxicidade e funções regulatórias aprimoradas. Em adultos jovens, cerca de 5% das células T CD4⁺ e 20-30% das células T CD8⁺ são CD28⁻. O aumento da porcentagem de células T CD28⁻ é observado em idosos, pacientes com doenças autoimunes e malignidades (MALY; SCHIRMER, 2015; MOU et al., 2014; WENG; AKBAR; GORONZY, 2009). Nos pacientes avaliados neste estudo, foi observada uma redução significativa de células CD28⁻ em todos os pacientes com COVID-19, de quadro leve a crítico, dentro do compartimento T CD4⁺ e T CD8⁺ (Figura 17B; D; P < 0,001). Essa redução também foi observada em valores absolutos (Apêndice F; P < 0,001). Os resultados apresentados se diferenciam dos demais estudos presentes na literatura, que demonstram um aumento de células T CD28⁻ em pacientes com COVID-19, em quadros graves e críticos, especialmente nos linfócitos T CD8⁺ (ANFT et al., 2020a; ANFT et al., 2020b; EKŞIOĞLU-DEMIRALP et al., 2021; QIN et al., 2020; RUPP et al., 2021; WANG F. et al., 2020). Além disso, nos linfócitos T, não foi observada alteração na expressão da molécula de ativação imune persistente, CD57, nem de HLA-DR, marcador de ativação tardia dessas células. Assim, enquanto os demais estudos na literatura demonstram que as células T dos pacientes com COVID-19 apresentam sinais de exaustão e estímulo antigênico persistente, neste estudo, os linfócitos T se apresentam menos ativados e com capacidade de reconhecimento antigênico.

Por fim, no compartimento de células T CD4⁺, foram avaliados também os linfócitos Treg. Nos pacientes com COVID-19 foi observada uma redução significativa no valor relativo de linfócitos Treg nos pacientes com quadro clínico leve a crítico, quando comparados ao controle (Figura 19A; P < 0,001). Em relação à contagem absoluta, a redução foi significativa a partir dos pacientes com quadro clínico moderado (Tabela 5; P < 0,001). Nos grupos avaliados, também foi observada uma redução significativa de linfócitos Treg naïve e Treg M, tanto em valores relativos ao compartimento de células T CD4⁺ (Figura 19B-C; P < 0,001), quanto em valores absolutos (Tabela 5; P < 0,001), principalmente em pacientes com doença moderada à crítica.

Os linfócitos Treg possuem um papel crucial na homeostase imunológica, pela inibição da ativação, proliferação e funções efetoras de diversas células do sistema imune (WANG et al., 2021). Os estudos com pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 possuem resultados discrepantes. Enquanto diversos artigos citam o aumento de linfócitos Treg nos pacientes com COVID-19, principalmente nos casos mais graves (DE BIASI et al., 2020; GALVÁN-PEÑA

et al., 2020; WANG W. et al., 2020), outros citam a redução dessas células (KALFAOGLU et al., 2020; MOHEBBI et al., 2020; QIN et al., 2020). Nesse sentido, em uma revisão sistemática conduzida por Rahimzadeh e Nader (2021), onde foram avaliados 18 estudos com células Treg em pacientes com COVID-19, foi observado que a tendência predominante é a diminuição das frequências de Treg no SP desses pacientes, o que ocorre de forma mais pronunciada nas células Treg naíve (RAHIMZADEH; NADER, 2021). A redução dessas células pode perturbar o equilíbrio entre as funções reguladoras e efetoras do sistema imune, o que ocasiona a expansão e ativação exacerbada de componentes da resposta imunológica, como os neutrófilos (OKEKE; UZONNA, 2019). A IL-6, que é encontrada em altas concentrações em pacientes com COVID-19, especialmente nos quadros mais graves, causa inibição seletiva de células Treg (KIMURA; KISHIMOTO, 2010). Assim, a redução dessas células nos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 pode contribuir para o estado hiperinflamatório, bem como para as lesões teciduais observadas nesses pacientes. Nesse contexto, estudos *in vivo* demonstraram que a transferência de células Treg à camundongos infectados por outros coronavírus gera uma resposta menos inflamatória, e que a lesão tecidual e mortalidade é superior nos animais com depleção de linfócitos Treg (ANGHELINA et al., 2009; TRANDEM et al., 2010). Além disso, um estudo conduzido por D'Alessio e colaboradores relevou que a infusão de células Treg em camundongos recupera a lesão pulmonar induzida por lipopolissacarídeo (LPS) (D'ALESSIO et al., 2009). Dessa forma, essas células podem se tornar alvo de tratamentos para COVID-19, principalmente em quadros graves.

Figura 19 - Frequências de células Treg no SP de pacientes com COVID-19.



Avaliação da frequência de células Treg totais (A), Treg naíve (B) e Treg M dentro do compartimento de linfócitos T CD4⁺. As variáveis foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro

quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil. Treg: linfócitos T CD4⁺ regulatórios; Treg M: linfócitos T CD4⁺ regulatórios de memória.

Tabela 5 - Valores absolutos de células Treg no SP de pacientes com COVID-19.

Variável	Controle	Leve	Moderado	Grave	Crítico	P
Treg total/mm ³	29,60 (10,84 - 80,98) a	14,25 (2,27 - 71,66) a	6,30 (0,43 - 32,15) b	2,47 (0,48 - 21,64) b	2,94 (0,43 - 90,50) b	<0,001
Treg naïve/mm ³	8,81 (2,52 - 21,54) a	4,97 (46,74 - 46,62) a	0,88 (0 - 13,29) b	0,20 (0,02 - 7,67) b	0,34 (0 - 6,31) b	<0,001
Treg M/mm ³	14,46 (5,47 - 67,63) a	9,43 (2,03 - 37,97) a, b	4,28 (0,43 b, c - 20,88)	2,06 (0,39 - 13,96) c	2,57 (0,06 - 85,53) c	<0,001

As variáveis foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). Treg: linfócitos T CD4⁺ regulatórios; Treg M: linfócitos T CD4⁺ regulatórios de memória.

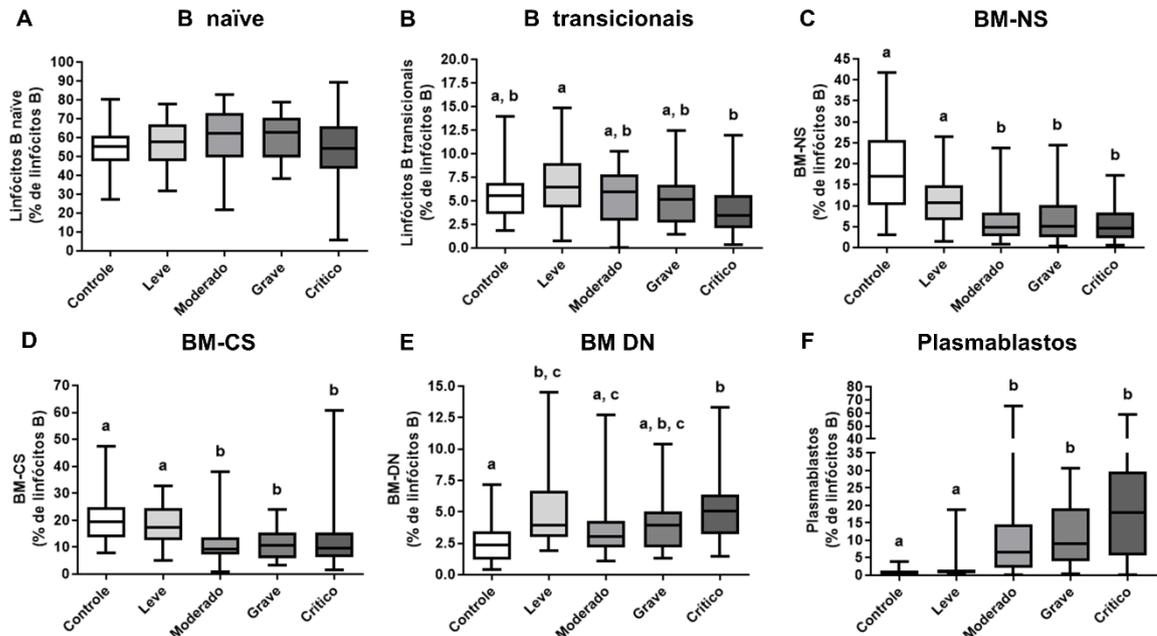
5.2.6 Linfócitos B

Após a infecção pelo SARS-CoV-2, as células B virgens ou células BM pré-existentes de exposições anteriores são ativadas via reconhecimento do antígeno e pela ajuda das células T CD4⁺. Assim, as células B entram em estado proliferativo e iniciam a troca de classe do seu receptor antigênico, até, por fim, formarem os plasmablastos e plasmócitos, que são células secretoras de anticorpos e geram a imunidade humoral (QUAST & TARLINTON, 2021).

Como observado anteriormente, na Figura 9, os pacientes com COVID-19 não apresentaram redução na contagem absoluta de linfócitos B, quando comparados ao grupo controle. No entanto, os pacientes leves apresentaram maior número de células B, quando comparados aos grupos grave e crítico. Assim, foi avaliado o compartimento dos linfócitos B e essas células foram subclassificadas em linfócitos B naïve, transicionais, BM-NS, BM-CS, BM DN e plasmablastos (Figura 20). Os pacientes com COVID-19 não apresentaram alteração nas frequências de células B naïve (Figura 20A). Em relação aos linfócitos B transicionais, foi observada uma redução apenas nos pacientes críticos, quando comparados com os pacientes leves (Figura 20B; $P = 0,002$). Observou-se também uma redução dos BM-NS (Figura 20C; $P < 0,001$) e BM-CS (Figura 20D; $P < 0,001$), nos pacientes com quadro moderado a crítico, quando comparados aos pacientes leves e grupo controle. As células BM DN apresentaram aumento nos pacientes leves e críticos, quando comparados com o controle ($P < 0,001$). Os plasmablastos também demonstraram aumento dentro do compartimento de células B, onde foi observado um aumento significativo nos quadros de moderado a crítico, comparado aos pacientes leves e grupo controle ($P < 0,001$). Resultados semelhantes foram observados para os

valores absolutos dessas células, onde foi observada uma redução de BM-NS ($P < 0,001$) e BM-CS ($P < 0,001$) e, também, aumento de plasmablastos ($P < 0,001$) nos pacientes com quadro moderado à crítico (Apêndice H).

Figura 20 - Alterações no compartimento de linfócitos B do SP de pacientes com COVID-19.



Avaliação da frequência de células B naïve (A), B transicionais (B), BM-NS (C), BM-CS (D), BM DN (E) e plasmablastos (F) dentro do compartimento de linfócitos B dos pacientes com COVID-19. As variáveis foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil. BM-NS: linfócitos B de memória *non-switched*; BM-CS: linfócitos B de memória *class-switched*; BM-DN: linfócitos B de memória duplo-negativos (CD27⁻ IgD⁻).

Diante do exposto, é possível observar que apesar da pequena alteração nos valores absolutos de células B totais, esse compartimento apresenta diversas alterações nos pacientes com COVID-19. Os resultados sobre o efeito da COVID-19 no compartimento de células B varia muito entre os estudos presentes na literatura, e abrangem desde o aumento até a redução das células citadas (KUDRYAVTSEV et al., 2022; LAING et al., 2020; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2021; SOSA-HERNÁNDEZ et al., 2020; WANG J. et al., 2020; WOODRUF et al., 2020). No presente estudo, para os pacientes avaliados, não foram observadas alterações em células B menos diferenciadas (naïve e transicionais), no entanto, as células BM-NS e BM-CS, se apresentaram reduzidas já nos pacientes moderados.

Apesar da grande variação nos estudos presentes na literatura, em relação ao compartimento de células B de pacientes com COVID-19, todos entram em consenso quanto ao aumento de plasmablastos, observado principalmente nos pacientes com manifestações mais graves da doença, mas já alterado em pacientes sem gravidade (HOEHN et al., 2021; LAING et al., 2020; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2021; SOSA-HERNÁNDEZ et al., 2020; WEN et al., 2020; WILK et al., 2020). Em alguns estudos, inclusive, os plasmablastos chegam a compreender cerca de 30% do compartimento dos linfócitos B (KANEKO et al., 2020; MATHEW et al., 2020). Como apresentado na Figura 20, neste estudo, os plasmablastos também apresentaram aumento já nos pacientes moderados, com aumento gradativo até quadro crítico, apesar de não apresentar diferença significativa entre os quadros clínicos moderado a crítico. Isso demonstra uma diferenciação rápida das células B, que após trocarem de classe se diferenciam em plasmablastos, o que segundo Shuwa et al., (2021) já pode ocorrer dentro de sete dias de hospitalização. Em conjunto com o aumento de células B DN nos pacientes com quadro crítico, essas observações reproduzem outros estudos citados na literatura, que propõem que o declínio das células B de memória pode ser resultado da ativação de células de memória pré-existentes, que se diferenciam em células de memória “atípica” (CD27-, DN) ou plasmablastos/plasmócitos (DE BIASI et al., 2020; KANEKO et al., 2020; MATHEW et al., 2020; OLIVIERO et al., 2020; SOSA-HERNÁNDEZ et al., 2020).

Nesse contexto, além de avaliar o compartimento de células B nos pacientes com COVID-19, também foi avaliada a produção de anticorpos IgM e IgG contra o SARS-CoV-2 (Tabela 6). Os resultados mostram que houve uma diferença entre os quadros clínicos quanto à produção de IgM ($P = 0.024$), mas não em relação à IgG. Aparentemente, os pacientes com quadros clínicos de moderado a crítico foram os que mais apresentaram IgM. Além disso, mesmo nos pacientes leves, ao menos 50% dos pacientes já apresentaram IgG. Esses achados, corroboram outros estudos presentes na literatura, que sugerem que a COVID-19 induz respostas de células B específicas e que o surgimento das respostas séricas de IgG ocorrem aproximadamente ao mesmo tempo que de IgM, geralmente nas primeiras duas semanas após o início dos sintomas, com tempo médio de 11 à 13 dias (BRAUN et al., 2020; GRIFONI et al., 2020; ROLTGEN & BOYD, 2021).

Tabela 6 - Anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgM e IgG no SP de pacientes com COVID-19.

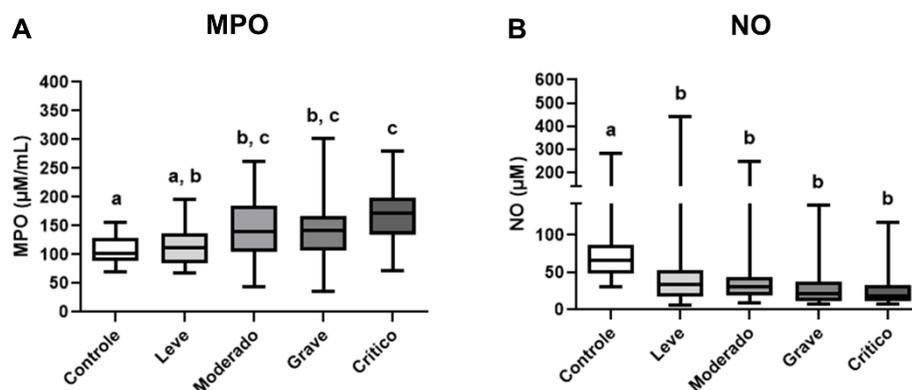
Variável	Todos (n = 133)	Leve (n = 36)	Moderado (n = 30)	Grave (n = 32)	Crítico (n = 35)	P
IgM						
Não reagente (%)	23,4	41,7	18,5	6,3	23,7	0,024
Reagente (%)	66,2	44,4	74,1	84,4	66,1	
Indeterminado (%)	10,4	13,9	7,4	9,4	10,2	
IgG						
Não reagente (%)	25,3	33,3	11,1	21,9	28,8	0,106
Reagente (%)	66,2	50,0	81,5	75,0	64,4	
Indeterminado (%)	8,4	16,7	7,4	3,2	6,8	

As variáveis foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado. IgM: imunoglobulina M; IgG: imunoglobulina G.

5.2.7 Citocinas, NO e MPO

As concentrações plasmáticas de citocinas, NO e MPO em pacientes infectados com SARS-CoV-2 e em controles saudáveis também foram avaliadas. Como esperado, os pacientes com COVID-19 tiveram um aumento da concentração de MPO em comparação com controles saudáveis e pacientes com condição moderada a crítica ($P < 0,001$; Figura 21A). Quando os grupos de pacientes com COVID-19 foram comparados entre si, aqueles em estado crítico diferiram apenas dos pacientes leves ($P < 0,001$). Em relação a concentração de NO, embora todos os pacientes com COVID-19 tenham apresentado redução da concentração de NO quando comparados ao grupo controle ($P < 0,001$ Figura 20B), não foi observada diferença entre os grupos infectados.

Figura 21 - Concentrações plasmáticas de MPO e NO em pacientes com COVID-19.



Concentrações de MPO (A) e NO (B) no plasma de pacientes com COVID-19. As variáveis foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e

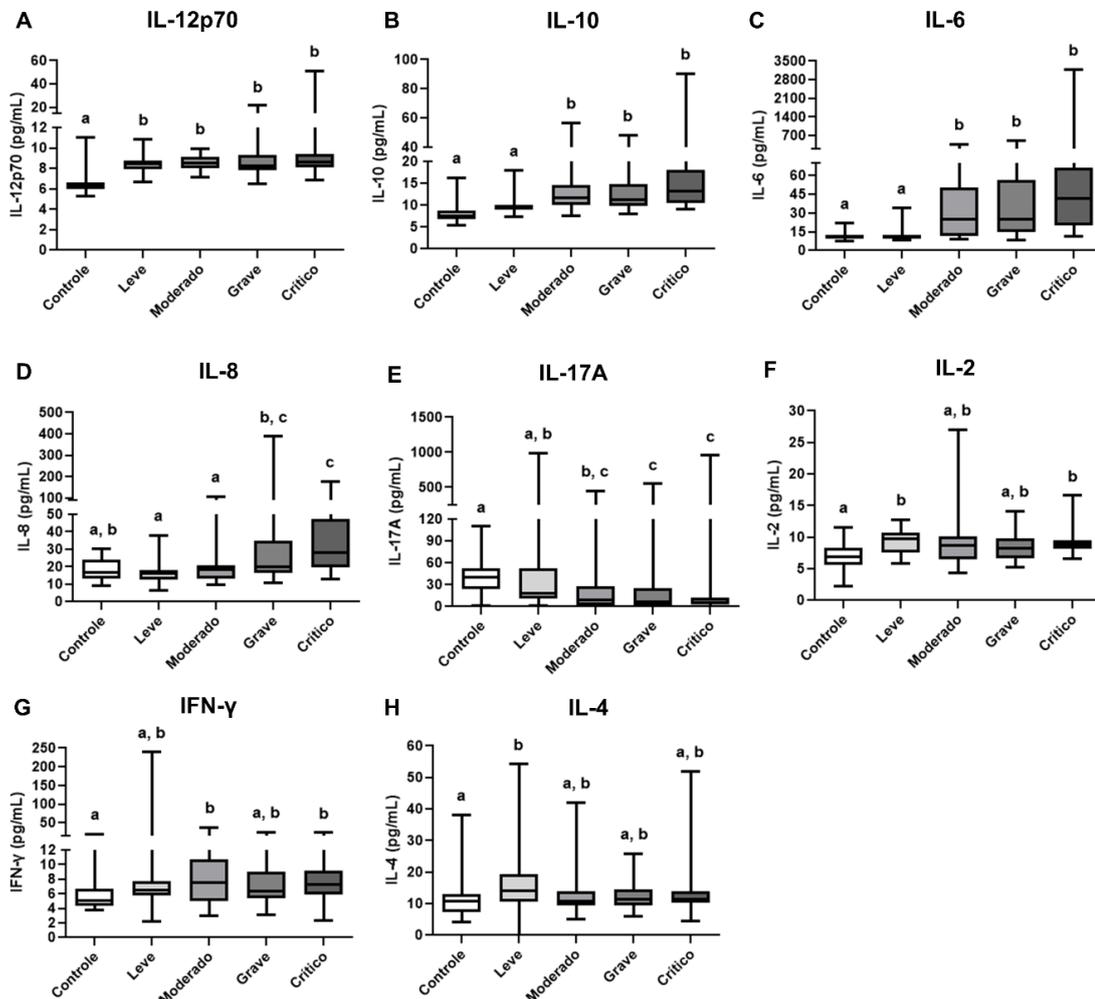
máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil. MPO: mieloperoxidase; NO: óxido nítrico.

Quando expostos a agentes infecciosos, os neutrófilos são capazes de liberar (intra ou extracelularmente) MPO dos grânulos azurófilos (BALE; DONEEN; VIGERUST, 2020; NAUSEEF, 2014). Depois de liberada, a MPO utiliza H_2O_2 para produzir HOCl, que possui alta capacidade viricida e compete com O_2 nos sítios de ligação do heme, o que diminui a saturação de O_2 . Além disso, a MPO contribui para a formação de várias outras espécies reativas de oxigênio (EROs) e consome NO para a formação do radical peroxinitrito (ONOO•), o que contribui para a “explosão respiratória” e aumento da inflamação (GOUD; BAI; ABU-SOUD, 2021; MAITRA et al., 2013). Neste estudo, juntamente com o aumento da MPO, os pacientes com COVID-19 apresentaram redução do NO. Uma hipótese para a redução da concentração de NO em pacientes com COVID-19 é o consumo de NO para a geração de EROs, que, uma vez produzidos, reduzem ainda mais a concentração de NO (FANG et al., 2003; GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003). Outra hipótese é a redução da expressão de ECA2 após as células serem infectadas pelo SARS-CoV-2, o que reduz a produção de NO via SRAA (BANU et al., 2020; BOSCA et al., 2005). A redução de NO favorece os eventos trombóticos, devido à sua importância como vasodilatador e anticoagulante (ALVAREZ; BERRA; GLADWIN, 2020; BALE; DONEEN; VIGERUST, 2020; FANG et al., 2021). Outros estudos também encontraram redução do NO plasmático em pacientes com COVID-19, mas com aumento do NO em pacientes críticos e com atividade reduzida da enzima MPO (ALAMDARI et al., 2020; ARINOLA; EDEM; ALONGE, 2021).

A concentração plasmática de citocinas também apresentou alterações significativas em pacientes com COVID-19 (Figura 22). A avaliação da concentração de IL-12p70 demonstrou um aumento dessa citocina quando os pacientes infectados por SARS-CoV-2 foram comparados com o grupo controle (Figura 22A; $P < 0,001$), mas não houve diferença associada à gravidade da doença. Em relação a concentração de IL-10 e IL-6, não houve diferença entre pacientes com COVID-19 leve e controles, mas um aumento significativo foi observado em pacientes com doença moderada a crítica (Figura 22 B-C; $P < 0,001$). A IL-8 também apresentou um aumento nos pacientes com COVID-19, mas apenas os pacientes do grupo crítico diferiram significativamente dos controles (Figura 22D; $P < 0,001$). A concentração da IL-17A mostrou-se reduzida em pacientes com COVID-19, especialmente em pacientes dos grupos graves e críticos, quando comparados ao grupo controle (Figura 22E; $P < 0,001$). Um

aumento de IL-2 nos pacientes leves e críticos, quando comparados ao grupo controle, também foi observado (Figura 22F; $P < 0,001$). As concentrações de IFN- γ foram variáveis em relação aos grupos e mostraram-se aumentadas em pacientes com COVID-19 moderado e crítico, quando comparados ao grupo controle (Figura 22G; $P < 0,002$). Por fim, em relação a IL-4, os pacientes leves apresentaram concentrações aumentadas dessa IL quando comparados aos controles (Figura 22H; $P < 0,001$), mas os demais grupos não apresentaram diferença significativa. As concentrações de TNF- α e IL-1 β não apresentaram alterações significativas. Informações completas sobre as concentrações de MPO, NO e citocinas estão apresentadas no Apêndice J.

Figura 22 - Concentrações plasmáticas de citocinas em pacientes com COVID-19.



Concentrações de citocinas no plasma de pacientes com COVID-19. As variáveis foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base

da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil. IL: interleucina; IFN: interferon.

Uma das citocinas mais relacionadas a um pior prognóstico em pacientes com COVID-19 é a IL-6, que, assim como em outros estudos, se apresentou aumentada na maioria dos pacientes, especialmente naqueles com doença mais grave (HUANG et al., 2020; MEHTA et al., 2020; VANDERBEKE et al., 2021). Isso gera uma resposta pró-inflamatória sistêmica, pois a IL-6 está envolvida em vários mecanismos, como na resposta de fase aguda, na inflamação, na proliferação de células B e T, na hematopoese e na quimiotaxia de neutrófilos (COVARRUBIAS; HORNG, 2017; ROSE-JOHN; WINKTHROP; CALABRESE, 2017). O aumento das concentrações de IL-6 está correlacionado com um aumento de IL-10, que também demonstrou estar aumentada em pacientes com COVID-19 moderado a crítico. Esse é um resultado interessante, visto que a IL-10 está frequentemente associada à imunossupressão e atividade anti-inflamatória. No entanto, a IL-10 também pode ser uma citocina imunoativadora e pró-inflamatória (ISLAM et al., 2021; LU et al., 2021), o que significa que, em pacientes com COVID-19, a IL-10 pode falhar em suprimir a inflamação ou agir de maneira pró-inflamatória (ANTONIV; IVASHKIV, 2006; ISLAM et al., 2021; JI et al., 2003; LU et al., 2021; NEIDHART et al., 2005). Além disso, em nosso estudo, não foram encontradas alterações nas concentrações de IFN- γ entre pacientes com COVID-19. O IFN- γ é um fator chave para a apresentação de antígenos via MHC-II, e está fortemente aumentado em outras condições de hipercitocinemia, como a síndrome de ativação de macrófagos (VANDERBEKE et al., 2021).

Este estudo também observou concentrações plasmáticas aumentadas de IL-8 em pacientes com quadro crítico. A IL-8 atua como quimioatraente e pode ativar monócitos, células T, neutrófilos e outras células imunes, além de seu papel na formação de NETs, que produz um fenótipo pró-trombótico (CHEN L. et al., 2020; KAISER et al., 2021). Portanto, vários estudos relataram a importância da IL-8 na síndrome de liberação de citocinas e encontraram uma associação dos níveis de IL-8 com a duração da doença (BORGES et al., 2020; MA et al., 2021). Todos esses achados corroboram estudos da literatura que constataram que essas citocinas estão aumentadas em pacientes com COVID-19 (HUANG et al., 2020; MEHTA et al., 2020; VANDERBEKE et al., 2021). Ao contrário de outros estudos, este estudo observou uma redução na IL-17A em pacientes com COVID-19 moderado a crítico. No entanto, segundo a literatura, o SARS-CoV-2 também parece estimular a produção de citocinas Th2 e suprimir a

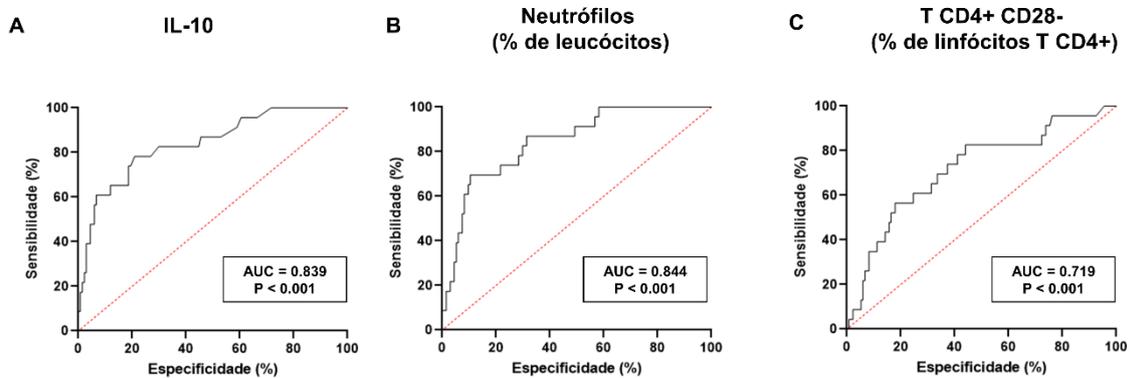
inflamação mediada por Th17 (MEHTA et al., 2020; MEGNA; NAPOLITANO; FABBROCINI, 2020).

5.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE ALTERAÇÕES NO SISTEMA IMUNE E MORTALIDADE

Depois de avaliadas as alterações no sistema imune periférico de pacientes com COVID-19, foi analisada a relação dessas alterações com o desfecho. Para isso, todos os parâmetros foram agrupados e comparados de acordo com o desfecho (óbito ou sobrevida) pelo teste U de Mann-Whitney. A comparação foi realizada individualmente para cada tubo, onde os parâmetros que apresentaram resultado significativo foram submetidos à uma regressão logística multivariada. Vinte e três pacientes (14,5%) morreram nos primeiros 30 dias após o diagnóstico. Diversos parâmetros apresentaram alteração significativa em relação ao desfecho, e os resultados para cada tubo avaliado, bem como para as citocinas, estão apresentados nos Apêndice K. No entanto, após submeter os parâmetros significativos à uma regressão logística multivariada, apenas três variáveis se apresentaram relacionadas ao desfecho: IL-10 ($P = 0,014$; *odds ratio* = 1,13, IC95% = 1,02–1,25), neutrófilos (% de leucócitos) ($P < 0,001$; *odds ratio* = 1,21; IC95% = 1,10–1,34) e linfócitos T CD4⁺ CD28⁻ CD57⁻ (% de linfócitos T CD4⁺) ($P = 0,03$; *odds ratio* = 1,19; IC95% = 1,02–1,40).

Assim, para avaliar a sensibilidade e especificidade desses parâmetros como biomarcadores prognósticos, foi realizada uma curva ROC (Figura 23). Os parâmetros IL-10 e neutrófilos (% de leucócitos) apresentaram uma área sob a curva (AUC) considerada boa (acima de 0,8; Figura 23A-B), enquanto o parâmetro linfócitos T CD4⁺ CD28⁻ CD57⁻ (% de linfócitos T CD4⁺) apresentou uma AUC considerada razoável (acima de 0,7; Figura 23C). O ponto de corte estabelecido para cada parâmetro, bem como a sua sensibilidade e especificidade estão representados na Tabela 7.

Figura 23 - Curva ROC dos parâmetros relacionados com a mortalidade em pacientes com COVID-19.



AUC: área sob a curva; ROC: característica de operação do receptor.

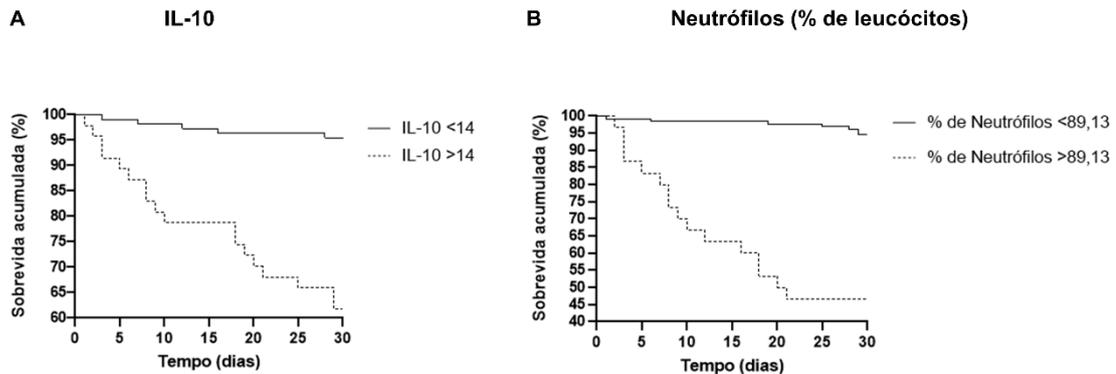
Tabela 7 – Ponto de corte, sensibilidade e especificidade dos parâmetros relacionados a mortalidade em pacientes com COVID-19.

Variável	Ponto de corte	Sensibilidade	Especificidade	P
IL-10	>14 pg/mL	78,3	79,1	<0,001
Neutrófilos (% de leucócitos)	>89,13 %	69,57	89,55	<0,001
T CD4+ CD28- (% de linfócitos T CD4+)	>2,25 %	56,52	82,09	<0,001

IL: interleucina

A partir do ponto de corte estabelecido, foi realizada a curva de Kaplan-Meier para mortalidade em 30 dias para os parâmetros que apresentaram AUC considerada boa. Assim, conforme apresentado na Figura 24A, ao avaliar a IL-10, a probabilidade de sobrevivência foi de $95,5 \pm 2,0\%$ em indivíduos com concentrações de IL-10 <14 pg/ml e $61,7 \pm 7,1\%$ naqueles com valores ≥ 14 pg/ml ($P < 0,001$). Ao avaliar o valor relativo de neutrófilos (Figura 24B) a probabilidade de sobrevivência foi de $94,5 \pm 2,0$ em indivíduos com valores relativos de neutrófilos (% de leucócitos) $<89,13\%$ e $46,7 \pm 9,1$ naqueles com valores $>89,13\%$ ($P < 0,001$).

Figura 24 - Sobrevida acumulada em 30 dias após o diagnóstico em pacientes com COVID-19.



(A) A probabilidade de sobrevivência de Kaplan-Meier foi de $95,5 \pm 2,0\%$ em indivíduos com níveis de IL-10 <14 pg/ml e $61,7 \pm 7,1\%$ naqueles com valores ≥ 14 pg/ml ($P < 0,001$). (B) A probabilidade de sobrevivência de Kaplan-Meier foi de $94,5 \pm 2,0$ em indivíduos com valores de neutrófilos (% de leucócitos) <89,13% e $46,7 \pm 9,1$ naqueles com valores >89,13% ($P < 0,001$). As diferenças foram testadas pelo teste de log-rank.

Outros estudos presentes na literatura também relacionam o aumento da contagem de neutrófilos com a mortalidade de pacientes com COVID-19, bem como outros parâmetros relacionados à essas células, como a RNL e formação de NETs, que estão relacionados com o agravamento da doença, internação em UTI e dano pulmonar (ALKHATIP et al., 2020; CAVALCANTE-SILVA et al., 2021; THOREAU et al., 2021). Além disso, Meizlish e colaboradores (2021) avaliaram o perfil proteômico de neutrófilos no SP de pacientes com COVID-19 e observaram que os pacientes que evoluíram para casos mais graves apresentavam neutrófilos superativados, com perfil fenotípico distinto, composto pela expressão do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), IL-8, resistina (RETN), lipocalina-2 (LCN-2) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF) (MEIZLISH et al., 2021). Essas proteínas, em conjunto, contribuem para o estímulo à síntese, degranulação e quimiotaxia de neutrófilos, o que contribui para o aumento da inflamação e se demonstraram úteis como biomarcadores para identificar pacientes críticos. Esses resultados destacam os neutrófilos como células ativas no agravamento dos pacientes com COVID-19.

De todas as citocinas avaliadas, a IL-10 foi a única relacionada com a mortalidade em pacientes com COVID-19 e se demonstrou elevada em pacientes com quadro moderado à crítico. Como citado anteriormente, a IL-10 é uma citocina multifuncional, classicamente designada como imunossupressora e que pode induzir anergia ou não responsividade das células T em infecções virais (MARIS; CHAPPELL; JACOB, 2007). No entanto, em determinadas

condições, como observado no microambiente séptico, pode agir como imunoestimulante (ANTONIV; IVASHKIV, 2006; DHAR et al., 2021; ISLAM et al., 2021; JI et al., 2003; LU et al., 2021; NEIDHART et al., 2005). Dessa forma, Lu et al. (2021) sugerem que nos estágios iniciais da doença, essa citocina atua de forma anti-inflamatória (*feedback* negativo), mas que, com a progressão da doença, a concentração endógena de IL-10 aumenta, e destaca seu aspecto pró-inflamatório, o que contribui com a hipercitocinemia (LU et al., 2021). Dessa forma, alguns estudos na literatura já correlacionam a IL-10 como um possível marcador de prognóstico para pacientes com COVID-19 (DHAR et al., 2021; ELSHAZLI et al., 2020; MCELVANEY et al., 2020; WALTER et al., 2020). Um estudo conduzido por Dhar et al. (2021) destacou a IL-6 e a IL-10 como biomarcadores de prognóstico para a doença, e, ao utilizar as duas citocinas como covariáveis observaram uma acurácia de 91,7% e AUROC de 0,957, superior à análise desses parâmetros de forma independente, com cerca de 100% de especificidade e 83,3% de sensibilidade para classificar os pacientes em quando grave (DHAR et al., 2021). Esses artigos corroboram os achados do presente estudo e sugerem que a IL-10 pode desempenhar um papel importante na fisiopatologia da doença, o que torna essa citocina um possível biomarcador prognóstico para pacientes com COVID-19.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados indicam que a COVID-19 altera o perfil imunológico do hospedeiro, que parece estar relacionado à fisiopatologia da doença. Os pacientes com COVID-19 apresentaram fenótipo pró-inflamatório, com neutrofilia, aumento de diversas citocinas pró-inflamatórias e MPO. Ao mesmo tempo, esses pacientes demonstram sinais de imunossupressão, como a redução da expressão de MHC-II e redução de APCs, o que prejudica a resposta imune adaptativa, como a ativação e diferenciação dos linfócitos T. Muitas alterações já começam a aparecer em pacientes com quadros moderados, o que evidencia a necessidade de acompanhamento de todos os pacientes, mesmo aqueles em estágios menos graves da doença. Os principais parâmetros relacionados ao óbito foram o aumento de IL-10 e da contagem relativa de neutrófilos. Uma melhor compreensão dos aspectos imunológicos da COVID-19 pode contribuir para a detecção precoce de condições mais graves e para o desenvolvimento de novas opções para o tratamento da doença.

7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Este estudo apresenta as seguintes limitações: os pacientes estavam em diferentes estágios da doença, uma vez que as amostras não foram coletadas com a mesma contagem de dias de doença; além disso, alguns pacientes, principalmente os internados, faziam uso de diversos medicamentos, o que pode afetar seu perfil imunológico e inflamatório.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliar as alterações no perfil imune de pacientes com COVID-19 após dois e seis meses do diagnóstico.

REFERÊNCIAS

- AARTS, C.E.M.; KUIJPERS, T.W. Neutrophils as myeloid-derived suppressor cells. **European Journal of Clinical Investigation**, v.48, n. 2, p. e12989, 2018.
- ABBAS, A. K. *et al.* **Cellular and Molecular Immunology**. 9th ed. Philadelphia: Elsevier, 2017.
- ACKERMANN, M. *et al.* Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. **The New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 2, p. 120-128, 2020.
- AHLERS, J. D.; BELYAKOV, I. M. Memories that last forever: strategies for optimizing vaccine T-cell memory. **Blood**, v. 115, n. 9, p. 1678-1689, 2010.
- AKASHI, K. *et al.* A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. **Nature**, v. 404, p. 193–197, 2000.
- ALAMDARI, D. H. *et al.* Application of methylene blue-vitamin C–N-acetyl cysteine for treatment of critically ill COVID-19 patients, report of a phase-I clinical trial. **European journal of pharmacology**, v. 885, p. 173494, 2020.
- ALKHATIP, A. A .A. M. M. *et al.* The diagnostic and prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 21, n. 5, p. 505-514, 2021.
- ALVAREZ, R. A.; BERRA, L. GLADWIN, M. T. Home nitric oxide therapy for COVID-19. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 202, n. 1, p. 16-20, 2020.
- AMIRI-DASHATAN, N. *et al.* Serum cortisol concentration and COVID-19 severity: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Investigative Medicine**, v. 70, n. 3, p. 766-772, 2022.
- ANFT, M. *et al.* COVID-19 progression is potentially driven by T cell immunopathogenesis. **Medrxiv**, 2020a.
- ANFT, M. *et al.* COVID-19-induced ARDS is associated with decreased frequency of activated memory/effector T cells expressing CD11a⁺⁺. **Molecular Therapy**, v. 28, n. 12, p. 2691-2702, 2020b.
- ANGHELINA, D. *et al.* Role of regulatory T cells in coronavirus-induced acute encephalitis. **Virology**, v. 385, n. 2, p. 358-367, 2009.
- ANTONIV, T. T.; IVASHKIV, L. B. Dysregulation of interleukin-10–dependent gene expression in rheumatoid arthritis synovial macrophages. **Arthritis & Rheumatism**, v. 54, n. 9, p. 2711-2721, 2006.
- ARINOLA, G.; EDEM, F.; ALONGE, T. Respiratory Burst Factors in Nigerian Patients with COVID-19. **Journal of Basic and Applied Research in Biomedicine**, v. 7, n. 1, p. 24-28, 2021.
- AUDITEAU, C. *et al.* D-dimer testing in clinical practice in the era of COVID-19. **Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis**, v. 6, n. 4, p. e12730, 2022.

AURON, M.; AGUILAR, M. P.; CAMERON, S. J. COVID-19 and Elevated D-Dimer: A Tale of Caution. **Journal of General Internal Medicine**, 2022.

BAGGEN, J. *et al.* Cellular host factors for SARS-CoV-2 infection. **Nature Microbiology**, v. 6, p. 1219–1232, 2021.

BALE, B. F.; DONEEN, A. L.; VIGERUST, D. J. Microvascular disease confers additional risk to COVID-19 infection. **Medical Hypotheses**, v. 144, p. 109999, 2020.

BANU, N. *et al.* Protective role of ACE2 and its downregulation in SARS-CoV-2 infection leading to Macrophage Activation Syndrome: Therapeutic implications. **Life sciences**, v. 256, p. 117905, 2020.

BAO, M.; LIU, Y. J. Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells. **Protein & Cell**, v. 4, p. 40-52, 2013.

BELGE, K. U. *et al.* The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. **The Journal of Immunology**, v. 168, p. 3536-3542, 2002.

BENLYAMANI, Ihsane *et al.* Monocyte HLA-DR measurement by flow cytometry in COVID-19 patients: an interim review. **Cytometry Part A**, v. 97, n. 12, p. 1217-1221, 2020.

BÉRANGÈRE, S. J; SIGURET, V; VEVRADIER, A. Understanding pathophysiology of hemostasis disorders in critically ill patients with COVID-19. **Intensive Care Medicine**, 2020;46(8):1603-1606.

BERKOWSKA, M. A.; DRIESSEN, G. J.; BIKOS, V.; GROSSERICHTER-WAGENER, C.; STAMATOPOULOS, K.; CERUTTI, A.; HE, B.; BIERMANN, K.; LANGE, J. F.; VAN DER BURG, M.; VAN DONGEN, J. J.; VAN ZELM, M. C. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. **Blood**, v. 118, n. 8, p. 2150-2158, 2011.

BERNARD, A.; LAMY AND, L.; ALBERTI, I. The two-signal model of T-cell activation after 30 years. **Transplantation**, v. 73, n. 1, Suppl, p. S31-35, 2002.

BEYERSTEDT, S.; CASARO, E. B.; RANGEL É. B. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 40, n. 5, p. 905-919, 2021

BHATTACHARYA, M. Understanding B Lymphocyte Development: A Long Way to Go. In: **Lymphocytes**. London: IntechOpen, 2018.

BLANCO, E. *et al.* Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. **J Allergy Clin Immunol**, v. 141, n. 6, p. 2208-2219, jun. 2018.

BORGES, L. *et al.* COVID-19 and neutrophils: the relationship between hyperinflammation and neutrophil extracellular traps. **Mediators of Inflammation**, v. 2020, 2020.

BOSCÁ, L. *et al.* Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. **Toxicology**, v. 208, n. 2, p. 249-258, 2005.

BOURGONJE, A. R. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **The Journal of Pathology**, v. 251, n. 3, p. 228-248, 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Painel de casos de doença pelo coronavírus 2019 (COVID-19) no Brasil pelo Ministério da Saúde**. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em: 18/07/2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coronavírus: Brasil confirma primeiro caso da doença. **UNASUS**, fev. 2020a. Disponível em: <https://www.unasus.gov.br/noticia/coronavirus-brasil-confirma-primeiro-caso-da-doenca#:~:text=O%20Minist%C3%A9rio%20da%20Sa%C3%BAde%20confirmou,para%20I t%C3%A1lia%2C%20regi%C3%A3o%20da%20Lombardia>. Acesso em: 04/07/2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes para diagnóstico e tratamento da COVID-19**. Versão 4. Brasília, DF: Ministério da saúde, 2020b. 98 p.

BRAUN, J. *et al.* SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. **Nature**, v. 587, n. 7833, p. 270-274, 2020.

BRINKMANN, V. Neutrophil extracellular traps in the second decade. **Journal of Innate Immunity**, v. 10, p. 414-421, 2018

BRIZZI, A. *et al.* Spatial and temporal fluctuations in COVID-19 fatality rates in Brazilian hospitals. **Nature Medicine**, online ahead of print, 2022.

BRODIN, P.; DAVIS, M. M. Human immune system variation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 1, p. 21-29, jan. 2017.

CAMPANA, Stefania *et al.* Cutting Edge: Hyperinflammatory Monocytes Expressing CD56 Abound in Severe COVID-19 Patients. **The Journal of Immunology**, online ahead of print, 2022.

CAO, X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, p. 269–70, 2020.

CARDOSO, C. C.; SANTOS-SILVA, M. C. Eight-color panel for immune phenotype monitoring by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 468, p. 40-48, 2019.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. *et al.* Neutrophils and COVID-19: The road so far. **International Immunopharmacology**, 2021.

CEVIK, M. *et al.* Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. **British Medical Journal**, v. 37, p. m3862, 2020.

CHEN, G. *et al.* Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 5, p. 2620–2629, 2020.

CHEN, L. *et al.* Scoring cytokine storm by the levels of MCP-3 and IL-8 accurately distinguished COVID-19 patients with high mortality. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-3, 2020.

CHEN, N. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **Lancet**, v. 395, p507–513 2020.

CHEN, W. *et al.* Plasma CRP level is positively associated with the severity of COVID-19. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 19, p. 18, 2020.

- CHEN, Z.; JOHN WHERRY, E. T cell responses in patients with COVID-19. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 9, p. 529-536, 2020.
- CHERIAN, S. *et al.* Evaluation of an 8-color flow cytometric reference method for white blood cell differential enumeration. **Cytometry B Clinical Cytometry**, v. 78, n. 5, p. 319-328, 2010.
- CHIRUMBOLO, S. State-of-the-art review about basophil research in immunology and allergy: is the time right to treat these cells with the respect they deserve?. **Blood Transfusion**, v.10, n. 2, p. 148-164, 2012.
- CHRISTIE, M. J. *et al.* Of bats and men: Immunomodulatory treatment options for COVID-19 guided by the immunopathology of SARS-CoV-2 infection. **Science Immunology**, v. 6, n. 63, 2021.
- CHUSID, M. J. Eosinophils: Friends or Foes? **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 6, n. 5, p. 1439-1444, 2018.
- CICERI, F. *et al.* Microvascular COVID-19 lung vessels obstructive thromboinflammatory syndrome (MicroCLOTS): An atypical acute respiratory distress syndrome working hypothesis. **Critical Care and Resuscitation Journal**, 2020.
- COLLIN, M.; BIGLEY, V. Human dendritic cell subsets: an update. **Immunology**, v. 154, n. 1, p. 3-20, 2018.
- COOPER, M. D. The early history of B cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 3, p. 191–197, 2015.
- COSTA-GARCIA, M. *et al.* Antibody-Mediated Response of NKG2C bright NK Cells against Human Cytomegalovirus . **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 6, 2015.
- COVARRUBIAS, A. J.; HORNG, T. IL-6 strikes a balance in metabolic inflammation. **Cell metabolism**, v. 19, n. 6, p. 898-899, 2014.
- CROS, J. *et al.* Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. **Immunity**, v. 33, p. 375-386, 2010.
- D’ALESSIO, F. R. *et al.* CD4+ CD25+ Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 10, p. 2898-2913, 2009.
- DAI, Y. *et al.* Association of CXCR6 with COVID-19 severity: delineating the host genetic factors in transcriptomic regulation. **Human Genetics**, v. 140, n. 9, p. 1313–1328, 2021.
- DAMASCENO, D. *et al.* Distribution of subsets of blood monocytic cells throughout life. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 144, n. 1, p. 320-323, 2019.
- DE BIASI, S. *et al.* Expansion of plasmablasts and loss of memory B cells in peripheral blood from COVID-19 patients with pneumonia. **European Journal of Immunology**, v. 50, n. 9, p. 1283-1294, 2020.
- DE BIASI, S. *et al.* Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2020.

DEL TORO-ARREOLA, S. *et al.* NK cells at the crossroads in COVID-19: a question of timing. **Ciencia, Tecnología y Salud**, v. 7, n. 3, p. 309-324, 2020.

DEL VALLE, D. M. *et al.* An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. **Nature Medicine**, v. 26, n. 10, p. 1636–1643, 2020.

DENG, Y. *et al.* Clinical characteristics of fatal and recovered cases of coronavirus disease 2019 in Wuhan, China: A retrospective study. **Chinese Medical Journal**, v. 133, n. 11, p. 1261–1267, 2020.

DENNISON, D. *et al.* Circulating activated neutrophils in COVID-19: An independent predictor for mechanical ventilation and death. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 106, p. 155–159, 2021.

DIAO, B. *et al.* Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 827, 2020.

DORWARD, D. A. *et al.* Tissue-specific Immunopathology in Fatal COVID-19. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 203, n. 2, p. 192-201, 2020.

DUDLEY, J. P.; LEE, N. T. Disparities in age-specific morbidity and mortality from sars-cov-2 in China and the republic of Korea. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 863–865, 2020.

DUTT, Taru S. *et al.* Comprehensive immune profiling reveals CD56+ monocytes and CD31+ endothelial cells are increased in severe COVID-19 disease. **The Journal of Immunology**, v. 208, n. 3, p. 685-696, 2022.

EKŞİOĞLU-DEMIRALP, E. *et al.* Peripheral innate and adaptive immune cells during COVID-19: Functional neutrophils, pro-inflammatory monocytes, and half-dead lymphocytes. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 102, n. 2, p. 153-167, 2022.

ELLMEIER, W.; HAUST, L.; TSCHISMAROV, R. Transcriptional control of CD4 and CD8 coreceptor expression during T cell development. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 23, p. 4537- 4553, 2013.

ELSHAZLI, R. M. *et al.* Diagnostic and prognostic value of hematological and immunological markers in COVID-19 infection: A meta-analysis of 6320 patients. **PloS one**, v. 15, n. 8, p. e0238160, 2020.

ESAKANDARI, H. *et al.* A comprehensive review of COVID-19 characteristics. **Biological Procedures Online**, v. 22, p. 19, 2020.

FANG, W. *et al.* The role of NO in COVID-19 and potential therapeutic strategies. **Free radical biology and medicine**, v. 163, p. 153-162, 2021.

FECTEAU, J. F.; CÔTÉ, G.; NÉRON, S. A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 6, p. 3728-3736, 2006.

- FERNANDES, Q. *et al.* Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. **Annals of Medicine**, v. 54, n. 1, p. 524-540, 2022.
- FERRARIO, C. M.; TRASK, A.J.; JESSUP, J. A. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1–7) in regulation of cardiovascular function. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, p. H2281–H2290, 2005.
- FONGARO, G. *et al.* The presence of SARS-CoV-2 RNA in human sewage in Santa Catarina, Brazil, November 2019. **The Science of the total environment**, v. 778, p. 146198, 2021.
- GABUTTI, G. *et al.* Coronavirus: Update Related to the Current Outbreak of COVID-19. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 9, n. 2, p. 241–253, 2020.
- GALVÁN-PEÑA, S. *et al.* Profound Treg perturbations correlate with COVID-19 severity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 37, p. e2111315118, 2021.
- GAZENDAM, R. P. *et al.* How neutrophils kill fungi. **Immunological Reviews**, v. 273, p. 299-311, 2016.
- EGINAT, J. *et al.* The CD4-centered universe of human T cell subsets. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 4, p. 252-262, 2013.
- GINHOUX, F.; JUNG, S. Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 392–404, 2014.
- GOUD, P. T.; BAI, D.; ABU-SOUD, H. M. A multiple-hit hypothesis involving reactive oxygen species and myeloperoxidase explains clinical deterioration and fatality in COVID-19. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 1, p. 62, 2021.
- GREEN, I. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.
- GRIFONI, A. *et al.* Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. **Cell**, v. 181, n. 7, p. 1489-1501. e15, 2020.
- GUAN, J. *et al.* Continuous tracking of COVID-19 patients' immune status. **International Immunopharmacology**, v. 89, p. 107034, 2020.
- GUILLIAMS, M. *et al.* Dendritic cells, monocytes and macrophages: A unified nomenclature based on ontogeny. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 571–578, 2014.
- GUPTA, A. *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, p. 1017–1032, 2020.
- GUZIK, T.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation. **J physiol pharmacol**, v. 54, n. 4, p. 469-487, 2003.
- HAMMER, Q.; RÜCKERT, T.; ROMAGNANI, C. Natural killer cell specificity for viral infections. **Nature Immunology**, v. 19, n. 8, p. 800–808, 2018b.

- HAMMING, I. *et al.* Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **Journal of Pathology**, v. 203, n. 2, p. 631-637, 2004.
- HASHIMOTO, D. *et al.* Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. **Immunity**, v. 38, p. 792–804, 2013.
- HEMALI, S. *et al.* Behind the scenes with basophils: an emerging therapeutic target. **Immunotherapy Advances**, v. 1, n. 1, 2021.
- HENRY, B. M. *et al.* Lactate dehydrogenase levels predict coronavirus disease 2019 (COVID-19) severity and mortality: A pooled analysis. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 38, n. 9, p. 1722–1726, 2020.
- HIROHITO, K. Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. **Immunological reviews**, v. 242, n. 1, p. 161-167, 2011
- HOEHN, K. B. *et al.* Cutting edge: distinct B cell repertoires characterize patients with mild and severe COVID-19. **The Journal of Immunology**, v. 206, n. 12, p. 2785-2790, 2021.
- HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271-280, 2020.
- HONG, S.; ZHANG, Z.; LIU, H.; TIAN, M., *et al.* B Cells Are the Dominant AntigenPresenting Cells that Activate Naive CD4. **Immunity**, v. 49, n. 4, p. 695-708, 2018.
- HU, B. *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141-154, 2021.
- HUANG, Chaolin *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.
- IMAI, Y. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. **Nature**, v. 436, p. 112–116, 2005.
- ISLAM, H. *et al.* Elevated interleukin-10 levels in COVID-19: potentiation of pro-inflammatory responses or impaired anti-inflammatory action?. **Frontiers in Immunology**, p. 2485, 2021.
- IVETIC, A.; GREEN, H. L. H.; HART, S. J. L-selectin: A major regulator of leukocyte adhesion, migration and signaling. **Frontiers in Immunology**, 2019.
- IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature Immunology**, v. 16, p. 343–353, 2015.
- JACKSON, C. B. *et al.* Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, p. 3–20, 2022.
- JACOFISKY, D. *et al.* Understanding Antibody Testing for COVID-19. **Journal of Arthroplasty**, 2020.
- JI, J-D. *et al.* Inhibition of interleukin 10 signaling after Fc receptor ligation and during rheumatoid arthritis. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 11, p. 1573-1583, 2003.

- KAISER, R. *et al.* Self-sustaining IL-8 loops drive a prothrombotic neutrophil phenotype in severe COVID-19. **Jci Insight**, v. 6, n. 18, 2021.
- KALFAOGLU, B. *et al.* T-cell hyperactivation and paralysis in severe COVID-19 infection revealed by single-cell analysis. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 589380, 2020.
- KANEKO, N. *et al.* Loss of Bcl-6-expressing T follicular helper cells and germinal centers in COVID-19. **Cell**, v. 183, n. 1, p. 143-157. e13, 2020.
- KAPELLOS, T. S *et al.* Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2035, 2019.
- KARED, H. *et al.* CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 65, n. 4, p. 441-452, 2016.
- KÄRRE, K. Natural killer cell recognition of missing self. **Nature Immunology**, v. 9, n. 5, p. 477–480, 2008.
- KIMURA, A.; KISHIMOTO, T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. **European journal of immunology**, v. 40, n. 7, p. 1830-1835, 2010.
- KLOK, F. A; KRUIP, M. J. H. A; VAN DER MEER, N. J. M; *et al.* Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. **Thrombosis Research**, 2020;191:145-147.
- KNOLL, Rainer; SCHULTZE, Joachim L.; SCHULTE-SCHREPPING, Jonas. Monocytes and Macrophages in COVID-19. **Frontiers in Immunology**, p. 2952, 2021.
- KOUWAKI, T. *et al.* RIG-I-Like Receptor-Mediated Recognition of Viral Genomic RNA of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 and Viral Escape from the Host Innate Immune Responses. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 700926, 2021.
- KREUTMAIR, S. *et al.* Distinct immunological signatures discriminate severe COVID-19 from non-SARS-CoV-2-driven critical pneumonia. **Immunity**, v. 54, n. 7, p. 1578-1593. e5, 2021.
- KUDRYAVTSEV, I. V. *et al.* Alterations in B cell and follicular T-helper cell subsets in patients with acute COVID-19 and COVID-19 convalescents. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 44, n. 1, p. 194-205, 2022.
- KUMAR, B. V.; CONNORS, T. J.; FARBER, D. L. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. **Immunity**, v. 48, n. 2, p. 202–213, 2018.
- KURI-CERVANTES, L. *et al.* Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. **Science immunology**, v. 5, n. 49, p. eabd7114, 2020.
- LAING, A. G. *et al.* A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. **Nature medicine**, v. 26, n. 10, p. 1623-1635, 2020.
- LAKE, M. A. What we know so far: COVID-19 current clinical knowledge and research. **Clinical Medicine journal**, v. 20, p. 124–127, 2020.
- LAMBERT, C.; SACK, U. Monocytes and macrophages in flow cytometry. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 92, n. 3, p. 178-179, 2017.

- LEBIEN, T. W.; TEDDER, T. F. B lymphocytes: How they develop and function. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1570–1580, 2008.
- LEE, J. *et al.* The MHC class II antigen presentation pathway in human monocytes differs by subset and is regulated by cytokines. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0183594, 2017.
- LEE, Jeong Seok *et al.* Immunophenotyping of COVID-19 and influenza highlights the role of type I interferons in development of severe COVID-19. **Science immunology**, v. 5, n. 49, p. eabd1554, 2020.
- LEISMAN, D. E. *et al.* Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 12, p. 1233–1244, 2020.
- LI, C. *et al.* Elevated Lactate Dehydrogenase (LDH) level as an independent risk factor for the severity and mortality of COVID-19. **Aging**, v. 12, n. 15, p. 15670–15681, 2020.
- LIEW, P. X.; KUBES, P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. **Physiol Rev**, v. 99, n. 2, p. 1223-1248, 2019.
- LIU, Y. *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. **Journal of Infection**, v. 81, n. 1, p. e6-12, 2020.
- LU, L. *et al.* A potential role of interleukin 10 in COVID-19 pathogenesis. **Trends in Immunology**, v. 42, n. 1, p. 3-5, 2021.
- LU, L. *et al.* A potential role of interleukin 10 in COVID-19 pathogenesis. **Trends in Immunology**, v. 42, n. 1, p. 3-5, 2021.
- MA, A. *et al.* High levels of circulating IL-8 and soluble IL-2R are associated with prolonged illness in patients with severe COVID-19. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 626235, 2021.
- MAITRA, D. *et al.* Myeloperoxidase acts as a source of free iron during steady-state catalysis by a feedback inhibitory pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 63, p. 90-98, 2013.
- MALY, K.; SCHIRMER, M. The story of CD4+ CD28– T cells revisited: solved or still ongoing?. **Journal of immunology research**, v. 2015, 2015.
- MANZ, M. G. *et al.* Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 99, p. 11872-11877, 2002.
- MARIS, H.; CHAPPELL, C. P.; JACOB, J. Interleukin-10 plays an early role in generating virus-specific T cell anergy. **BMC immunology**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2007.
- MARONE G, *et al.* Is There a Role for Basophils in Cancer?. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 2103, 2020.
- MARTÍN-SÁNCHEZ, E. *et al.* Immunological biomarkers of fatal COVID-19: A study of 868 patients. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 659018, 2021.

- MATHEW, D. *et al.* UPenn COVID Processing Unit (2020). Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. **Science**, v. 369, 2020.]
- MAUCOURANT, C. *et al.* Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. **Science immunology**, v. 5, n. 50, p. eabd6832, 2020.
- MAYI, B. S. *et al.* The role of Neuropilin-1 in COVID-19. **PLoS pathogens**, v. 17, n. 1, 2021.
- MCELVANEY, O. J. *et al.* A linear prognostic score based on the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts outcomes in COVID-19. **EBioMedicine**, v. 61, p. 103026, 2020.
- MDKHANA, B. *et al.* Nucleic acid-sensing pathways during sars-cov2 infection: Expectations versus reality. **Journal of Inflammation Research**, v. 14, p. 199–216, 2021.
- MEGNA, M.; NAPOLITANO, M.; FABBROCINI, G. May IL-17 have a role in COVID-19 infection?. **Medical hypotheses**, v. 140, p. 109749, 2020.
- MEHTA, P. *et al.* COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. **Lancet**, v. 395, p. 1033–1034, 2020.
- MEIZLISH, M. L. *et al.* A neutrophil activation signature predicts critical illness and mortality in COVID-19. **Blood advances**, v. 5, n. 5, p. 1164-1177, 2021.
- MERAD, M. *et al.* The immunology and immunopathology of COVID-19. **Science**, v. 375, n. 6585, p. 1122–1127, 2022.
- MESQUITA, D *et al.* Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n.5, p. 552-580, 2010.
- MILUSH, Jeffrey M. *et al.* Functionally distinct subsets of human NK cells and monocyte/DC-like cells identified by coexpression of CD56, CD7, and CD4. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 114, n. 23, p. 4823-4831, 2009.
- MIYARA, M. *et al.* Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. **Immunity**, v. 30, n. 6, p. 899-911, 2009.
- MOHEBBI, S. R. *et al.* Significant changes of CD4, FOXP3, CD25, and IL6 expression level in Iranian COVID-19 patients. **Gastroenterology and hepatology from bed to bench**, v. 13, n. 4, p. 388, 2020.
- MONTOYA, C. J. *et al.* Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. **Immunology**, v. 122, n. 1, p. 1- 14, 2007.
- MOSLEH, W. *et al.* Endotheliitis and Endothelial Dysfunction in Patients with COVID-19: Its Role in Thrombosis and Adverse Outcomes. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 6, p. 1862, 2020.
- MOSQUERA-SULBARAN, J. A. *et al.* C-reactive protein as an effector molecule in Covid-19 pathogenesis. **Reviews in Medical Virology**, 2021.

- MOU, D. *et al.* CD28 negative T cells: is their loss our gain?. **American Journal of Transplantation**, v. 14, n. 11, p. 2460-2466, 2014.
- NAUSEEF, W. M. Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. **Cellular Microbiology**, 2014.
- NEIDHART, M. *et al.* Deficient expression of interleukin-10 receptor α chain in rheumatoid arthritis synovium: Limitation of animal models of inflammation. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 52, n. 10, p. 3315-3318, 2005.
- NETEA, M. G. *et al.* Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. **Cell Host Microbe**, v. 25, n. 1, p. 13-26, 2019.
- O'TOOLE, Á. *et al.* Tracking the international spread of SARS-CoV-2 lineages B.1.1.7 and B.1.351/501Y-V2 with Grinch. **Wellcome Open Research**, v. 17, n. 6, p. 121, 2021.
- OBERMAYER, A. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps in Fatal COVID-19-Associated Lung Injury. **Disease Markers**, v. 2021, p. 5566826, 2021.
- ODAK, Ivan *et al.* Reappearance of effector T cells is associated with recovery from COVID-19. **EBioMedicine**, v. 57, p. 102885, 2020.
- OH, S. J.; SHIN, O. S. Sars-cov-2 nucleocapsid protein targets rig-i-like receptor pathways to inhibit the induction of interferon response. **Cells**, v. 10, n. 3, 2021.
- O'KEEFFE, M.; MOK, W. H.; RADFORD, K. J. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. **Cell Mol Life Sci**, v. 72, n. 22, p. 4309-4325, 2015.
- OKEKE, E. B.; UZONNA, J. E. The pivotal role of regulatory T cells in the regulation of innate immune cells. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 680, 2019.
- OLIVIERO, B. *et al.* Expansion of atypical memory B cells is a prominent feature of COVID-19. **Cellular & molecular immunology**, v. 17, n. 10, p. 1101-1103, 2020.
- PADGETT, Lindsey E. *et al.* Interplay of monocytes and T lymphocytes in COVID-19 severity. **bioRxiv**, 2020.
- PAIRO-CASTINEIRA, E. *et al.* Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. **Nature**, v. 591, n. 7848, p. 92–98, 2021.
- PANNONE, G. *et al.* Lung histopathological findings in COVID-19 disease - a systematic review. **Infectious Agents and Cancer**, v. 16, n. 1, p. 34, 2021.
- PARANJPE, I. *et al.* Clinical Characteristics of Hospitalized Covid-19 Patients in New York City. **medRxiv**, preprint, 2020.
- PATEL, A. A. *et al.* The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 7, p. 1913-1923, 2017.
- PATENTE, T. A. *et al.* Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3176, 2019.

- PELLICCI, D. G.; KOAY, H. F.; BERZINS, S. P. Thymic development of unconventional T cells: how NKT cells, MAIT cells and $\gamma\delta$ T cells emerge. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, p. 756-770, 2020.
- PERALBO, E.; ALONSO, C.; SOLANA, R. Invariant NKT and NKT-like lymphocytes: Two different T cell subsets that are differentially affected by ageing. **Experimental Gerontology**, v. 42, n. 8, p. 703-708, 2007.
- PEREZ-ANDRES, M.; PAIVA, B.; NIETO, W. G.; CARAUX, A.; SCHMITZ, A.; ALMEIDA, J.; VOGT, R. F., JR.; MARTI, G. E.; RAWSTRON, A. C.; VAN ZELM, M. C.; VAN DONGEN, J. J.; JOHNSEN, H. E.; KLEIN, B.; ORFAO, A. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 78 Suppl 1, n., p. S47-60, 2010.
- PIEPER, K.; GRIMBACHER, B.; EIBEL, H. B-cell biology and development. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 4, p. 959–971, 2013.
- POURBAGHERI-SIGAROODI, A. *et al.* Laboratory findings in COVID-19 diagnosis and prognosis. **Clinica Chimica Acta**, 2020.
- QIN, C. *et al.* Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 762–768, 2020.
- QUAST, I.; TARLINTON, D. B cell memory: understanding COVID-19. **Immunity**, v. 54, n. 2, p. 205-210, 2021.
- RAHIMZADEH, M.; NADERI, N. Toward an understanding of regulatory T cells in COVID-19: A systematic review. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 7, p. 4167-4181, 2021.
- RAHMAN, I. *et al.* L-selectin regulates human neutrophil transendothelial migration. **Journal of Cell Science**, v. 134, n. 3, 2021.
- RAMBAUT, A. *et al.* A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. **Nature Microbiology**, v. 5, p. 1403–1407, 2020.
- RAO, T. S.; CURRIE, J. L.; SHAFFER, A. F.; ISAKSON, P. C. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)-and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, p.723-741, 1993.
- REUSCH, N. *et al.* Neutrophils in COVID-19. **Frontiers in Immunology**, 2021.
- REVENFELD, A. L. *et al.* Presence of HLA-DR Molecules and HLA-DRB1 mRNA in Circulating CD4(+) T Cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 84, n. 4, p. 211-221, 2016.
- RIGONI, A.; COLOMBO, M. P.; PUCILLO, C. Mast cells, basophils and eosinophils: From allergy to cancer. **Seminars in Immunology**, v. 35, p. 29-34, 2018.
- RIOU, J.; ALTHAUS, C. L. Pattern of early human-to-human transmission of Wuhan 2019 novel coronavirus (2019-nCoV), December 2019 to January 2020. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 4, p. 2000058, 2020.
- RÖLTGEN, K.; BOYD, S. D. Antibody and B cell responses to SARS-CoV-2 infection and vaccination. **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 7, p. 1063-1075, 2021.

- ROSALES, C. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 108, n. 1, p. 377-396, 2020.
- ROSALES, C.; URIBE-QUEROL, E. Phagocytosis: a fundamental process in immunity. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 9042851, 2017.
- ROSE-JOHN, S.; WINTHROP, K.; CALABRESE, L. The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 7, p. 399-409, 2017.
- ROSENBERG, H. F. *et al.* Eosinophils: changing perspectives in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 1, p. 9-22, 2013
- RUPP, J. *et al.* T Cell phenotyping in individuals hospitalized with COVID-19. **The Journal of Immunology**, v. 206, n. 7, p. 1478-1482, 2021.
- SAICHI, M. *et al.* Single-cell RNA sequencing of blood antigen-presenting cells in severe COVID-19 reveals multi-process defects in antiviral immunity. **Nature Cell Biology**, v. 23, n. 5, p. 538-551, 2021.
- SAKAGUCHI, S. *et al.* Regulatory T cells and immune tolerance. **cell**, v. 133, n. 5, p. 775-787, 2008.
- SALLUSTO, F. *et al.* Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 251, p. 167-171, 2000.
- SALZER, U.; SACK, U.; FUCHS, I. Flow Cytometry in the Diagnosis and Follow Up of Human Primary Immunodeficiencies. **EJIFCC**, v. 30, n. 4, p. 407-422, 2019.
- SANCHIS-GOMAR, F. *et al.* Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Antihypertensives (Angiotensin Receptor Blockers and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors) in Coronavirus Disease 2019. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 95, n. 6, p. 1222-1230, 2020.
- SANTEGOETS, S. J. *et al.* Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 64, n. 10, p. 1271-1286, 2015.
- SCHIFFRIN, E. L. Immune mechanisms in hypertension and vascular injury. **Clinical Science**, v. 126, n. 4, p. 267-274, 2014.
- SCHMIDL, C. *et al.* Transcription and enhancer profiling in human monocyte subsets. **Blood**, v. 123, p. e90-e99, 2014.
- SCHOEMAN, D.; FIELDING, B.C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. **Virology Journal**, v. 16, n. 1, p. 69, 2019.
- SCHULTE-SCHREPPING, J. *et al.* Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. **Cell**, v. 182, n. 6, p. 1419-1440, 2020.
- SHERWOOD, G. Waldenstrom's **Macroglobulinemia - Basic Immunology. 2.ed.** Sarasota: International Waldenstrom's Macroglobulinemia Foundation (IWMF), 2018.
- SHIRATO, K.; KIZAKI, T. SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit induces pro-inflammatory responses via toll-like receptor 4 signaling in murine and human macrophages. **Heliyon**, v. 7, n. 2, p. e06187, 2021.

- SHUWA, H. A. *et al.* Alterations in T and B cell function persist in convalescent COVID-19 patients. **Med**, v. 2, n. 6, p. 720-735. e4, 2021
- SIDDIQI, H. K.; MEHRA, M. R. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical-therapeutic staging proposal. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 39, n. 5, p. 405-407, 2020.
- SILVIN, A. *et al.* Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. **Cell**, v. 182, n. 6, p. 1401–1418, 2020.
- SIMS, G. P.; ETTINGER, R.; SHIROTA, Y.; YARBORO, C. H., *et al.* Identification and characterization of circulating human transitional B cells. **Blood**, v. 105, n. 11, p. 4390-4398, 2005.
- SINGH, K. *et al.* A meta-analysis of SARS-CoV-2 patients identifies the combinatorial significance of D-dimer, C-reactive protein, lymphocyte, and neutrophil values as a predictor of disease severity. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 43, n. 2, p. 324–328, 2021.
- SINGHAL, T. A review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). **Indian Journal of Pediatrics**, v. 87, n. 4, p. 281-286, 2020.
- SMITH-GARVIN, J. E.; KORETZKY, G. A.; JORDAN, M. S. T cell activation. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 591–619, 2009.
- SOSA-HERNANDEZ, V. A. *et al.* B cell subsets as severity-associated signatures in COVID-19 patients. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 611004, 2020.
- SOUCIE, E. L. *et al.* Lineage-specific enhancers activate self-renewal genes in macrophages and embryonic stem cells. **Science**, v. 351, n. 6274, 2016.
- STRINGER, D. *et al.* The role of C-reactive protein as a prognostic marker in COVID-19. **International journal of epidemiology**, v. 50, n. 2, p. 420–429, 2021.
- STRIOGA, M.; PASUKONIENE, V.; CHARACIEJUS, D. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. **Immunology**, v. 134, n. 1, p. 17-32, 2011.
- SUN, L. *et al.* Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. **Redox Biology**, v. 37, p. 101759, 2020.
- SUNGNAK, W. *et al.* SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. **Nature Medicine**, v. 68, p. 681–687, 2020.
- SWIECKI, M.; COLONNA, M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, p. 471-485, 2015.
- TAEFEHSHOKR, N. *et al.* Covid-19: Perspectives on Innate Immune Evasion. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 580641, 2020.
- TAK, T. *et al.* Circulatory and maturation kinetics of human monocyte subsets in vivo. **Blood**, v. 130, n. 12, p. 1474-1477, 2017.

- TANG, N; LI, D; WANG, X; *et al.* Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2020;18(4):844-847.
- TEN-CATEN, F. *et al.* In-depth analysis of laboratory parameters reveals the interplay between sex, age, and systemic inflammation in individuals with COVID-19. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 105, p. 579–587, 2021.
- THOREAU, B. *et al.* D-dimer level and neutrophils count as predictive and prognostic factors of pulmonary embolism in severe non-ICU COVID-19 patients. **Viruses**, v. 13, n. 5, p. 758, 2021.
- TRANDEM, K. *et al.* Regulatory T cells inhibit T cell proliferation and decrease demyelination in mice chronically infected with a coronavirus. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 8, p. 4391-4400, 2010.
- UJIKE, M.; TAGUCHI, F. Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1700–1725, 2015.
- VAN ACKER, H. H. *et al.* CD56 in the immune system: More than a marker for cytotoxicity? **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 892, 2017
- VANDERBEKE, L. *et al.* Monocyte-driven atypical cytokine storm and aberrant neutrophil activation as key mediators of COVID-19 disease severity. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2021.
- VEGLIA, F.; SANSEVIERO, E.; GABRILOVICH, D. I. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, p. 485–498, 2021.
- VELAVAN, T. P. *et al.* Host genetic factors determining COVID-19 susceptibility and severity. **EBioMedicine**, v. 72, p. 103629, 2021.
- VELAVAN, TP.; MEYER, C. G. The COVID-19 epidemic. **Tropical Medicine & International Health**, v. 25, n. 3., p. 278–80, 2020.
- VERDECCHIA, P. *et al.* The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection. **European Journal of Internal Medicine**, v. 76, p. 14-20, 2020.
- VIGNALI, D. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 7, p. 523-532, 2008
- VOORS. A. A. *et al.* Dual pathway for angiotensin II formation in human internal mammary arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, p. 1028–1032, 1998.
- WACK, A. Monocyte and dendritic cell defects in COVID-19. **Nature cell biology**, v. 23, n. 5, p. 445-447, 2021.
- WALKER, P. J. *et al.* Changes to virus taxonomy and the International Code of virus classification and nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). **Archives of Virology**, v. 164, n. 9, p. 2417-2429, 2019.

- WALTER, L. O. *et al.* The relationship between peripheral immune response and disease severity in SARS-CoV-2-infected subjects: A cross-sectional study. **Immunology**, v. 165, n. 4, p. 481-496, 2022.
- WANG, F. *et al.* The laboratory tests and host immunity of COVID-19 patients with different severity of illness. **JCI insight**, v. 5, n. 10, 2020.
- WANG, J. *et al.* Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. **Journal of Leukocyte Biology**, 2020.
- WANG, W. *et al.* High-dimensional immune profiling by mass cytometry revealed immunosuppression and dysfunction of immunity in COVID-19 patients. **Cellular & molecular immunology**, v. 17, n. 6, p. 650-652, 2020.
- WANG, Y. *et al.* The role of CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells in the immunopathogenesis of COVID-19: implications for treatment. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 6, p. 1507, 2021.
- WEINBERG, I. *et al.* Systematic testing for venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19 and raised D-dimer levels. **Thrombosis Update**, v. 2, p. 100029, 2021.
- WEN, W. *et al.* Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing. **Cell discovery**, v. 6, n. 1, p. 1-18, 2020.
- WIERSINGA, W. J; RHODES, A; CHENG, A. C. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA**. 2020;324(8):782-793.
- WILK, A. J. *et al.* A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. **Nature medicine**, v. 26, n. 7, p. 1070-1076, 2020.
- WOLF, A. A *et al.* The Ontogeny of Monocyte Subsets. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1642, 2019.
- WONG, K. L. *et al.* Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. **Blood**, v. 118, p. e16-e31, 2011.
- WOODRUFF, M. C. *et al.* Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. **Nature immunology**, v. 21, n. 12, p. 1506-1516, 2020.
- WORBS, T.; HAMMERSCHMIDT, S. I.; FÖRSTER, Reinhold. Dendritic cell migration in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 1, p. 30-48, 2017.
- World Health Organization (WHO). **COVID-19 clinical management: living guidance**. 25 January 2021. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/338882>. Acesso em: 25 maio 2022.
- World Health Organization (WHO). **Tracking SARS-CoV-2 variants**. Disponível em: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. Acesso em: 25 maio 2022.
- World Health Organization (WHO). WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19. 11 March 2020. Disponível em: <https://www.who.int/director->

general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020. Acesso em: 02 novembro 2022.

WU, C. *et al.* Risk Factors Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients with Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA Internal Medicine**, v. 180, p. 934–43, 2020.

WU, Z.; MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. **JAMA**, v. 323, p. 1239–1242, 2020.

XIA, H. *et al.* Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. **Cell Reports**, v. 33, n. 1, p. 108234, 2020.

XU, Z; SHI, L; WANG, Y; *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **Lancet Respiratory Medicine**, 2020;8(4): 420-422

YANG, J. *et al.* Increased Expression of Tim-3 Is Associated With Depletion of NKT Cells In SARS-CoV-2 Infection. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 796682-796682, 2022.

YAO, X. H. *et al.* A pathological report of three COVID-19 cases by minimal invasive autopsies. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi**, v. 49, p. 411–417, 2020.

ZHANG, Bicheng *et al.* Immune phenotyping based on the neutrophil-to-lymphocyte ratio and IgG level predicts disease severity and outcome for patients with COVID-19. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 7, p. 157, 2020.

ZHANG, H. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. **Intensive Care Medicine**, v. 46, n. 4, p. 586-590, 2020.

ZHANG, Y. Z.; HOLMES, E. C. A genomic perspective on the origin and emergence of SARS-CoV-2. **Cell**, v. 181, p. 223–227, 2020.

ZHANG, Z. L. *et al.* Laboratory findings of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, 2020.

ZHENG, M. *et al.* TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. **Nature Immunology**, v. 22, n. 7, p. 829–838, 2021.

ZHOU, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, p. 270–273, 2020.

ZHOU, X.; YE, Q. Cellular immune response to COVID-19 and potential immune modulators. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 646333, 2021.

ZHU, J. *et al.* Clinicopathological characteristics of 8697 patients with COVID-19 in China: a meta-analysis. **Family Medicine and Community Health**, v. 8, n. 2, p. e000406, 2020.

ZHU, X.; ZHU, J. CD4 T helper cell subsets and related human immunological disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 8011, 2020.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v. 116, n. 16, p. e74-80, 2010

ZINDEL, J.; KUBES, P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. **Annual Review of Pathology**, v. 15, p. 493-518, 2020.

ZINGAROPOLI, M. A. *et al.* Major reduction of NKT cells in patients with severe COVID-19 pneumonia. **Clinical Immunology**, v. 222, p. 108630, 2021.

APÊNDICE A – Questionário aplicado para a coleta de dados dos pacientes

Resposta Imune Dos Pacientes Infectados Pelo Sars-Cov-2		
Dados de identificação e contato		
1. Nome:		
2. Número do prontuário:		
3. Data da avaliação: ____/____/____		
4. Data de nascimento: ____/____/____		
5. Telefone residencial: (____)		
6. Telefone celular: (____)		
7. Outro telefone de contato 1: (____)		
Características sócias demográficas		
13. Idade: ____ anos		
14. Peso		
15. Altura		
16. Sexo:		
Feminino		
Masculino		
17. Cor da pele/raça (conforme observado pelo pesquisador):		
Branca		
Parda		
Negra		
Amarela		
Indígena		
IGN		
Comorbidades		
<i>Algum médico já disse que o senhor (a) tem ou teve:</i>		
(complementar com dados do prontuário)		
18. Pressão alta	(0) Não	(1) Sim
19. Diabetes	(0) Não	(1) Sim
20. Asma	(0) Não	(1) Sim
21. Enfisema ou bronquite crônica (DPOC)	(0) Não	(1) Sim
22. Tuberculose	(0) Não	(1) Sim
23. Infarto do miocárdio	(0) Não	(1) Sim
24. Derrame (AVC)	(0) Não	(1) Sim

25. Colesterol alto	(0) Não	(1) Sim
26. Insuficiência cardíaca congestiva (ICC)	(0) Não	(1) Sim
27. Doença autoimune	(0) Não	(1) Sim
28. Depressão	(0) Não	(1) Sim
Outros:		
Medicações (complementar com dados do prontuário)		
<i>O senhor (a) faz uso de medicações regulares?</i>		
29.	(0) Não	(1) Sim
Se sim, quais?		
Hábitos de vida - Tabagismo		
30. O Sr. (a) fuma ou já fumou?		
(0) Nunca fumei		
(1) Já fumei, mas parei		
(2) Ainda fumo		
Tabagismo atual		
31. Há quantos anos o Sr. (a) começou a fumar? _____ anos		
32. Quantos cigarros o Sr. (a) usa em média por dia? _____ cigarros		
33. Há quantos anos o Sr. (a) parou de fumar completamente? _____		
34. Por quantos anos o Sr. (a) teve o hábito de fumar? _____ anos		
35. Quantos cigarros o Sr. (a) usava em média por dia? _____ cigarros		
Período da infecção – informações clínicas		
36. Febre	(0) Não	(1) Sim
37. Tosse com expectoração (diferente da habitual)	(0) Não	(1) Sim
38. Dores no corpo	(0) Não	(1) Sim
39. Dor de garganta	(0) Não	(1) Sim
40. Dor de cabeça	(0) Não	(1) Sim
41. Perda de paladar	(0) Não	(1) Sim
42. Perda de olfato	(0) Não	(1) Sim
Outros:		

APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Análises Clínicas
Campus Universitário - Florianópolis, SC, 88049-000, Brasil
Tel: (048) 3721 2071

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Gostaríamos de convidá-lo a participar do projeto de pesquisa intitulado: **Resposta Imune Dos Pacientes Infectados Pelo Sars-Cov-2, Um Estudo De Coorte** conduzido pela Prof^a Dr^a Maria Cláudia Santos da Silva da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita. Por favor, leia com atenção as informações a seguir para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada. Este termo de consentimento livre e esclarecido cumpre as exigências contidas na Resolução CNS nº466/12.

QUAL A JUSTIFICATIVA E OBJETIVO DESTE ESTUDO?

A doença COVID-19 é uma infecção que ocorre nos pulmões e é causada pelo novo coronavírus, chamado de SARS-CoV-2. Enquanto que a maioria das pessoas com COVID-19 apresenta apenas a forma leve da doença, uma parcela desenvolve uma doença respiratória grave. Acredita-se que o aumento da gravidade da COVID-19, bem como o bloqueio do seu desenvolvimento esteja relacionada à proteção individual da pessoa infectada. Sabe-se que o coronavírus descontrola a proteção contra o vírus, o que pode atrasar a produção de anticorpos (defesa) contra o vírus e levar a piora da doença, que pode atingir vários órgãos, principalmente os pulmões. Além disso, não se sabe até o momento se os anticorpos (defesa) produzidos contra o coronavírus pelos infectados é capaz de evitar novas infecções. Dessa forma, a realização de estudos para acompanhar e avaliar as mudanças que naturalmente acontecerão na resposta de pacientes com COVID-19 com o passar do tempo poderá auxiliar no entendimento de como a doença se desenvolve, o que pode auxiliar no tratamento dos pacientes. Diante disso, o objetivo do presente estudo é investigar o comportamento da resposta imune em pacientes com COVID-19 quando aparece a doença, e depois, após 6 e 12 meses, para ver se as mudanças de comportamento nessa resposta podem auxiliar na determinação da gravidade da doença.

QUAIS OS PROCEDIMENTOS DESTE ESTUDO?

Após o(a) Senhor(a) concordar em participar do estudo e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), serão coletados tubos de seu sangue. Além disso, o(a) Senhor(a) será contatado depois de 1, 6 e 12 meses pelos pesquisadores para realizar novas coletas de sangue e realização de exames. Sempre que possível, essas coletas de sangue serão realizadas com outras que o(a) Senhor(a) tenha que realizar devido a infecção por coronavírus. Após a coleta dos tubos de sangue, eles serão encaminhados ao laboratório de pesquisa, onde o sangue será utilizado para realizar os testes que avaliam algumas células ou proteínas envolvidas na resposta do seu sistema imune. Adicionalmente, será consultado o seu prontuário médico para coletarmos outras informações de interesse para o estudo, como resultados de exames de laboratório e tomografia computadorizada de tórax.

EU TENHO QUE PARTICIPAR? QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS ESPERADOS COM A PESQUISA?

Cabe ao Senhor(a) decidir se irá ou não participar. Mesmo que o(a) Senhor(a) não queira participar do estudo, isso não afetará de maneira nenhuma o padrão de cuidados que o(a) Senhor(a) receberá. Se decidir participar, o(a) Senhor(a) precisa assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Mesmo após ter assinado, é garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo para o(a) Senhor(a). Duas vias deste documento serão rubricadas e assinadas pelo(a) Senhor(a) e pelo pesquisador. Guarde cuidadosamente a sua via, pois é um documento que traz importantes informações de contato e garante os seus direitos como participante da pesquisa. Pode ser que o(a) Senhor(a) não tenha nenhum benefício direto com o estudo. No entanto, com a conclusão deste trabalho, esperase identificar exames de laboratório que auxiliem a determinar o prognóstico de pessoas com COVID19, e compreender melhor a dinâmica da resposta imune ao coronavírus. Acredita-se que tal conhecimento auxiliará na forma como os médicos tratarão futuros pacientes, bem como facilitará ao governo brasileiro na tomada de decisões em políticas públicas relacionadas à COVID-19.

EXISTEM RISCOS OU DESCONFORTOS ASSOCIADOS COM A PARTICIPAÇÃO?

Não existem riscos importantes relacionados, pode ocorrer apenas com os procedimentos de coleta de sangue. No entanto, estes riscos serão potencialmente reduzidos

pelos pesquisadores: a coleta de sangue será realizada em ambiente adequado e por equipe treinada. A equipe estará presente durante os procedimentos de coleta e tomará todos os cuidados necessários para que o (a) Senhor(a) tenha o mínimo de desconforto, apesar disto, poderá haver a possibilidade de formação de hematoma (manchas escuras) e sensação dolorosa no local da coleta. Se isso acontecer, a equipe tomará as medidas necessárias para diminuir este desconforto. Será assegurado o direito do(a) Senhor(a) não responder a qualquer pergunta se achar que ela é muito pessoal ou se sentir desconfortável em falar. Os dados/resultados obtidos serão armazenados codificados e manuseados com todo cuidado somente pelos pesquisadores para reduzir o risco de quebra de sigilo.

O QUE ACONTECERÁ COM AS INFORMAÇÕES DESTA PESQUISA E COMO OS MEUS DADOS PESSOAIS SERÃO UTILIZADOS?

As informações obtidas serão mantidas em sigilo e utilizadas exclusivamente para os fins desta pesquisa. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas. Seu anonimato será mantido quando da divulgação dos resultados nos meios científicos, pois os dados apresentados não incluirão nomes de pessoas, ou seja, apenas divulgaremos resultados obtidos como um todo. O(a) Senhor(a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma.

QUE CUSTOS TEREI SE PARTICIPAR?

Não há despesas previstas para o(a) Senhor(a) em qualquer fase do estudo. Conforme previsto pelas normas brasileiras de pesquisa com a participação de seres humanos, o(a) Senhor(a) não receberá nenhum tipo de compensação financeira pela sua participação neste estudo. Caso alguma despesa extraordinária associada à pesquisa venha a ocorrer, o(a) Senhor(a) será ressarcido(a). Em qualquer momento, se sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, o(a) Senhor(a) terá direito a indenização.

COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?

Os pesquisadores são pessoas com quem você deve contar, no caso de dúvidas sobre o estudo ou sobre os seus direitos como participante. Quaisquer informações adicionais sobre a pesquisa, em qualquer momento, poderão ser solicitadas à Prof^a Dr^a Maria Cláudia Santos da Silva, do Departamento de Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde da UFSC (ACL/CCS/UFSC). A sua sala fica localizada no 2º piso do Hospital Universitário Professor

Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSERH), ao lado do Núcleo Desenvolver - CEP 88040-970 - Florianópolis – SC.

Seus dados de contato são: (48) 37212071; e-mail: maria.claudia.silva@ufsc.br.

Em caso de dúvidas relacionadas aos procedimentos éticos da pesquisa, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH). O CEPSH é um órgão colegiado interdisciplinar, deliberativo, consultivo e educativo, vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina, mas independente na tomada de decisões, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Dados para contato com o CEPSH-UFSC: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - Universidade Federal de Santa Catarina - Prédio Reitoria II - Rua: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC - CEP: 88.040-400 -

Contato: (48) 3721-6094 ou cep.propesq@contato.ufsc.br

Segue abaixo os termos da declaração para poder participar do estudo:

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito do estudo “**Resposta Imune Dos Pacientes Infectados Pelo Sars-Cov-2, Um Estudo De Coorte**”.

Eu discuti com os pesquisadores responsáveis sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar, caso seja necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento: antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo, perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Nome do participante/CPF

Assinatura

Data

ou

Responsável legal/CPF

Assinatura

Data

Responsável pelo estudo/CPF

Assinatura

Data

APÊNDICE C - Informações técnicas dos reagentes

Marcador	Fluorocromo	Clone	Fornecedor	Nº catálogo	µL/teste
CD3	APC	UCHT1	BD Biosciences	555335	2
CD3	APCH7	SK7	BD Biosciences	560176	2
CD3	PacB	UCHT1	BD Biosciences	558117	2
CD4	PerCP Cy5-5	MEM-241	EXBIO	T9359	2
CD4	BV421	RP4-T4	BD Biosciences	562424	1
CD5	PerCP Cy5-5	L17F12	BD Biosciences	341089	5
CD8	FITC	B9.11	Beckman Coulter	A07756	2
CD8	APCH7	SK1	BD Biosciences	560179	2
CD10	PECy7	HI10A	BD Biosciences	565282	2
CD11c	PerCP Cy5-5	BU15	LIFE TECHNOLOGIES	A15803	4
CD14	APC	MφP9	BD Biosciences	340436	2
CD16	FITC	3G8	BD Biosciences	555406	3
CD19	PECy7	J3-119	Beckman Coulter	IM3628	1
CD19	APCH7	HIB19	BD Biosciences	560727	2
CD20	APCH7	2H7	BD Biosciences	560853	1
CD20	PacB	L27	BD Biosciences	642274	1
CD24	PE	ML5	BD Biosciences	555428	10
CD25	PE	M-A251	BD Biosciences	555432	7
CD27	PerCP Cy5-5	M-T271	BD Biosciences	560612	1
CD28	PE	CD28.2	BD Biosciences	555729	5
CD38	APCH7	HB7	BD Biosciences	653314	2
CD45	PacO	HI30	BD Biosciences	560777	1
CD45 RA	PECy7	HI100	BD Biosciences	560675	1
CD56	PE	N901 (NKH-1)	BD Biosciences	555516	10
CD57	FITC	HNK-1	BD Biosciences	555619	7
CD62L	FITC	LT-TD180	EXBIO	1F449	10
CD123	PE	7G3	BD Biosciences	554529	3
CD127	FITC	HIL-7R- M21	BD Biosciences	560549	5
CD197 (CCR7)	PE	G043H7	BD Biosciences	2L1A	2
FoxP3	AF647	236A/E7	BD Biosciences	561184	5
HLA-DR	PacB	L243	BD Biosciences	642276	2
IgD	FITC	IADB6	Beckman Coulter	B30652	5
IgM	APC	G20-127	BD Biosciences	551062	10
TCR γδ	PECy7	11F2	EXBIO	T7147	2

APÊNDICE D – Avaliação da celularidade total das amostras (Tubo 1)

Variável	Controle	Leve	Moderado	Grave	Crítico	P
Leucócitos/mm ³	6.315,00 (4.670,00 – 9.620,00) a	7.195 (3.690 – 10.840) a	7.870 (2.600 – 15.250) a, b	8.660 (1.046 – 15.240) b, c	10.830 (1.560 – 21.070) c	<0,001
Neutrófilos (% de leucócitos)	60,94 (44,42 – 77,25) a	60,25 (35,51 – 85,18) a	78,38 (44,04 – 94,05) b	85,43 (62,32 – 94,92) c	86,57 (61,10 – 95,79) c	<0,001
Neutrófilos/mm ³	3.845,10 (2.328,59 – 6.320,34) a	4.401,86 (1.310,50 – 6.701,05) a	5.097,56 (1.761,92 – 11.357,43) a, b	7.097,05 (974,87 – 13.034,77) b, c	8.083,76 (1.207,67 – 17.905,29) c	<0,001
Monócitos (% de leucócitos)	7,31 (4,45 – 11,14) a	6,70 (4,09 – 23,29) a	6,57 (1,86 – 15,64) a, b	4,08 (1,51 – 11,85) c	5,35 (1,10 – 10,32) b, c	<0,001
Monócitos/mm ³	454,46 (283,00 – 948,01)	488,88 (261,76 – 859,58)	460,29 (91,70 – 1.357,55)	386,24 (20,60 – 1.262,27)	484,06 (107,56 – 1.776,20)	0,180
Eosinófilos (% de leucócitos)	1,94 (0,36 – 8,70) a	1,14 (0,05 – 3,12) a	0,21 (0 – 14,38) b	0,11 (0 – 1,87) b	0,14 (0 – 3,94) b	<0,001
Eosinófilos/mm ³	107,70 (22,03 – 544,62) a	77,78 (3,92 – 187,24) a	15,52 (0 – 734,82) b	8,44 (0 – 213,00) b	15,52 (0 – 678,47) b	<0,001
Basófilos (% de leucócitos)	0,60 (0,25 – 1,36) a	0,37 (0 – 0,81) a	0,07 (0,01 – 0,98) b	0,03 (0 – 0,49) b, c	0,02 (0 – 0,44) c	<0,001
Basófilos/mm ³	38,34 (15,30 – 86,77) a	28,57 (0 – 69,38) a	4,91 (0,53 – 73,71) b	3,42 (0,21 – 39,40) b	2,73 (0 – 50,77) b	<0,001
Linfócitos totais/mm ³	2.020,00 (1.358,00 – 3.350,00) a	2.395,00 (990,00 – 3.870) a	1.150,00 (380,00 – 3.430,00) b	940,00 (300,00 – 7.000,00) b	900,00 (330,00 – 6.000,00) b	<0,001
Linfócitos totais (% de leucócitos)	27,65 (12,14 – 45,25) a	31,25 (8,88 – 49,64) a	14,48 (2,51 – 39,76) b	10,09 (1,88 – 32,49) b, c	7,44 (2,90 – 29,94) c	<0,001
Linfócitos T (% de leucócitos)	15,47 (8,84 – 34,69) a, b	20,84 (4,45 – 32,95) a	8,74 (1,36 – 25,92) b, c	4,73 (0,80 – 22,89) c, d	4,63 (1,39 – 21,10) d	<0,001
Linfócitos T/mm ³	1.006,94 (643,89 – 2.133,43) a, b	1.400,15 (349,27 – 2.703,49) a	639,23 (162,52 – 2.360,58) b, c	388,17 (23,33 – 1.421,47) c	416,40 (148,00 – 2.477,73) c	<0,001
Linfócitos T CD4 ⁺ (% de leucócitos)	9,39 (4,15 – 19,55) a, b	12,51 (3,07 – 26,03) a	4,86 (0,82 – 20,74) b, c	2,68 (0,57 – 14,97) c, d	3,05 (0,85 – 13,44) d	<0,001
Linfócitos T CD4 ⁺ /mm ³	609,90 (341,96 – 1.550,09) a, b	857,93 (240,69 – 1.817,76) a	408,73 (97,99 – 1.988,97) b, c	245,27 (18,41 – 929,64) c	286,56 (71,67 – 1.578,44) c	<0,001
Linfócitos T CD8 ⁺ (% de leucócitos)	5,08 (2,36 – 13,65) a	6,76 (1,22 – 15,39) a	2,87 (0,48 – 10,91) b	1,36 (0,21 – 7,38) b, c	1,13 (0,05 – 7,18) c	<0,001
Linfócitos T CD8 ⁺ /mm ³	334,52 (150,57 – 839,47) a	489,58 (95,64 – 1.178,86) a	169,88 (29,46 – 979,16) b	99,22 (4,50 – 458,30) b	112,33 (4,54 – 842,93) b	<0,001
Linfócitos T γδ ⁺ (% de leucócitos)	0,83 (0,07 – 2,66) a, b	0,45 (0,10 – 4,71) a	0,21 (0,03 – 0,99) b, c	0,12 (0,01 – 1,10) c	0,10 (0 – 3,19) c	<0,001
Linfócitos T γδ ⁺ /mm ³	59,26 (4,06 – 153,48) a	30,09 (6,78 – 363,05) a	15,87 (1,45 – 90,09) b	10,33 (0,10 – 84,70) b	8,95 (0,77 – 104,63) b	<0,001
Linfócitos T DP (% de leucócitos)	0,11 (0,04 – 1,10) a	0,10 (0 – 0,41) a	0,04 (0,01 – 1,30) b	0,02 (0 – 0,13) b	0,03 (0 – 0,33) b	<0,001
Linfócitos T DP/mm ³	6,48 (2,50 – 71,06) a	6,86 (0 – 34,06) a	2,89 (0,48 – 198,25) b	2,54 (0 – 7,17) b	2,71 (0 – 41,82) b	<0,001

Linfócitos T DN (% de leucócitos)	0,11 (0,03 – 0,26) a, b	0,26 (0 – 2,77) a	0,05 (0,01 – 0,22) b, c	0,03 (0,01 – 0,18) c	0,04 (0,01 – 0,16) c	<0,001
Linfócitos T DN/mm ³	6,96 (1,97 – 17,32) a	18,43 (0 – 179,54) b	5,31 (1,00 – 18,20) a, c	2,85 (0,31 – 18,29) c	3,57 (0,76 – 20,41) c	<0,001
Linfócitos B (% de leucócitos)	3,21 (1,14 – 10,71) a	4,04 (0,55 – 8,68) a	3,04 (0,42 – 14,13) a, b	1,81 (0,39 – 5,71) b, c	1,97 (0,50 – 6,95) c	<0,001
Linfócitos B/mm ³	223,63 (72,76 – 622,25) a, b	279,22 (44,77 – 659,68) a	198,42 (34,02 – 905,73) a, b	152,24 (16,84 – 633,14) b	173,95 (19,84 – 815,93) b	0,015
NK (% de leucócitos)	5,34 (1,22 – 12,46) a	2,97 (0,69 – 13,49) a, b	2,09 (0,32 – 5,69) b, c	1,80 (0,30 – 4,91) c	0,68 (0,07 – 4,71) d	<0,001
NK/mm ³	317,89 (100,53 – 768,14) a	205,93 (56,51 – 959,14) a, b	151,95 (33,93 – 397,76) b	140,97 (7,22 – 380,92) b, c	70,69 (8,36 – 608,06) c	<0,001
NK 56 ⁺ (% de leucócitos)	0,15 (0,02 – 0,53) a	0,10 (0,01 – 1,52) a, b	0,06 (0,01 – 0,64) b	0,05 (0,01 – 0,27) b, c	0,03 (0 – 0,22) c	0,003
NK CD56 ⁺ /mm ³	9,88 (1,23 – 31,80) a	7,47 (0,65 – 88,31) a	4,52 (0,70 – 35,71) a, b	4,57 (0,73 – 28,22) a, b	2,94 (0,23 – 20,01) b	<0,001
NKT (% de leucócitos)	0,89 (0,29 – 4,29) a	0,93 (0,05 – 4,05) a	0,50 (0,01 – 5,85) a, b	0,20 (0,02 – 1,95) b	0,24 (0,03 – 2,83) b	<0,001
NKT/mm ³	57,98 (17,63 – 375,75) a	67,41 (3,56 – 408,74) a	37,82 (0,81 – 288,41) a, b	17,19 (0,31 – 297,18) b	20,96 (2,34 – 309,04) b	<0,001
Relação T CD4/T CD8	1,69 (0,78 – 4,13) a	1,89 (0,73 – 4,56) a, b	1,97 (0,75 – 7,95) a, b	2,23 (0,70 – 7,59) a, b	2,22 (0,98 – 6,30) b	0,006
Monócitos CD56 ⁺	5,92 (1,14 – 20,16) a	4,60 (0,79 – 30,67) a	16,70 (5,52 – 55,92) b	23,07 (2,24 – 78,60) b	24,01 (10,08 – 53,63) b	<0,001
RNL	1,85 (0,92 – 3,85) a	2,04 (0,74 – 6,75) a	4,43 (1,08 – 25,54) b	6,73 (0,14 – 40,60) b, c	9,69 (0,99 – 24,80) c	<0,001

Os resultados estão expressos em mediana (intervalo). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). T CD4⁺: linfócitos T CD4⁺; T CD8⁺: linfócitos T CD8⁺; T DP: linfócitos T duplo-positivos (CD4⁺ CD8⁺); T DN: linfócitos T duplo-negativos (CD4⁻ CD8⁻); T $\gamma\delta$: linfócitos T TCR $\gamma\delta$ ⁺; NK: natural killer; RNL: relação neutrófilo-linfócito.

APÊNDICE E – Avaliação do grau de maturação dos linfócitos t e expressão de CD62L em monócitos e neutrófilos (Tubo 2)

Variável	Controle	Leve	Moderado	Grave	Crítico	P
T CD4 N (%TCD4 ⁺)	28,60 (17,29 – 55,34)	25,82 (1,31 – 53,62)	33,49 (4,84 – 80,61)	35,37 (3,57 – 76,02)	34,19 (3,57 – 76,02)	0,084
T CD4 N/mm ³	203,62 (86,78 – 465,65) a	208,51 (3,15 – 725,16) a	126,92 (22,32 – 626,47) a, b	77,89 (449,15 – 441,36) b	94,94 (7,01 – 370,76) b	<0,001
T CD4 CM (%TCD4 ⁺)	40,03 (17,48 – 57,09) a	24,28 (3,55 – 44,54) b	35,89 (8,82 – 55,50) a	39,73 (0,71 – 61,52) a	37,35 (0,22 – 64,26) a	<0,001
T CD4 CM/mm ³	276,15 (141,31 – 485,49)	199,67 (8,54 – 524,39)	119,12 (13,38 – 610,87)	97,38 (0,52 – 488,33)	112,57 (0,72 – 798,89)	0,180
T CD4 EM (%TCD4 ⁺)	26,59 (14,05 – 55,75) a, b	30,20 (0,92 – 68,49) a	23,41 (4,12 – 45,49) b, c	21,55 (0,21 – 62,92) b, c	19,59 (0,12 – 49,02) c	<0,001
T CD4 EM/mm ³	173,49 (76,19 – 893,84) a	235,80 (15,09 – 796,43) a	60,28 (13,21 – 454,28) b	59,92 (0,15 – 416,97) b	52,29 (0,39 – 569,74) b	<0,001
T CD4 EMRA (%TCD4 ⁺)	3,75 (0,66 – 17,42) a	18,00 (0,75 – 50,54) b	4,97 (0,57 – 56,88) a	2,34 (0,31 – 35,53) a	4,22 (0,18 – 29,12) a	<0,001
T CD4 EMRA/mm ³	26,73 (5,46 – 104,86) a	137,79 (9,79 – 476,07) b	15,41 (1,25 – 1131,32) a	6,49 (0,22 – 195,22) a	11,07 (0,36 – 115,31) a	<0,001
T CD8 N (%TCD8 ⁺)	21,33 (8,73 – 48,78)	19,31 (4,29 – 43,21)	20,52 (4,20 – 57,61)	23,87 (4,67 – 73,35)	17,82 (1,76 – 61,05)	0,436
T CD8 N/mm ³	84,57 (32,78 – 452,31) a	94,42 (4,10 – 328,22) a	34,60 (3,36 – 292,77) b	21,93 (2,12 – 202,45) b	19,12 (0,69 – 226,71) b	<0,001
T CD8 CM (%TCD8 ⁺)	13,05 (4,37 – 33,17) a	8,00 (1,76 – 25,58) b	10,91 (1,98 – 43,78) a, b	11,96 (0,55 – 35,47) a, b	11,75 (0,01 – 52,77) a	0,012
T CD8 CM/mm ³	48,71 (15,01 – 208,94) a	35,23 (3,25 – 197,58) a, b	21,60 (1,13 – 211,73) b, c	12,09 (0,35 – 68,11) c	11,55 (0,01 – 196,70) c	<0,001
T CD8 EM (%TCD8 ⁺)	31,33 (8,60 – 61,15)	34,20 (18,23 – 52,79)	28,27 (6,44 – 56,59)	27,73 (0,12 – 66,09)	24,87 (0,05 – 64,20)	0,069
T CD8 EM/mm ³	116,91 (29,55 – 340,64) a	169,53 (30,11 – 450,38) a	47,46 (4,63 – 313,36) b	29,51 (0,08 – 299,78) b	27,73 (0,03 – 283,63) b	<0,001
T CD8 EMRA (%TCD8 ⁺)	30,60 (5,91 – 68,63)	34,08 (6,28 – 67,30)	29,08 (4,28 – 79,22)	28,80 (3,57 – 67,03)	32,76 (5,85 – 94,04)	0,579
T CD8 EMRA/mm ³	127,52 (32,89 – 344,68) a	149,14 (33,66 – 512,86) a	50,76 (2,80 – 423,68) b	28,48 (0,50 – 158,36) b	36,35 (2,18 – 326,35) b	<0,001
T CD4 HLA-DR ⁺ (%TCD4 ⁺)	7,45 (3,13 – 34,76)	6,19 (3,26 – 13,40)	8,85 (3,97 – 18,46)	8,43 (2,78 – 34,12)	7,91 (3,21 – 24,42)	0,053
T CD4 HLA-DR ⁺ /mm ³	56,71 (21,23 – 351,97) a	50,82 (14,46 – 177,96) a	40,78 (8,04 – 171,77) a, b	22,04 (1,13 – 88,18) b	22,62 (5,56 – 138,73) b	<0,001
T CD8 HLA-DR ⁺ (%TCD8 ⁺)	19,09 (6,70 – 52,54)	17,21 (4,81 – 54,32)	25,95 (6,82 – 59,30)	18,17 (4,66 – 68,62)	22,92 (7,62 – 88,04)	0,102
T CD8 HLA-DR ⁺ /mm ³	79,60 (21,25 – 277,68) a	82,43 (13,12 – 407,18) a	55,05 (4,14 – 377,76) a, b	20,39 (0,47 – 143,14) b	24,06 (0,87 – 433,36) b	<0,001
Monócitos CD62L ⁺	70,04 (33,45 – 86,55) a, b	46,54 (8,45 – 87,77) b	74,28 (9,98 – 96,72) a	65,85 (4,76 – 96,80) a	81,80 (14,95 – 98,49) a	<0,001
Neutrófilos CD62L ⁺	69,69 (32,76 – 93,31) a	69,12 (36,92 – 99,35) a	93,08 (31,83 – 99,36) b	81,90 (23,34 – 99,28) b	90,24 (31,03 – 99,00) b	<0,001

Os resultados estão expressos em mediana (intervalo). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). T CD4⁺ CM: linfócitos T CD4⁺ de memória central; T CD4⁺ EM: linfócitos T CD4⁺ efetores de memória; T CD4⁺ EMRA: linfócitos T CD4⁺ efetores terminais; T CD8⁺ CM: linfócitos T CD8⁺ de memória central.

APÊNDICE F – Avaliação do grau de ativação dos linfócitos T (Tubo 3)

Variável	Controle	Leve	Moderado	Grave	Crítico	P
TCD4 CD28 ⁺ CD57 ⁻ (% TCD4 ⁺)	97,35 (52,12 - 99,94)	97,20 (88,17 - 99,77)	94,34 (83,50 - 99,82)	95,79 (80,35 - 99,80)	94,44 (73,65 - 99,83)	0,072
TCD4 CD28 ⁺ CD57 ⁻ /mm ³	665,60 (402,45 - 1.177,46) a, b	833,00 (237,46 - 1.784,13) a	366,66 (92,28 - 1.970,87) b, c	235,57 (18,24 - 921,36) c	266,34 (60,85 - 1.490,36) c	<0,001
TCD4 CD28 ⁻ CD57 ⁻ (% TCD4 ⁺)	2,64 (0,06 - 47,88) a	0,51 (0,02 - 6,19) b	0,84 (0,02 - 15,16) b	0,74 (0,01 - 5,96) b	1,31 (0,02 - 13,32) b	<0,001
TCD4 CD28 ⁻ CD57 ⁻ /mm ³	20,24 (0,43 - 467,66) a	3,08 (0,12 - 54,84) b	2,38 (0,04 - 132,05) b	1,88 (0 - 12,28) b	4,47 (0,03 - 33,73) b	<0,001
TCD4 CD28 ⁻ CD57 ⁺ (% TCD4 ⁺)	2,08 (0,03 - 45,60)	1,77 (0,19 - 8,80)	3,94 (0,16 - 15,23)	2,98 (0,18 - 18,58)	2,71 (0,10 - 21,05)	0,187
TCD4 CD28 ⁻ CD57 ⁺ /mm ³	17,33 (0,21 - 731,11)	15,28 (1,13 - 88,95)	16,66 (0,25 - 128,99)	8,27 (0,16 - 72,71)	8,90 (0,26 - 143,05)	0,119
TCD8 CD28 ⁺ CD57 ⁻ (% TCD8 ⁺)	63,61 (37,71 - 89,46)	65,94 (29,83 - 96,49)	62,65 (11,22 - 91,04)	59,16 (22,36 - 89,20)	55,55 (11,84 - 95,14)	0,053
TCD8 CD28 ⁺ CD57 ⁻ /mm ³	227,68 (136,62 - 650,85) a	303,09 (61,43 - 627,39) a	100,45 (8,17 - 485,86) b	61,52 (4,01 - 335,14) b	55,24 (2,09 - 708,32) b	<0,001
TCD8 CD28 ⁻ CD57 ⁻ (% TCD8 ⁺)	36,38 (10,54 - 62,29) a	11,09 (0,87 - 53,87) b	9,34 (2,09 - 34,56) b	13,32 (2,54 - 47,28) b	13,12 (0,14 - 62,81) b	<0,001
TCD8 CD28 ⁻ CD57 ⁻ /mm ³	181,43 (36,21 - 494,72) a	51,33 (2,56 - 308,13) b	20,28 (2,70 - 270,93) c	16,35 (0,13 - 81,82) c	13,00 (0,31 - 150,29) c	<0,001
TCD8 CD28 ⁻ CD57 ⁺ (% TCD8 ⁺)	20,30 (3,03 - 47,86)	18,02 (1,61 - 42,95)	21,97 (1,17 - 66,56)	24,47 (2,94 - 64,03)	25,28 (0,33 - 75,68)	0,058
TCD8 CD28 ⁻ CD57 ⁺ /mm ³	83,93 (12,93 - 366,00) a	50,16 (8,26 - 304,97) a	53,52 (0,94 - 222,37) a, b	27,65 (0,35 - 238,46) b	28,51 (0,20 - 303,39) b	<0,001

APÊNDICE G – Avaliação dos linfócitos Treg (Tubo 4)

Variável	Controle	Leve	Moderado	Grave	Crítico	P
Treg totais (%TCD4 ⁺)	3,55 (1,52 - 6,31) a	1,99 (0,49 - 5,94) b	1,43 (0,12 - 4,26) b	1,19 (0,06 - 4,79) b	1,05 (0,22 - 7,28) b	<0,001
Treg total/mm ³	29,60 (10,84 - 80,98) a	14,25 (2,27 - 71,66) a	6,30 (0,43 - 32,15) b	2,47 (0,48 - 21,64) b	2,94 (0,43 - 90,50) b	<0,001
Treg naïve (%TCD4 ⁺)	1,23 (0,27 - 3,11) a	0,61 (0,05 - 2,85) a, b	0,27 (0 - 1,05) b, c	0,10 (0,01 - 1,36) c	0,10 (0 - 1,07) c	<0,001
Treg naïve/mm ³	8,81 (2,52 - 21,54) a	4,97 (46,74 - 46,62) a	0,88 (0 - 13,29) b	0,20 (0,02 - 7,67) b	0,34 (0 - 6,31) b	<0,001
Treg M (%TCD4 ⁺)	2,02 (0,85 - 5,27) a	1,24 (0,35 - 3,88) b	1,07 (0,12 - 3,67) b	0,99 (0,05 - 3,84) b	0,78 (0,02 - 6,88) b	<0,001
Treg M/mm ³	14,46 (5,47 - 67,63) a	9,43 (2,03 - 37,97) a, b	4,28 (0,43 b, c - 20,88)	2,06 (0,39 - 13,96) c	2,57 (0,06 - 85,53) c	<0,001

Os resultados estão expressos em mediana (intervalo). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). Treg: linfócitos T CD4⁺ regulatórios; Treg M: linfócitos T CD4⁺ regulatórios de memória.

APÊNDICE H – Avaliação dos linfócitos B (Tubo 5)

Variável	Controle	Leve	Moderado	Grave	Crítico	P
Naive (% de linfócitos B)	55,28 (27,25 - 80,35)	57,56 (31,73 - 77,78)	62,27 (21,78 - 82,60)	62,51 (38,29 - 78,67)	54,02 (5,70 - 89,44)	0,059
Naive/mm ³	134,52 (37,93 - 430,77)	143,08 (18,66 - 445,53)	144,72 (11,11 - 695,87)	104,63 (12,19 - 476,28)	114,35 (1,87 - 528,59)	0,288
Transicionais (% de linfócitos B)	5,51 (1,83 - 13,91) a, b	6,49 (0,74 - 14,86) a	5,96 (0,04 - 10,29) a, b	5,11 (1,41 - 12,47) a, b	3,40 (0,38 - 11,93) b	0,004
Transicionais/mm ³	12,51 (3,07 - 69,21) a, b	14,51 (1,50 - 98,59) a	11,51 (0,07 - 85,73) a, b	7,79 (1,11 - 42,23) b	7,37 (0,33 - 25,87) b	0,003
BM-NS (% de linfócitos B)	16,91 (2,95 - 41,70) a	10,69 (1,36 - 26,36) a	4,78 (0,81 - 23,73) b	4,99 (0,39 - 24,44) b	4,64 (0,49 - 17,10) b	<0,001
BM-NS/mm ³	37,50 (3,51 - 160,38) a	25,03 (2,72 - 107,60) a	11,15 (0,93 - 81,38) b	10,74 (0,63 - 77,32) b	7,57 (0,66 - 81,22) b	<0,001
BM-CS (% de linfócitos B)	19,29 (7,71 - 47,49) a	17,29 (5,16 - 32,75) a	9,28 (1,00 - 38,14) b	10,52 (3,43 - 24,05) b	9,66 (1,62 - 60,73) b	<0,001
BM-CS/mm ³	49,84 (10,11 - 158,36) a	44,17 (7,20 - 154,15) a	20,54 (1,15 - 111,75) b	20,85 (1,05 - 74,58) b	19,86 (3,62 - 235,38) b	<0,001
BM-DN (% de linfócitos B)	2,39 (0,40 - 7,18) a	3,90 (1,88 - 14,48) b, c	3,02 (1,10 - 12,73) a, c	3,93 (1,33 - 10,40) a, b, c	5,06 (1,46 - 13,29) b	<0,001
BM-DN/mm ³	6,07 (0,47 - 24,31) a	10,19 (2,71 - 60,29) b	7,46 (0,67 - 31,16) a, b	5,30 (0,34 - 39,85) a	9,34 (1,49 - 51,11) a, b	0,001
Plasmablastos (% de linfócitos B)	0,63 (0 - 3,84) a	0,89 (0,23 - 18,74) a	6,57 (0,19 - 65,45) b	9,03 (0,42 - 30,72) b	18,01 (0 - 59,03) b	<0,001
Plasmablastos/mm ³	1,75 (0 - 12,80) a	2,37 (0,51 - 40,23) a	13,00 (0,96 - 113,25) b	12,08 (0,74 - 118,92) b	29,43 (0 - 202,03) b	<0,001

Os resultados estão expressos em mediana (intervalo). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). BM-NS: linfócitos B de memória *non-switched*; BM-CS: linfócitos B de memória *class-switched*; BM-DN: linfócitos B de memória duplo-negativos (CD27⁻ IgD⁻).

APÊNDICE I – Avaliação dos subtipos de monócitos e DCs e grau de maturação dos neutrófilos (Tubo 6)

Variável	Controle	Leve	Moderado	Grave	Crítico	P
Neutrófilos maduros (% de leucócitos)	55,79 (39,57 – 72,87) a	54,07 (28,65 – 83,26) a	73,83 (42,09 – 92,21) b	81,32 (53,05 – 90,47) b, c	82,39 (44,61 – 95,13) c	<0,001
Neutrófilos maduros/mm ³	3.525,95 (2.186,27 – 6.169,31) a	3.960,32 (1.057,18 – 6.527,58) a	4.694,64 (1.484,22 – 11.019,09) b	6.609,62 (915,56 – 11.452,86) b	7.680,04 (1.098,08 – 17.359,57) b	<0,001
Neutrófilos imaturos (% de leucócitos)	0,13 (0,02 – 0,68) a	0,10 (0,02 – 3,72) a	0,76 (0,05 – 3,84) b	1,09 (0,11 – 10,99) b	1,18 (0,12 – 20,75) b	<0,001
Neutrófilos imaturos/mm ³	8,72 (1,22 – 56,03) a	7,36 (1,28 – 168,14) a	47,09 (2,49 – 548,25) b	69,86 (4,78 – 1.410,02) b	119,79 (10,96 – 1.873,72) b	<0,001
Neutrófilos maduros (% de neutrófilos)	99,78 (99,06 – 99,95) a	99,80 (94,17 – 99,97) a	99,85 (93,38 – 99,94) b	98,66 (88,18 – 99,84) b	98,53 (68,25 – 99,85) b	<0,001
Neutrófilos imaturos (% de neutrófilos)	0,22 (0,05 – 0,94) a	0,20 (0,03 – 5,83) a	1,15 (0,06 – 6,62) b	1,33 (0,16 – 11,82) b	1,41 (0,15 – 31,75) b	<0,001
Monócitos/mm ³	441,65 (281,44 – 739,95)	516,09 (317,70 – 872,62)	466,10 (115,70 – 1.424,39)	426,55 (27,93 – 1.265,14)	509,62 (106,55 – 1.750,32)	0,115
Monócitos (% de leucócitos)	6,94 (3,76 – 9,69) a, c	7,06 (4,29 – 22,27) a	6,28 (2,50 – 16,41) a, b, c	4,39 (1,86 – 11,63) b	5,78 (1,02 – 10,97) b, c	<0,001
cMo (% de leucócitos)	84,63 (75,59 – 92,42) a	89,26 (69,25 – 96,93) a, b	93,16 (80,34 – 97,81) b, c	95,50 (73,59 – 99,40) c	94,88 (76,71 – 99,69) c	<0,001
cMo (% de monócitos)	363,12 (238,10 – 683,10)	462,14 (277,24 – 714,36)	421,26 (105,30 – 1.341,06)	399,11 (26,88 – 1.231,88)	483,29 (97,34 – 1.702,46)	0,054
cMo/mm ³	0,39 (0,22 – 0,68) a	0,50 (0,17 – 2,41) a	0,40 (0,09 – 0,98) a	0,21 (0,01 – 0,99) b	0,25 (0,02 – 1,35) b	<0,001
iMo (% de leucócitos)	5,56 (3,61 – 9,22) a, b	7,08 (3,05 – 27,54) a	6,32 (1,89 – 19,06) a, b	3,98 (0,38 – 26,26) b	5,07 (0,31 – 22,60) b	0,012
iMo (% de monócitos)	26,09 (14,23 – 41,32) a, b	36,29 (12,41 – 231,61) a	30,47 (2,78 – 76,46) a, b	19,73 (1,05 – 54,45) b	22,18 (1,37 – 250,69) b	0,007
iMo/mm ³	0,60 (0,19 – 1,25) a	0,29 (0,00 – 0,82) a	0,03 (0,00 – 0,48) b	0,01 (0,00 – 0,47) b	0,01 (0,00 – 0,56) b	<0,001
ncMo (% de leucócitos)	9,23 (2,07 – 17,47) a	3,66 (0,03 – 10,31) a	0,59 (0,00 – 7,64) b	0,16 (0,00 – 8,67) b	0,26 (0,00 – 15,99) b	<0,001
ncMo (% de monócitos)	37,73 (15,66 – 80,09) a	21,15 (0,00 – 57,46) a	2,56 (0,00 – 43,68) b	0,86 (0,00 – 38,40) b	1,15 (0,00 – 86,41) b	<0,001
ncMo/mm ³	1,00 (0,46 – 1,86) a	0,84 (0,17 – 3,05) a	0,47 (0,11 – 1,38) b	0,26 (0,02 – 1,13) b	0,26 (0,02 – 1,45) b	<0,001
TiMas (% de leucócitos)	15,37 (7,58 – 24,41) a	10,47 (3,07 – 30,75) a, b	6,83 (2,19 – 19,66) b, c	4,49 (0,60 – 26,41) c	5,12 (0,31 – 23,29) c	<0,001
TiMas (% de monócitos)	64,43 (34,75 – 112,61) a	53,96 (12,41 – 258,86) a, b	32,63 (3,40 – 83,33) b, c	22,31 (1,05 – 92,32) c	25,05 (1,48 – 252,55) c	<0,001
TiMas/mm ³	70,04 (33,45 – 86,55) a, b	46,54 (8,45 – 87,77) b	74,28 (9,98 – 96,72) a	65,85 (4,76 – 96,80) a	81,80 (14,95 – 98,49) a	<0,001
DCs totais/mm ³	19,82 (10,35 – 39,12) a	14,67 (0,97 – 34,69) a	3,86 (0,00 – 34,52) b	1,88 (0,00 – 14,91) b	3,50 (0,00 – 54,22) b	<0,001
mDC (% de leucócitos)	0,21 (0,11 – 0,56) a	0,11 (0,02 – 0,52) a, b	0,04 (0,00 – 0,37) b, c	0,02 (0,00 – 0,12) d	0,03 (0,00 – 0,40) c, d	<0,001
mDC (% de DCs)	70,37 (45,42 – 90,00) a	64,57 (19,93 – 90,26) a	88,26 (49,63 – 100,00) b	89,07 (36,96 – 100,00) b	89,33 (55,24 – 100,00) b	<0,001

mDC/mm ³	13,17 (7,12 - 35,34) a	8,10 (0,98 - 25,20) a, b	3,21 (0,00 - 33,47) b, c	1,63 (0,00 - 13,76) c	3,31 (0,00 - 51,64) c	<0,001
pDC (% de leucócitos)	0,09 (0,04 - 0,18) a	0,07 (0,00 - 0,33) a	0,01 (0,00 - 0,10) b	0,00 (0,00 - 0,16) b	0,00 (0,00 - 0,08) b	<0,001
pDC (% de DCs)	29,63 (10,00 - 54,58) a	35,43 (9,74 - 79,38) a	11,74 (0,00 - 50,37) b	10,92 (0,00 - 62,98) b	10,67 (0,00 - 44,76) b	<0,001
pDC/mm ³	5,91 (2,89 - 10,57) a	4,07 (0,00 - 16,46) a	0,79 (0,00 - 6,67) b	0,00 (0,00 - 6,96) b	0,00 (0,00 - 9,12) b	<0,001
mDC/pDC	2,37 (0,83 - 9,00) a	1,82 (0,25 - 9,27) a	6,03 (0,99 - 58,88) b	7,83 (0,59 - 35,63) b	7,87 (1,23 - 104,26) b	<0,001
pDC/mDC	0,42 (0,11 - 1,20) a	0,55 (0,12 - 3,98) a	0,13 (0,00 - 1,01) b	0,12 (0,00 - 1,70) b	0,12 (0,00 - 0,81) b	<0,001

Os resultados estão expressos em mediana (intervalo). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). cMo: monócitos clássicos; iMo: monócitos intermediários; ncMo: monócitos não clássicos; TiMas: macrófagos tissulares (iMo + ncMo); DCs: células dendríticas; pDC: célula dendrítica plasmocitóide; cDC: célula dendrítica clássica/mieloide.

APÊNDICE J – Avaliação das citocinas, MPO e NO

Variável	Controle	Leve	Moderado	Grave	Crítico	P
MPO ($\mu\text{M/mL}$)	101,0 (70 – 155) a	111,5 (67 – 195) a,b	139,5 (43 – 261) b,c	141,0 (36 – 301) b,c	171,0 (72 – 280) c	<0,001
NO (μM)	65,5 (31 – 284) a	35,5 (6 – 440) b	30,0 (9 – 246) b	21,5 (8 – 139) b	18,0 (7 – 117) b	<0,001
IL-12p70 (pg/mL)	6,30 (5,30 – 11,00) a	8,45 (6,70 – 10,80) b	8,88 (7,10 – 9,90) b	8,25 (6,50 – 22,20) b	8,60 (6,90 – 51,20) b	<0,001
TNF- α (pg/mL)	7,75 (4,10 – 16,20)	8,65 (4,50 – 18,30)	8,32 (3,20 – 44,90)	7,65 (3,90 – 22,80)	8,50 (2,50 – 25,70)	0,295
IL-10 (pg/mL)	7,55 (5,40 – 16,20) a	9,50 (7,40 – 17,90) a	11,70 (7,50 – 56,30) b	11,30 (8,00 – 48,30) b	13,20 (9,00 – 90,20) b	<0,001
IL-6 (pg/mL)	10,80 (7,40 – 21,80) a	10,80 (8,30 – 34,20) a	24,90 (9,20 – 350,50) b	24,95 (8,30 – 486,30) b	41,90 (11,70 – 3177,30) b	<0,001
IL-1 β (pg/mL)	8,85 (7,00 – 13,90)	8,75 (6,10 – 12,80)	8,65 (6,60 – 21,00)	8,80 (7,40 – 11,40)	8,80 (6,40 – 23,10)	0,371
IL-8 (pg/mL)	16,85 (9,40 – 30,20) a, b	16,25 (6,50 – 37,70) a	18,25 (9,80 – 104,20) a	19,75 (11,00 – 391,00) b, c	28,00 (12,90 – 174,80) c	<0,001
IL-17A (pg/mL)	39,70 (1,00 – 110,20) a	17,95 (1,00 – 984,70) a, b	9,7 (0 – 443,90) b, c	6,10 (0 – 551,80) c	5,40 (0 – 958,50) c	<0,001
IFN- γ (pg/mL)	5,10 (3,70 – 19,80) a	6,45 (2,20 – 239,90) a, b	7,50 (3,00 – 37,10) b	6,40 (3,10 – 22,70) a, b	7,30 (2,40 – 24,30) b	0,002
IL-4 (pg/mL)	10,65 (4,20 – 38,20) a	14,20 (0,10 – 54,30) b	10,85 (5,20 – 42,00) a, b	11,45 (6,10 – 25,80) a, b	11,50 (4,60 – 52,00) a, b	0,008
IL-2 (pg/mL)	6,58 (2,30 – 11,60) a	9,80 (5,80 – 12,70) b	8,70 (4,30 – 27,00) a, b	8,25 (5,20 – 14,10) a, b	8,90 (6,60 – 16,70) b	<0,001

Os resultados estão expressos em mediana (intervalo). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$). MPO: mieloperoxidase; NO: óxido nítrico; IL: interleucina; TNF: fator de necrose tumoral; IFN: interferon.

APÊNDICE K – Relação dos parâmetros avaliados com a mortalidade

Tabo 1 – Celularidade total da amostra

Variável	Desfecho		Man-Whitney P
	Sobreviventes (n = 134)	Óbitos (n = 23)	
Neutrófilos (% de leucócitos)	80,05 (35,51 - 94,07)	90,12 (74,63 - 95,79)	<0,001
Neutrófilos/mm ³	6117,74 (974,87 - 17905,29)	9996,76 (3380,74 - 14634,90)	<0,001
Monócitos (% de leucócitos)	5,86 (1,51 - 23,29)	3,84 (1,10 - 7,39)	0,001
Basófilos (% de leucócitos)	0,07 (0 - 0,98)	0,02 (0 - 0,19)	0,001
Basófilos/mm ³	5,11 (0 - 73,71)	2,17 (0 - 16,14)	0,006
Linfócitos totais (% de leucócitos)	13,79 (2,51 - 49,64)	5,33 (1,88 - 17,82)	<0,001
Linfócitos T (% de leucócitos)	8,60 (1,36 - 32,95)	2,91 (0,80 - 10,73)	<0,001
Linfócitos T/mm ³	715,82 (23,33 - 2703,50)	315,69 (102,64 - 1066,91)	<0,001
Linfócitos T CD4 ⁺ (% de leucócitos)	5,28 (0,82 - 26,03)	1,85 (0,57 - 6,92)	<0,001
Linfócitos T CD4 ⁺ /mm ³	454,68 (18,41 - 1988,97)	209,51 (73,13 - 707,25)	<0,001
Linfócitos T CD8 ⁺ (% de leucócitos)	2,73 (0,05 - 15,39)	0,71 (0,21 - 5,14)	<0,001
Linfócitos T CD8 ⁺ /mm ³	211,11 (4,49 - 1178,86)	68,61 (26,94 - 486,71)	<0,001
Linfócitos T $\gamma\delta^+$ (% de leucócitos)	0,19 (0,01 - 4,71)	0,06 (0,005 - 0,77)	<0,001
Linfócitos T $\gamma\delta^+$ /mm ³	15,80 (0,10 - 363,05)	6,28 (0,77 - 37,44)	0,001
Linfócitos T DP (% de leucócitos)	0,04 (0 - 1,30)	0,02 (0 - 0,22)	0,012
Linfócitos T DN (% de leucócitos)	0,07 (0 - 2,77)	0,03 (0,01 - 0,16)	<0,001
Linfócitos T DN/mm ³	5,69 (0 - 179,54)	1,74 (0,76 - 20,41)	0,005
Linfócitos B (% de leucócitos)	2,61 (0,40 - 14,13)	1,34 (0,39 - 3,84)	<0,001
Linfócitos B/mm ³	201,48 (16,84 - 905,73)	122,54 (44,87 - 299,10)	0,002
NK (% de leucócitos)	1,80 (0,24 - 13,49)	0,60 (0,07 - 4,71)	<0,001
NK/mm ³	140,46 (7,22 - 959,14)	61,44 (8,36 - 608,06)	0,001
NK 56 ⁺ (% de leucócitos)	0,06 (0,005 - 1,52)	0,02 (0,005 - 0,15)	<0,001
NK CD56 ⁺ /mm ³	4,84 (0,23 - 88,31)	2,75 (0,59 - 20,01)	0,005
NKT (% de leucócitos)	0,41 (0,01 - 5,85)	0,18 (0,03 - 1,65)	0,035
Monócitos CD56 ⁺	16,42 (0,79 - 55,92)	22,35 (3,74 - 78,60)	0,011
RNL	5,69 (0,83 - 37,47)	17,04 (4,18 - 50,36)	<0,001

Os resultados estão expressos em mediana (intervalo). T CD4⁺: linfócitos T CD4⁺; T CD8⁺: linfócitos T CD8⁺; T DP: linfócitos T duplo-positivos (CD4⁺ CD8⁺); T DN: linfócitos T duplo-negativos (CD4⁻ CD8⁻); T $\gamma\delta$: linfócitos T TCR $\gamma\delta$ ⁺; NK: natural killer; RNL: relação neutrófilo-linfócito.

Tubo 2 – Maturação dos linfócitos T e expressão de HLA-DR

Variável	Desfecho		Man-Whitney P
	Sobreviventes (n = 134)	Óbitos (n = 23)	
T CD4 N/mm ³	126,92 (3,15 - 725,16)	70,01 (15,85 - 299,41)	0,002
T CD4 CM/mm ³	122,59 (0,72 - 798,89)	65,74 (0,52 - 228,72)	0,001
T CD4 EM/mm ³	108,43 (0,39 - 796,43)	42,58 (0,15 - 300,16)	0,001
T CD4 EMRA/mm ³	22,09 (0,35 - 1131,32)	10,82 (0,23 - 86,42)	0,029
T CD8 N (%TCD8 ⁺)	21,39 (1,76 - 62,76)	12,00 (3,20 - 74,35)	0,001
T CD8 N/mm ³	48,05 (0,69 - 328,22)	10,50 (1,28 - 51,26)	<0,001
T CD8 CM/mm ³	20,51 (0,01 - 211,73)	7,90 (0,35 - 53,15)	<0,001
T CD8 EM/mm ³	54,02 (0,04 - 450,38)	23,58 (0,08 - 283,63)	0,001
T CD8 EMRA (%TCD8 ⁺)	30,53 (3,57 - 94,04)	41,54 (5,85 - 71,78)	0,023
T CD8 EMRA/mm ³	56,83 (0,50 - 512,86)	28,83 (3,10 - 191,69)	0,029
T CD4 HLA-DR ⁺ (%TCD4 ⁺)	28,83 (2,78 - 28,64)	8,77 (3,23 - 34,12)	0,029
T CD4 HLA-DR ⁺ /mm ³	33,36 (1,13 - 177,96)	21,84 (3,87 - 116,20)	0,015
T CD8 HLA-DR ⁺ (%TCD8 ⁺)	20,29 (4,66 - 59,30)	29,17 (7,27 - 89,04)	0,045
T CD8 HLA-DR ⁺ /mm ³	37,88 (0,47 - 407,18)	18,49 (4,69 - 433,36)	0,016

Os resultados estão expressos em mediana (intervalo). T CD4⁺ CM: linfócitos T CD4⁺ de memória central; T CD4⁺ EM: linfócitos T CD4⁺ efetores de memória; T CD4⁺ EMRA: linfócitos T CD4⁺ efetores terminais; T CD8⁺ CM: linfócitos T CD8⁺ de memória central.

Tubo 3 – Ativação dos linfócitos T

Variável	Desfecho		Man-Whitney P
	Sobreviventes (n = 134)	Óbitos (n = 23)	
TCD4 CD28 ⁺ CD57 ⁻ (% TCD4 ⁺)	95,82 (73,65 - 99,83)	91,19 (75,99 - 99,72)	0,023
TCD4 CD28 ⁺ CD57 ⁻ /mm ³	429,82 (18,24 - 1970,87)	170,11 (71,16 - 613,40)	<0,001
TCD4 CD28 ⁻ CD57 ⁻ (% TCD4 ⁺)	0,70 (0,01 - 15,16)	2,40 (0,03 - 13,32)	0,001
TCD8 CD28 ⁺ CD57 ⁻ (% TCD8 ⁺)	62,13 (11,22 - 96,49)	48,75 (20,16 - 95,14)	0,014
TCD8 CD28 ⁺ CD57 ⁻ /mm ³	116,62 (2,09 - 708,32)	37,15 (7,28 - 251,84)	<0,001
TCD8 CD28 ⁻ CD57 ⁻ (% TCD8 ⁺)	10,58 (0,14 - 62,81)	21,23 (1,55 - 47,28)	0,026
TCD8 CD28 ⁻ CD57 ⁻ /mm ³	40,83 (0,35 - 304,97)	22,94 (0,20 - 204,21)	0,020

Tubo 4 – Linfócitos Treg

Variável	Desfecho		Man-Whitney P
	Sobreviventes (n =134)	Óbitos (n = 23)	
Treg total/mm ³	6,19 (0,43 - 90,50)	1,64 (0,43 - 13,09)	0,001
Treg naïve (%TCD4 ⁺)	0,28 (0 - 2,85)	0,07 (0 - 1,36)	0,010
Treg naïve/mm ³	0,92 (0 - 46,74)	0,15 (0 - 2,01)	<0,001
Treg M/mm ³	4,64 (0,06 - 85,53)	1,31 (0,36 - 12,74)	0,009
CD8 ⁺ CD25 ⁺ (%TCD8 ⁺)	0,50 (0,05 - 71,43)	1,98 (0,09 - 69,87)	0,048

Os resultados estão expressos em mediana (intervalo). Treg: linfócitos T CD4⁺ regulatórios; Treg M: linfócitos T CD4⁺ regulatórios de memória.

Tubo 5 – Linfócitos B

Variável	Desfecho		Man-Whitney P
	Sobreviventes (n =134)	Óbitos (n = 23)	
Naïve/mm ³	135,72 (1,87 - 695,87)	87,63 (16,05 - 248,05)	0,009
Transicionais/mm ³	11,52 (0,07 - 98,59)	6,56 (0,33 - 22,62)	0,025
BM-NS/mm ³	12,72 (0,63 - 107,60)	6,31 (0,67 - 44,44)	0,002
BM-CS (% de linfócitos B)	11,98 (1,00 - 51,63)	9,66 (2,58 - 60,73)	0,041
BM-CS/mm ³	28,84 (1,05 - 235,38)	16,99 (3,62 - 52,21)	0,001
Plasmablastos (% de linfócitos B)	5,58 (0 - 65,45)	19,91 (0,89 - 52,68)	0,002
Plasmablastos/mm ³	10,77 (0 - 202,03)	25,30 (1,48 - 176,51)	0,029

Os resultados estão expressos em mediana (intervalo). BM-NS: linfócitos B de memória *non-switched*; BM-CS: linfócitos B de memória *class-switched*; BM-DN: linfócitos B de memória duplo-negativos (CD27⁻ IgD⁻).

Tubo 6 – Monócitos, DCs, citocinas, NO e MPO

Variável	Desfecho		Man-Whitney P
	Sobreviventes (n =134)	Óbitos (n = 23)	
NO (µM)	24 (6 - 440)	15 (9 - 84)	0,045
Monócitos CD62L+ (% de monócitos)	64,85 (4,76 - 98,49)	84,47 (17,11 - 96,80)	0,021
Monócitos CD56+ (% de monócitos)	16,42 (0,79 - 55,92)	22,35 (3,74 - 78,60)	0,11
Monócitos (% de leucócitos)	6,20 (1,02 - 22,27)	4,40 (1,10 - 8,41)	0,005
cMo (% de leucócitos)	5,57 (0,94 - 19,22)	4,05 (1,05 - 7,89)	0,009
HLA-DR Monócitos (IFM)	6930,46 (1912,91 - 61158,30)	3188,94 (1205,99 - 9616,78)	<0,001
HLA-DR cMo (IFM)	6255,70 (1699,50 - 54038,00)	2709,49 (1028,70 - 8271,30)	<0,001
HLA-DR iMo (IFM)	19020,39 (2833,30 - 128723,13)	7105,84 (2200,57 - 26722,52)	<0,001
HLA-DR ncMo (IFM)	11207,99 (1424,24 - 91910,08)	3845,75 (992,27 - 22081,84)	<0,001
HLA-DR TiMas (IFM)	16945,61 (2809,02 - 109464,50)	6861,76 (2234,02 - 26545,39)	<0,001
DCs (% de leucócitos)	0,06 (0 - 0,85)	0,01 (0 - 0,42)	<0,001
DCs totais/mm ³	4,58 (0 - 42,22)	1,54 (0 - 54,22)	0,003
mDC (% de leucócitos)	0,05 (0 - 0,52)	0,01 (0 - 0,40)	<0,001
mDC (% de DCs)	82,87 (19,93 - 100)	89,47 (39,78 - 100)	0,027
mDC/mm ³	3,86 (0 - 33,47)	1,54 (0 - 51,64)	0,006
pDC (% de leucócitos)	0,01 (0 - 0,03)	0 (0 - 0,03)	0,002
pDC (% de DCs)	17,13 (0 - 79,38)	10,53 (0 - 60,22)	0,027
pDC/mDC	0,21 (0 - 3,98)	0,12 (0 - 1,51)	0,027
IL-10 pg/mL	10,55 (7,4 - 56,3)	18,5 (9,8 - 90,2)	<0,001
IL-6 pg/mL	19,25 (8,3 - 2486,1)	46,5 (12,4 - 3177,3)	<0,001
IL-8 pg/mL	18,1 (6,5 - 391,0)	29,6 (13,4 - 174,8)	<0,001

Os resultados estão expressos em mediana (intervalo). cMo: monócitos clássicos; iMo: monócitos intermediários; ncMo: monócitos não clássicos; TiMas: macrófagos tissulares (iMo + ncMo); DCs: células dendríticas; pDC: células dendrítica plasmocitóide; cDC: célula dendrítica clássica/mieloide; NO: óxido nítrico; IL: interleucina.

ANEXO A - Aprovação no comitê de ética em pesquisa (CEP)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: RESPOSTA IMUNE DOS PACIENTES INFECTADOS PELO SARS-CoV-2, UM ESTUDO DE COORTE

Pesquisador: Maria Cláudia Santos da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 31124820.1.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.059.832

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa de grupo de pesquisadores, não apresentado como proposta de tese, dissertação ou TCC, sob coordenação da professora Marica Cláudia Santos da Silva do Departamento de Análises Clínicas/CCS/UFSC. Estudo de coorte prospectivo, com 300 participantes.

Crterios de inclusão: indivíduos com 18 anos ou mais, com suspeita de COVID-19, no período de agosto de 2020 a julho de 2021, e que assinaram ao termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Crterios de exclusão: gestantes, pacientes vivendo com HIV e pacientes oncológicos.

Intervenções: Coleta de amostras de sangue, questionário e consulta a prontuários.

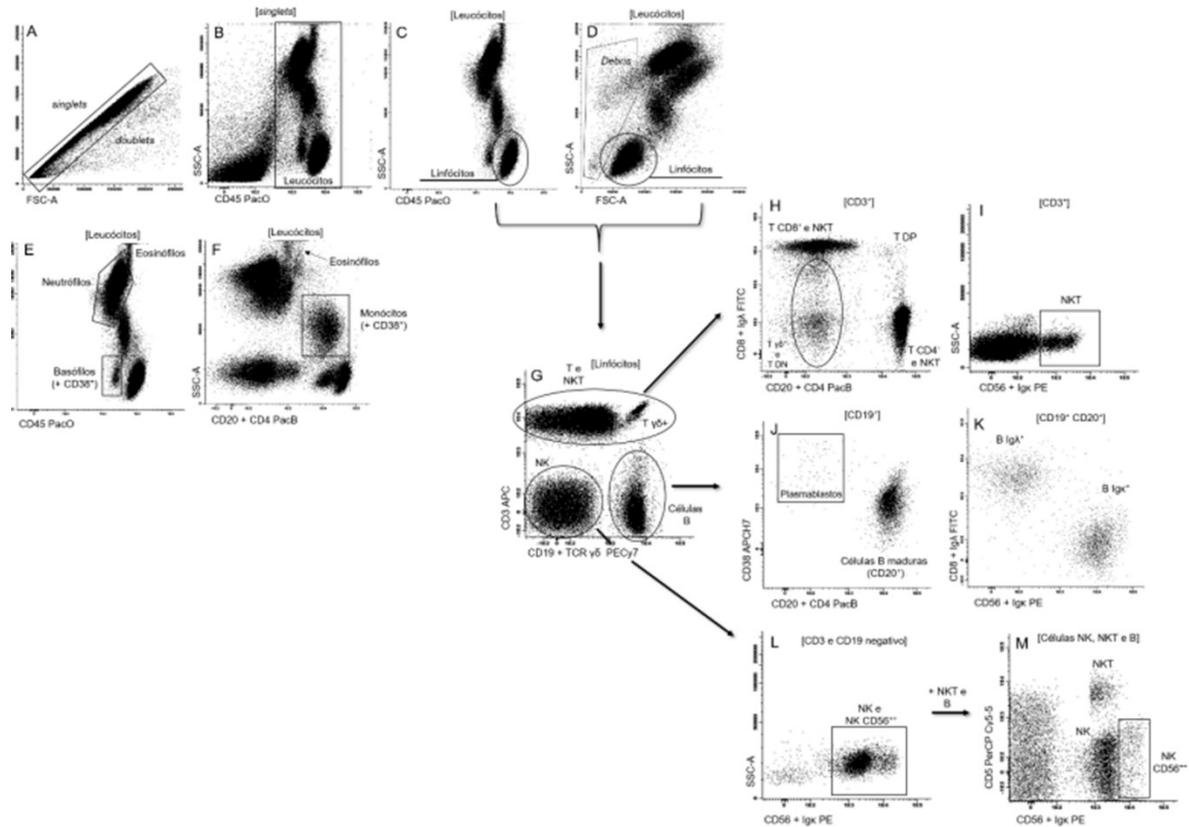
Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Investigar, por meio de um estudo de coorte, o comportamento das células circulantes do sistema imune, dos anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2, das citocinas plasmáticas e dos mediadores inflamatórios como biomarcadores de prognóstico em indivíduos infectados por SARS-CoV-2.

Objetivo Secundário: a. Avaliar por até 12 meses, em indivíduos infectados por SARS-CoV-2, os

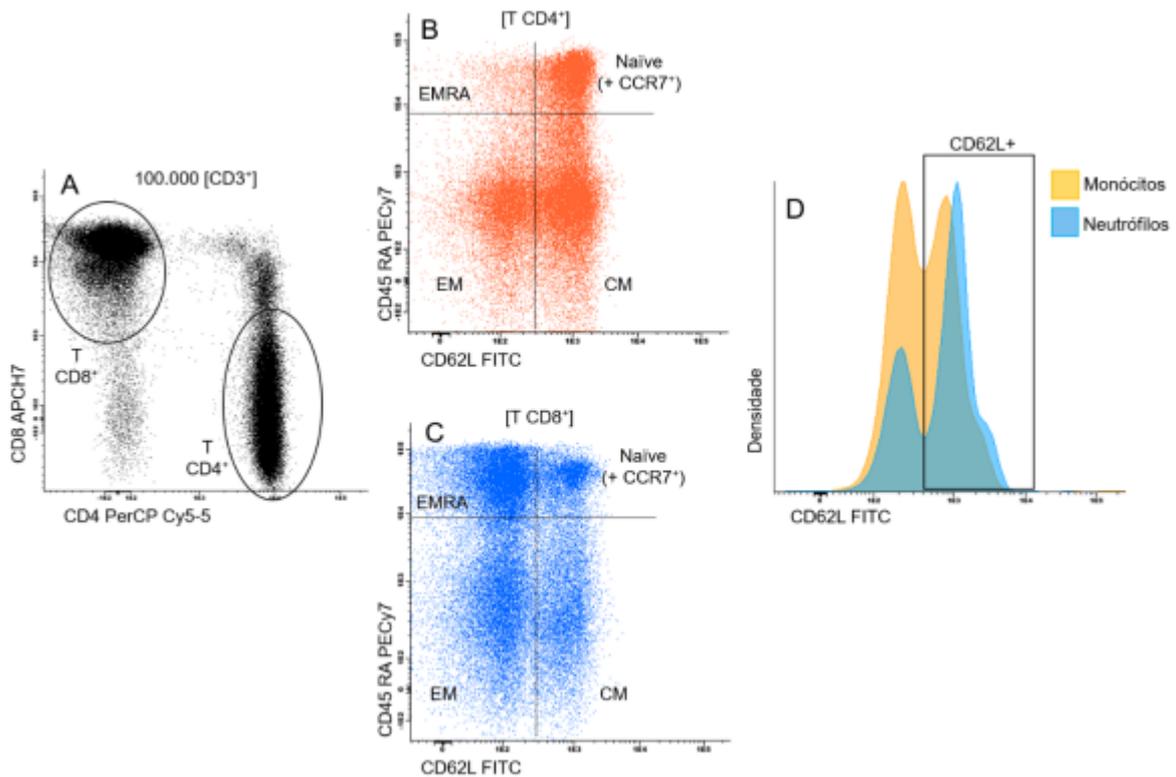
Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

ANEXO B – Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 1

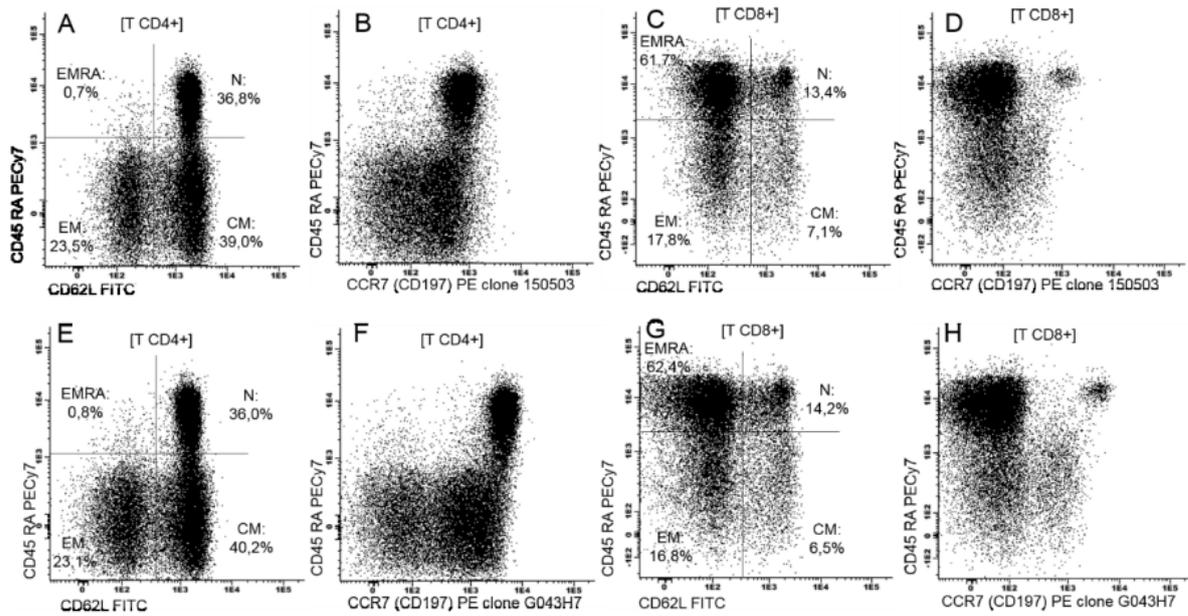


Painel A: doublets foram excluídos utilizando os parâmetros FSC-A versus FSC-H. Painel B: os leucócitos foram selecionados pela expressão do CD45 versus o parâmetro SSC-A. Painéis C e D: os linfócitos foram selecionados pelos parâmetros FSC-A versus SSC-A, juntamente com a expressão forte e homogênea de CD45. Além disso, os restos celulares (debris) foram excluídos. Essa estratégia de análise dos painéis A a D foram aplicadas a todos os tubos. Neutrófilos, basófilos, monócitos e eosinófilos foram separados pela sequência de análise mostrada nos painéis E e F. Painel G: os linfócitos selecionados foram subdivididos em células T e NKT, T $\gamma\delta^+$, B e NK. Painel H: os linfócitos T CD3⁺ foram subdivididos em T CD4⁺, T CD8⁺, T duplo-positivos (DP) e T duplo negativos (DN). Painel I: os linfócitos CD3⁺ CD56⁺ foram classificados como NKT. Painel J: as células CD19⁺ foram classificadas como células B maduras e plasmablastos. Painel K: as células B maduras podem ser categorizadas como B Ig κ ⁺ ou B Ig λ ⁺ para determinar a relação Ig κ /Ig λ (clonalidade). Painel L: os linfócitos CD3 e CD19 negativos foram subdivididos de acordo com a expressão de CD56 em células NK CD56^{fraco} e células NK CD56⁺⁺. Painel M: análise das células NK e NKT com relação à expressão de CD5 e de CD56. +: expressão moderada; ++: expressão forte; APC: alofocianina; APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PacB: Pacific Blue/V450; PacO: Pacific Orange/V500; PE: ficoeritrina; PECy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5-5: peridina-clorofila-proteína; Ig: imunoglobulina. Fonte: CARDOSO; SANTOSSILVA, 2019.

ANEXO C – Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 2

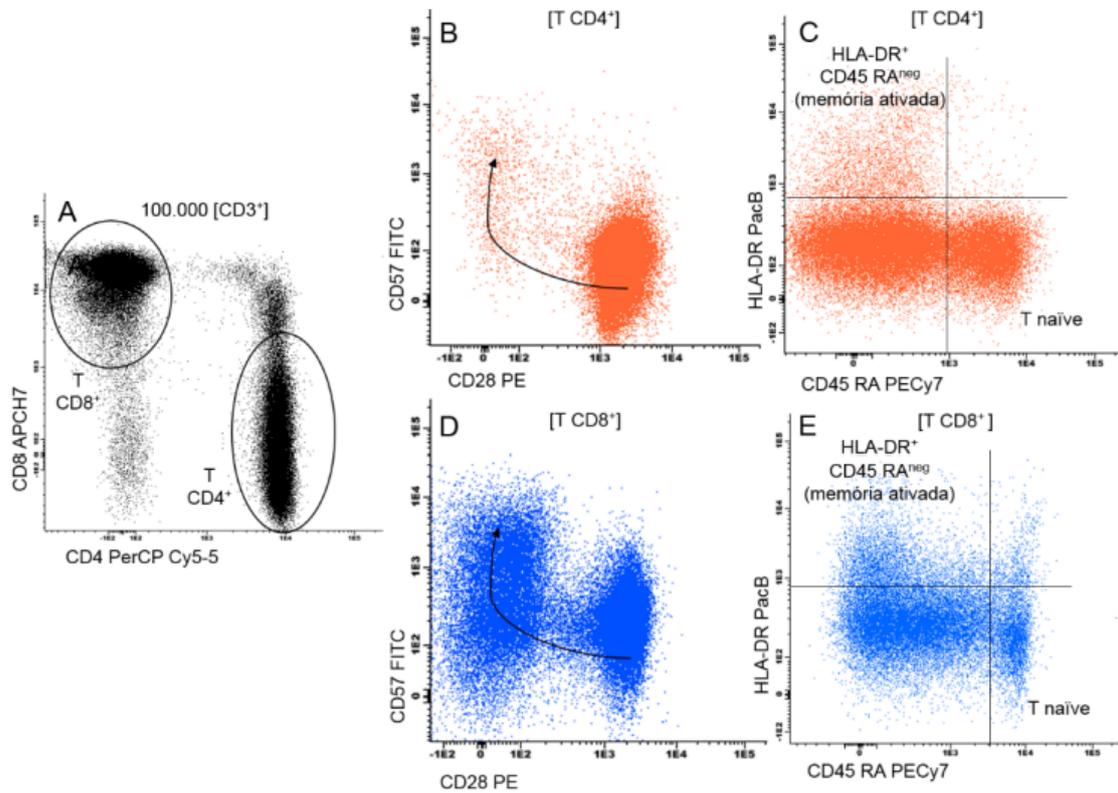


Painel A: linfócitos CD3⁺ foram selecionados (100.000 eventos CD3⁺ foram salvos) e subdivididos em T CD4⁺ e T CD8⁺. Painéis B e C: os linfócitos T CD4⁺ (laranja) e T CD8⁺ (azul) foram classificados como naïve (CD62L⁺, CD45RA⁺, CCR7⁺), memória central (CM) (CD62L⁺ CD45RAneg), memória efetora (EM) (CD62Lneg CD45RAneg) e efetora terminal CD45RA (EMRA) (CD62Lneg CD45RA⁺). Painel D: histograma normalizado com a avaliação da porcentagem de neutrófilos e monócitos CD62L⁺. APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PECy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5-5: peridina-clorofila-proteína; +: expressão moderada; neg: ausência de expressão. Fonte (adaptado): CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019.



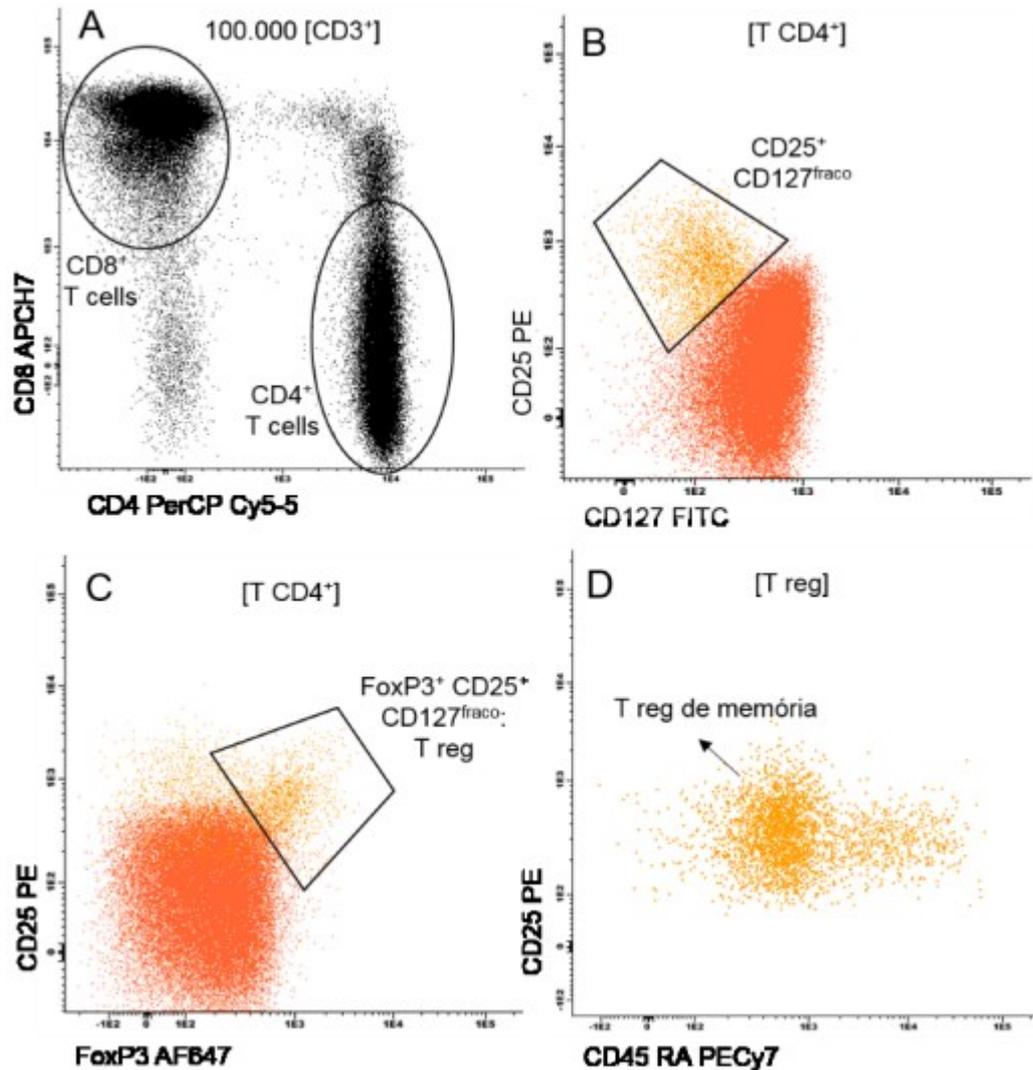
Painéis A, B, C e D: diferenças entre CD62L e CCR7 clone 150503. Painéis E, F, G e H: diferenças entre CD62L e CCR7 clone G043H7. Entre os dois clones testados, o G043H7 apresentou melhor marcação, especialmente na separação dos subtipos CM e EM. FITC: isotiocianato de fluoresceína; PECy7: ficoeritrina Cy7; PE: ficoeritrina; N: naïve; CM: memória central; EM: memória efetora; EMRA: efetora terminal CD45RA⁺. Fonte: CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019.

ANEXO D – Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 3



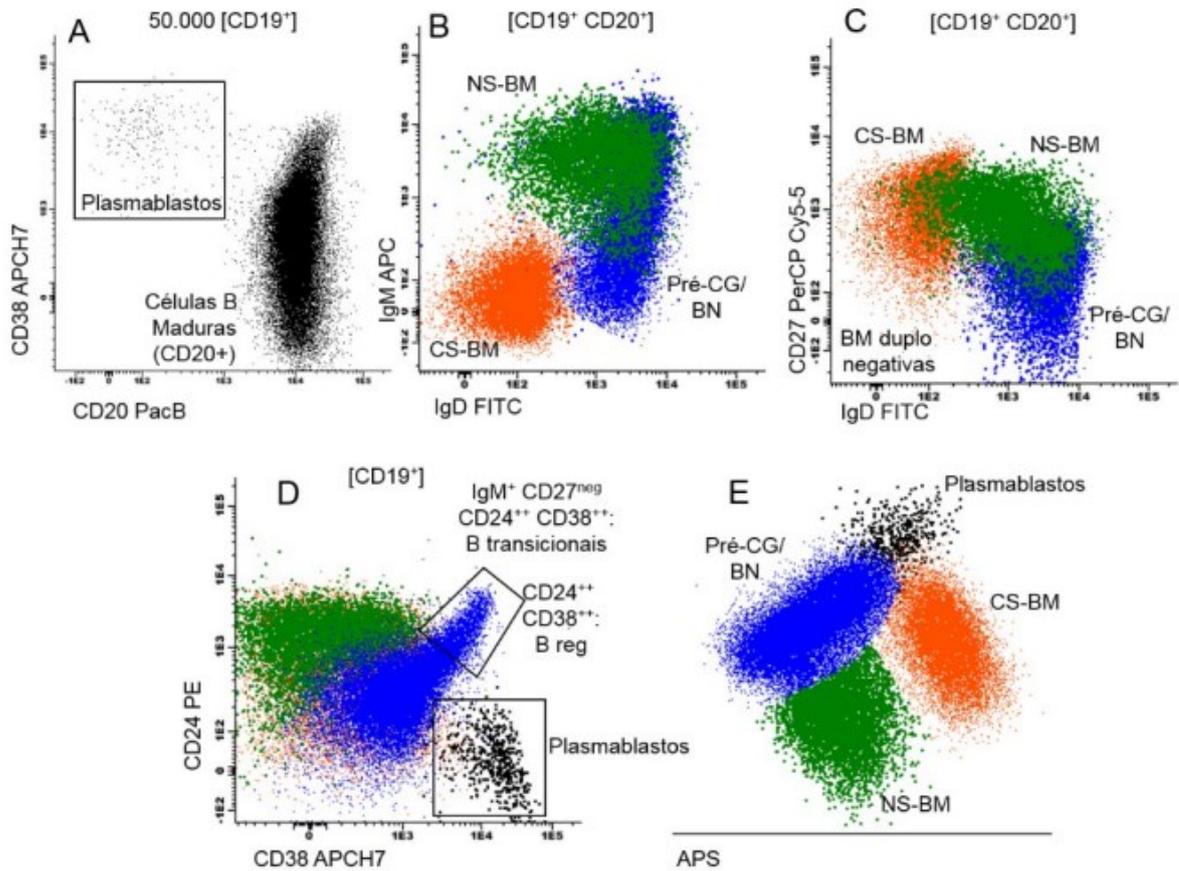
Painel A: linfócitos CD3+ foram selecionados (100.000 eventos CD3+ foram salvos) e subdivididos em T CD4+ e T CD8+ . Os linfócitos T CD4+ (laranja) foram classificados de acordo com a expressão de CD28 (recém diferenciados) e de CD57 (diferenciação terminal) (Painel B) e pela expressão de HLA-DR e CD45RA (Painel C). Os linfócitos T CD8+ (azul) foram classificados de acordo com a expressão CD28 (recém diferenciados) e de CD57 (diferenciação terminal) (Painel D) e pela expressão de HLA-DR e CD45RA (Painel E). A seta nos painéis B e D mostram o caminho de ativação. APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PacB: Pacific Blue/V450; PE: ficoeritrina; PECy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5-5: peridina-clorofila-proteína; +: expressão moderada; neg: ausência de expressão. Fonte (adaptado): CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019.

ANEXO E – Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 4



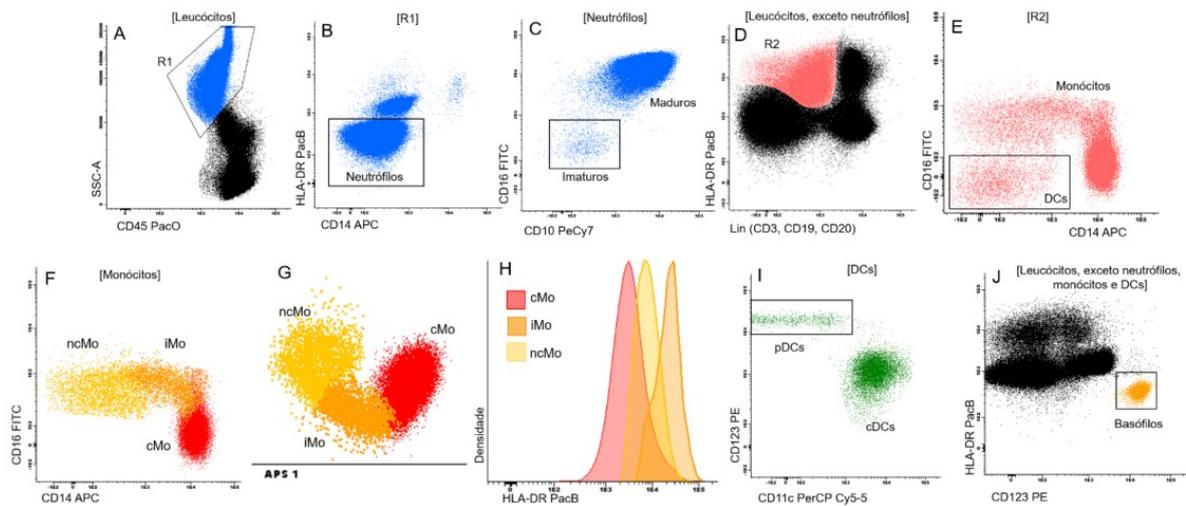
Painel A: linfócitos CD3+ foram selecionados (100.000 eventos CD3+ foram salvos) e subdivididos em T CD4+ e T CD8+. Os linfócitos T CD4+ (laranja) foram classificados de acordo com a expressão de CD127fraco CD25+ (Painel B) e, posteriormente, em CD25+ FoxP3+, as quais representam as T reg (Painel C). Painel D: a maior parte das T reg pode ser classificada como célula de memória (CD45RAneg). AFB47: Alexa Fluor 647; APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PECy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5-5: peridina-clorofila-proteína; + : expressão moderada; fraco: expressão fraca. Fonte: CARDOSO; SANTOSSILVA, 2019.

ANEXO F – Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 5



Painel A: células linfoides B foram selecionadas (50.000 eventos CD19+ foram salvos) e subdivididos em células B maduras e plasmablastos. Na sequência, as células B maduras foram classificadas em células B pré-CG ou B naïve (BN) (em azul), non-switched (NS) B de memória (BM) (em verde) e em class-switched (CS)-BM e BM duplo negativas (em laranja) de acordo com a expressão das imunoglobulinas IgD e IgM (Painel B) em conjunto com a expressão de CD27 (Painel C). As células B transicionais e B reg foram classificadas pela expressão forte de CD24 e CD38 (sobreposição fenotípica), e os plasmablastos, pela expressão forte de CD38 (Painel D) e de CD27++ (não mostrado). Painel E: separador automático de populações (APS) e os subtipos de células B. +: expressão moderada; ++: expressão forte; neg: negativo; CG: centro germinativo; APC: alofocianina; APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PacB: Pacific Blue/V450; PE: ficoeritrina; PerCP Cy5-5: peridina-clorofila-proteína; Ig: imunoglobulina. Fonte (adaptado): CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019.

ANEXO G – Estratégia de análise dos subtipos celulares no Tubo 6



Painel A: os leucócitos foram identificados pela expressão de CD45 e SSC-A e a região 1 (R1) foi selecionada. Painel B: com a R1 selecionada, os neutrófilos (em azul) foram identificados pela ausência de expressão de HLA-DR e CD14. Painel C: com os neutrófilos selecionados, pode-se identificar a presença de formas imaturas pela ausência de expressão de CD16 e de CD10. Painel D: após classificar os neutrófilos, pela expressão de HLA-DR e Lin (linhagem) pode-se selecionar a região 2 (R2) que representa a ausência de expressão de marcadores de linhagem T e B com expressão de HLA-DR. Painel E: com a R2 selecionada, os monócitos podem ser separados das DCs pela expressão de CD16 e CD14. Painel F: classificação dos monócitos em clássicos, intermediários e não-clássicos pela expressão de CD16 e CD14. Painel G: separador automático de populações (APS) e os subtipos de monócitos. Painel H: histograma normalizado com a expressão de HLA-DR na superfície dos três subtipos de monócitos. Painel I: classificação das DCs em cDCs (CD11c +) e pDCs (CD123+). Painel J: identificação dos basófilos pela expressão de CD123 e ausência de HLA-DR. DCs: células dendríticas; cDCs: DCs clássicas; pDCs: DCs plasmocitoides; Lin: linhagem; cMo: monócitos clássicos; iMo: monócitos intermediários; ncMo: monócitos não-clássicos; APC: alofocianina; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PacB: Pacific Blue/V450; PacO: Pacific Orange/V500; PE: ficoeritrina; PECy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5-5: peridina-clorofila-proteína. Fonte (adaptado): CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019.