

GABRIELA PROFÍRIO JARDIM SANTOS

**PERFIL DE MEDIADORES SÉRICOS SOLÚVEIS EM PACIENTES COM  
COVID-19 GRAVE**

Brasília, 2025

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

GABRIELA PROFÍRIO JARDIM SANTOS

**PERFIL DE MEDIADORES SÉRICOS SOLÚVEIS EM PACIENTES COM  
COVID-19 GRAVE**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas pelo programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof. Dra. Licia Maria Henrique da Mota

Coorientador: Prof. Dr. Olindo Assis Martins-Filho.

Brasília, 2025  
GABRIELA PROFÍRIO JARDIM SANTOS

**PERFIL DE MEDIADORES SÉRICOS SOLÚVEIS EM PACIENTES COM  
COVID-19 GRAVE**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas pelo programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dra. Licia Maria Henrique da Mota (Presidente)  
Prof. Dra. Cláudia Diniz Lopes Marques (Membro)  
Prof. Dr. Leopoldo Luiz dos Santos Neto (Membro)  
Prof. Dr. Marcelo de Medeiros Pinheiro (Membro)  
Prof. Dra. Clarissa de Castro Ferreira (Suplente)

Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas –UnB

*Dedico este trabalho à minha família, cujo apoio e incentivo constantes  
me permitiram crescer e alcançar meus objetivos.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me ter concedido saúde e discernimento em todas as etapas da realização da tese, mesmo nos momentos de desânimo, concedendo força e sabedoria.

Ao meu pai, que mesmo na sua ausência, seus ensinamentos continuam vivos em mim. Agradeço por ter me mostrado que a excelência e perseverança são fundamentais para a realização de um trabalho de qualidade.

Ao meu marido Leo, meu amor e maior motivador. Nos momentos certos, sabe exatamente quando preciso de um incentivo e me faz acreditar em mim mesma.

Aos meus filhos, Sofia, Heitor e Davi, vocês são a minha maior inspiração. Ver vocês crescer e aprender me inspira a sempre ser mais, a dar o meu melhor e a ser um exemplo para vocês.

À Profa. Dra. Licia Maria Henrique da Mota, sou profundamente grata por acreditar no meu potencial e me dar a chance de realização desse trabalho sob sua orientação.

Ao Prof. Dr. Olindo Assis Martins-Filho, agradeço pelas longas horas dedicadas a realizar, aperfeiçoar e interpretar as análises estatísticas, garantindo a qualidade e precisão dos resultados.

Às Dras. Maíra Rocha Machado de Carvalho, Heide Luise Schulte, Francielle Pulcinelli Martins e Eliana Teles de Góis, sou grata por estarmos juntas nessa jornada, mesmo em meio à pandemia, quando o medo e a incerteza pareciam dominar, iniciamos este projeto com coragem e determinação.

À banca examinadora de doutores Clarissa de Castro Ferreira, Cláudia Diniz Lopes Marques, Leopoldo Luiz dos Santos Neto, Marcelo de Medeiros Pinheiro, pela contribuição de aperfeiçoamento do trabalho para a defesa final.

*“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano”.*

Sir Isaac Newton

## **Resumo**

O presente estudo aplicou modelos distintos de análise descritiva para explorar as redes integrativas e a linha do tempo cinética dos mediadores séricos solúveis, para selecionar um conjunto de biomarcadores sistêmicos aplicáveis ao manejo clínico de pacientes com COVID-19. Para esse propósito, um total de 246 participantes (82 COVID-19 e 164 controles saudáveis – HC) foram incluídos em um estudo observacional prospectivo. Os mediadores séricos solúveis foram quantificados na admissão hospitalar (D0) e em pontos de tempo consecutivos (D1-6 e D7-20). Os resultados reforçam que o grupo COVID-19 exibiu uma tempestade massiva de mediadores séricos solúveis. Enquanto níveis aumentados de CCL3 e G-CSF foram associados ao prognóstico favorável de ventilação não mecânica (nMV) ou alta, altos níveis de CXCL10 e IL-6 foram observados em pacientes que progrediram para ventilação mecânica (MV) ou óbito. No momento da admissão, os pacientes com COVID-19 apresentavam uma rede complexa e robusta de mediadores séricos solúveis, com um maior número de correlações fortes envolvendo IFN- $\gamma$ , IL-1Ra e IL-9 observadas em pacientes que progrediram para MV ou óbito. A análise de regressão multivariada demonstra a capacidade dos mediadores solúveis séricos de agrupar a COVID-19 da HC. As assinaturas de magnitude e a análise da linha do tempo cinética confirmaram ainda que os pares “CCL3 e G-CSF” e “CXCL10 e IL-6” estavam associados a prognóstico favorável ou ruim, respectivamente. Um conjunto selecionado de mediadores sistêmicos, incluindo IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-1Ra, IL-13, PDGF e IL-7, foi identificado como marcadores laboratoriais putativos, potencialmente aplicáveis como registros complementares para o manejo clínico de pacientes com COVID-19 grave.

## **ABSTRACT**

The present study applied distinct models of descriptive analysis to explore the integrative networks and the kinetic timeline of serum soluble mediators to select a set of systemic biomarkers applicable for the clinical management of COVID-19 patients. For this purpose, a total of 246 participants (82 COVID-19 and 164 healthy controls – HC) were enrolled in a prospective observational study. Serum soluble mediators were quantified on hospital admission (D0) and at consecutive timepoints (D1-6 and D7-20). The results reinforce that the COVID-19 group exhibited a massive storm of serum soluble mediators. While increased levels of CCL3 and G-CSF were associated with the favorable prognosis of non-mechanical ventilation (nMV) or discharge, high levels of CXCL10 and IL-6 were observed in patients progressing to mechanical ventilation (MV) or death. At the time of admission, COVID-19 patients presented a complex and robust serum soluble mediator network, with a higher number of strong correlations involving IFN- $\gamma$ , IL-1Ra and IL-9 observed in patients progressing to MV or death. Multivariate regression analysis demonstrates the ability of serum soluble mediators to cluster COVID-19 from HC. Ascendant fold change signatures and the kinetic timeline analysis further confirmed that the pairs “CCL3 and G-CSF” and “CXCL10 and IL-6” were associated with favorable or poor prognosis, respectively. A selected set of systemic mediators (IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-1Ra, IL-13, PDGF and IL-7) were identified as putative laboratory markers, applicable as complementary records for the clinical management of patients with severe COVID-19.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação taxonômica e posições para os CoVs conhecidos .....	18
Figura 2 – Estrutura Coronavírus. As proteínas estruturais e RNA viral .....	19
Figura 3 – Transmissão dos Coronavírus .....	21
Figura 4 – Ligação e entrada do CoV nas células das vias aéreas .....	23
Figura 5 – Sítio de clivagem da furina de S1/S2 no SARS-CoV-2 .....	23
Figura 6 – Ligação do vírus, internalização em células epiteliais e replicação .....	24
Figura 7 – Reconhecimento do SARS-CoV-2 por RRP.....	27
Figura 8 – Representação esquemática da ativação do inflamassoma NLRP3 .....	29
Figura 9 – Visão geral da população de estudo .....	58
Figura 10 – Perfil geral de mediadores séricos solúveis em pacientes com COVID-19 grave na admissão hospitalar (D0).....	60
Figura 11 – Matrizes de correlação e redes de mediadores séricos solúveis em pacientes com COVID-19 grave na admissão hospitalar (D0) .....	63
Figura 12 – Análise multivariada de mediadores séricos solúveis em pacientes com COVID-19 grave de acordo com o desfecho da doença .....	65
Figura 13 – Magnitude de alterações dos mediadores séricos solúveis na admissão hospitalar (D0) de pacientes com COVID-19 grave de acordo com o desfecho da doença .....	65

..... 67

Figura 14 – Cinética temporal da magnitude de alterações dos mediadores séricos solúveis em pacientes com COVID-19 grave de acordo com o desfecho da doença ..... 69

..... 69

Figura 15 – Cinética temporal da magnitude de alterações dos mediadores séricos solúveis em pacientes com COVID-19 grave de acordo com o desfecho da doença ..... 72

..... 72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mediadores séricos solúveis na tempestade de citocinas .....	40
Tabela 2 – Características Populacionais .....	59
Tabela 3 – Perfil panorâmico de mediadores séricos solúveis medidos na admissão hospitalar (D0) em pacientes com COVID-19 grave, de acordo com o desfecho da doença .....	61
Tabela 4 – Índices de desempenho dos mediadores séricos solúveis medidos na admissão (D0) para classificar pacientes com COVID-19 grave, segundo o desfecho da doença .....	75
Tabela 5 – Índices de desempenho das alterações nos níveis de mediadores séricos solúveis ao longo da linha do tempo (D1–6/D0) .....	77
Tabela Suplementar 1 – Limite mínimo de detecção (LLOD) – Bio-Plex ProTM Human Cytokine.....	113

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ACE 2: Enzima Conversora de Angiotensina 2

AT2: Angiotensina 2

CIVD: Coagulação Intravascular Disseminada

CoV: Coronavírus

COVID-19: Doença do Coronavírus de 2019 (do inglês *Corona Virus Disease 2019*)

DAMPs: Padrões Moleculares Associados a Danos

DCs: Células Dendríticas

ELISA: Ensaio de Imunoadsorção Enzimática)

FDA: Food and Drug Administration)

FNT: Fator de Necrose Tumoral

G-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos

GM-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos-Macrófagos

GSDMD: Gasdermina D

ICTV: Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

IFN: Interferon

IFNR: Receptores de Interferon

IFNAR: cadeia alfa do receptor de interferon-alfa/beta

ILs: Interleucinas

IL-1RI: Receptor de IL-1 Tipo I

IL-18R $\alpha$ : Receptor  $\alpha$  de IL-18

ISGs: Genes Estimulados por IFNs

ISREs: Elementos de Resposta Estimulados por Interferon

JAK1: Janus Quinase 1

LBA: Lavado Broncoalveolar

LCR: Líquido Cefalorraquidiano

LRA: Lesão Renal Aguda

MAVS: Proteína de Sinalização Antiviral Mitocondrial

MCP-1/CCL2: Proteína Quimiotática de Monócitos-1

MDA5: Gene 5 Associado à Diferenciação do Melanoma

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade

MIP-1 $\alpha$ /CCL3: Proteína Inflamatória de Macrófagos-1 alfa

MO: Medula Óssea

NAAT: Testes de Amplificação de Ácido Nucleico

NETs: Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos

NLRs: Receptores Semelhantes a NOD

NSP: Proteína não Estrutural

NF-k $\beta$ : Fator Nuclear Associado ao Membro da Família TRAF

OMS: Organização Mundial de Saúde

PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBMCs: Células Mononucleares do Sangue Periférico

PCA: Análise de Componentes Principais

PF: Peptídeo de Fusão

RAT: Teste Rápido de Antígeno

RE: Retículo Endoplasmático

REG: Retículo Endoplasmático Rugoso

RIG-I: Sensores Citosólicos Gene 1 Induzível por Ácido Retinóico

RRPs: Receptores de Reconhecimento de Patogénos

RT-qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real

SARS-CoV-2: Síndrome Respiratória Aguda Grave por Coronavírus 2 (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome - Coronavirus-2*)

SDRA: Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

SIRS: Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica

SNC: Sistema Nervoso Central

TBK1: Ativador de Ligação à Quinase 1

TGF-β: Fator de Crescimento Transformador Beta

TLRs: Receptores Toll Like

TNF-α: Fator de Necrose Tumoral Alfa

TMPRSS2: Protease Transmembrana Serina 2

TRAF3: fator 3 associado ao receptor do fator de necrose tumoral

TRIF: Interferon-β Indutor de Adaptador Contendo Domínio TIR

TYK2: Tirosina Quinase 2

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 COVID-19.....	16
1.2 Coronavírus.....	17
1.3 SARS-CoV-2 .....	20
1.4 Ciclo Viral do SARS-CoV-2 .....	22
1.5 Ativação do Sistema Imune .....	25
1.5.1 Apresentação do antígeno .....	25
1.5.2 Resposta Imune Inata .....	26
1.5.3 Resposta Imune Adaptativa.....	30
1.5.4 Mediadores Séricos Solúveis na COVID-19.....	33
1.5.5 Tempestade de Citocinas.....	39
1.6 Fisiopatologia.....	41
1.7 Manifestações Clínicas .....	45
1.8 Métodos Diagnósticos .....	48
1.9 Tratamento .....	49
2. JUSTIFICATIVA.....	51
3. OBJETIVOS.....	52
3.1 Objetivo geral .....	52
3.2 Objetivos específicos .....	52
4. MÉTODOS.....	53
4.1 Desenho do Estudo .....	53
4.2 População .....	53
4.3 Amostras Biológicas.....	54
4.4 Análise Estatística .....	55
4.5 Redação e Revisão .....	57
5. RESULTADOS .....	58
5.1 Perfil da População Estudada .....	59
5.2 Perfil Geral de Mediadores Séricos Solúveis em Pacientes com COVID-19 Grave no Momento da Admissão Hospitalar .....	59
5.3 Análise de Redes Integrativas de Mediadores Séricos Solúveis em Pacientes com COVID-19 Grave na Admissão Hospitalar .....	62
5.4 Análise Multivariada de Mediadores Séricos Solúveis em Pacientes com COVID-19 Grave na Admissão Hospitalar.....	64

5.6 Cinética Temporal da Magnitude de Alterações dos Mediadores Séricos Solúveis em Pacientes com COVID-19 Grave de Acordo com o Desfecho da Doença .....	68
5.7 Desempenho de Mediadores Séricos Solúveis para Classificar Pacientes com COVID-19 Grave de Acordo com o Desfecho da Doença .....	71
6. DISCUSSÃO.....	78
6.1 Descrição da Amostra Populacional .....	78
6.2 Mediadores Séricos Solúveis .....	79
6.3 Limitações .....	89
6.4 Perspectivas .....	91
7. CONCLUSÃO.....	92
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 COVID-19

No final de 2019, um grupo de pacientes com pneumonia de etiologia desconhecida foi identificado em Wuhan, província de Hubei, China (Li et al., 2020). Em fevereiro de 2020, por meio da análise da sequência genética, foi identificado o agente etiológico: um novo coronavírus (CoV), nomeado SARS-CoV-2 pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (Zhu et al., 2020a). No mesmo mês, a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu a nomenclatura oficial para a doença causada por esse vírus como Doença do Coronavírus 2019 (COVID-19) (World Health Organization, 2025).

Desde então, o SARS-CoV-2 espalhou-se rapidamente pelo mundo, com um total de 777.691.000 casos reportados pela Organização Mundial da Saúde (World Health Organization Data, 2025). O quadro clínico da COVID-19 é caracterizado principalmente por pneumonia e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), podendo evoluir com diversas complicações, como lesões hepáticas, cardíacas e renais agudas, além de infecções secundárias e resposta inflamatória sistêmica exacerbada (Anka et al., 2021a). A ausência de um tratamento clínico específico e eficaz contribuiu para uma elevada taxa de mortalidade, resultando em mais de 7 milhões de mortes ("World Health Organization. WHO Coronavírus (COVID-19) Dashboard Data", [S.d.]). Tal cenário impulsionou a realização acelerada de estudos com o objetivo de identificar os principais fatores determinantes da gravidade da doença e, assim, orientar o desenvolvimento de intervenções mais eficazes voltadas à redução da letalidade e ao controle da disseminação viral.

## 1.2 Coronavírus

Os coronavírus (CoVs) foram identificados pela primeira vez na década de 1960. Eles pertencem à ordem *Nidovirales* (do latim *nido*, “ninho”) e à família *Coronaviridae* (Figura 1). As principais características dos vírus pertencentes à ordem *Nidovirales* incluem: (1) genomas extremamente longos para vírus de RNA; (2) alta capacidade replicativa decorrente da organização genômica conservada; e (3) atividades enzimáticas diversas e únicas (Cui; Li; Shi, 2019a).

A ordem *Nidovirales* é composta pelas famílias *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Mesovirididae* e *Roniviridae*. A classificação taxonômica dos *Nidovirales* baseia-se, principalmente, nos seguintes critérios: (1) organização do genoma viral; (2) similaridade das sequências genômicas; (3) propriedades antigênicas das proteínas virais; (4) mecanismos de replicação; (5) estrutura e propriedades físico-químicas dos vírions; (6) hospedeiros naturais; (7) tropismo celular e tecidual; (8) patogenicidade; (9) citopatologia; e (10) modo de transmissão (Cong; Verlhac; Reggiori, 2017).

A família *Coronaviridae* é dividida em duas subfamílias: *Coronavirinae* e *Torvovirinae*. A subfamília *Coronavirinae* consiste em *Alfacoronavírus*, *Betacoronavírus*, *Gammacoronavírus* e *Deltacoronavírus* definidos com base em suas relações filogenéticas e estruturas genômica (CUI; LI; SHI, 2019b).

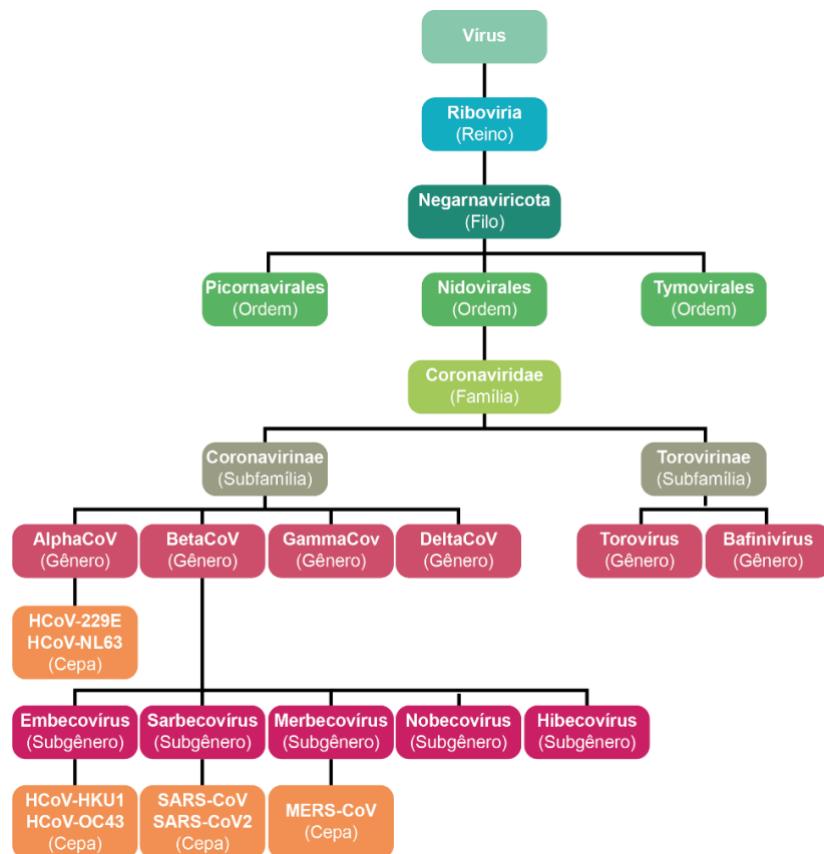


Figura1. Classificação taxonômica e posições para os coronavírus conhecidos. Fonte: autoral, adaptado de Kirtipal, et al (Kirtipal; Bharadwaj; Kang, 2020).

Os coronavírus (CoVs) são vírus de RNA de fita simples positiva, envelopados, que apresentam genomas de grandes dimensões, variando de 8,4 a 12 kb (Vijgen et al., 2004). Suas principais estruturas proteicas incluem: a proteína do nucleocapsídeo (N), a proteína de membrana (M), a proteína do envelope (E) e a proteína spike (S), conforme ilustrado na Figura 2 (HASÖKSÜZ; KILIÇ; SARAÇ, 2020).

A proteína N forma o nucleocapsídeo viral e estabelece complexos com o RNA, os quais desempenham papéis fundamentais na transcrição, montagem e replicação do RNA viral. Além disso, participa da resposta celular do hospedeiro à infecção (Chen; Liu; Guo, 2020).

A proteína M, a mais abundante no vírion, possui três domínios estruturais, define o formato do envelope viral e interage diretamente com a proteína N do nucleocapsídeo (Neuman et al., 2011).

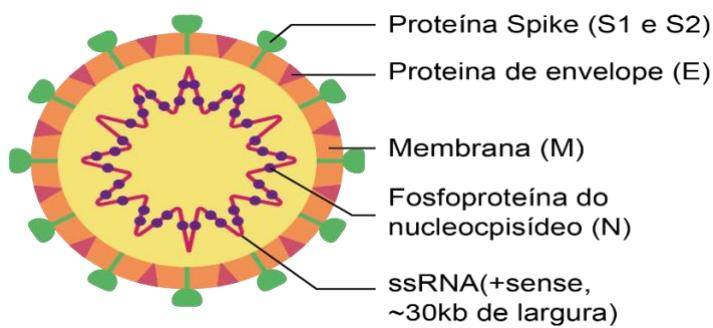


Figura 2. Estrutura Coronavírus. As proteínas estruturais e RNA (ácido ribonucleico) viral. Fonte: autoral, adaptado de Kirtipal, et al (Kirtipal; Bharadwaj; Kang, 2020).

A proteína E, embora expressa em grande quantidade no interior da célula durante o ciclo replicativo, é incorporada em pequenas quantidades ao envelope do vírion (Schoeman; Fielding, 2019). A maior parte da proteína E localiza-se no retículo endoplasmático (RE), no complexo de Golgi e no compartimento intermediário RE-Golgi, onde atua na montagem e brotamento viral. Três funções principais têm sido atribuídas à proteína E: (a) sua interação com as caudas citoplasmáticas da proteína M sugere participação na montagem do vírus; (b) seu domínio transmembrana hidrofóbico é essencial para a liberação de vírions; e (c) está envolvida na patogênese viral (HASÖKSÜZ; KILIÇ; SARAÇ, 2020; Schoeman; Fielding, 2019).

A proteína S é uma glicoproteína de membrana composta por duas subunidades funcionais: S1, responsável pela ligação ao receptor celular, e S2, uma proteína transmembrana que promove a fusão entre as membranas viral e celular. A proteína S também medeia a fusão entre células infectadas e células adjacentes não infectadas, contribuindo para a propagação intercelular do vírus. Alterações na glicoproteína S estão associadas à ampla gama de hospedeiros dos coronavírus, ao tropismo tecidual diverso e à indução de anticorpos neutralizantes (Bosch et al., 2003; Hasoksuz et al., 2002; Schoeman; Fielding, 2019).

Os coronavírus apresentam ampla diversidade de hospedeiros, infectando diversas espécies animais, e exibem

tropismo tecidual complexo. De modo geral, os *alfacoronavírus* e *betacoronavírus* infectam mamíferos, enquanto os *gamacoronavírus* e *deltacoronavírus* são predominantes em aves e peixes, embora alguns também possam infectar mamíferos (Cui; Li; Shi, 2019b).

Antes de 2019, eram conhecidos seis coronavírus capazes de infectar seres humanos: (1) HCoV-229E, (2) HCoV-OC43, (3) HCoV-NL63 e (4) HKU1, geralmente associados a quadros leves do trato respiratório superior, podendo causar infecções graves em lactentes, crianças pequenas e idosos; e (5) SARS-CoV e (6) MERS-CoV, ambos com capacidade de atingir o trato respiratório inferior e causar síndromes respiratórias graves em humanos (Fehr; Perlman, 2015; Su et al., 2016a).

### 1.3 SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 pertence à família *Coronoviridae*, subfamília *Coronovirinae*, gênero *Betacoronavírus*, e ao subgênero *Sarbecovírus* (Fehr; Perlman, 2015). É o sétimo coronavírus conhecido por infectar seres humanos, após HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HKU1, MERS-CoV e o SARS-CoV identificado anteriormente (Cui; Li; Shi, 2019b; Su et al., 2016b; Zhu et al., 2020b).

Em termos genéticos, o genoma do novo coronavírus isolado de pacientes com pneumonia em Wuhan apresentou 89% de identidade nucleotídica com o SARS-CoV-ZXC21 de morcego e 80% com o SARS-CoV humano. Por esse motivo, foi denominado SARS-CoV-2. Trata-se de um vírus de RNA de fita simples, com genoma de 29.903 nucleotídeos, que codifica 9.860 aminoácidos (Chan et al., 2020; Zhou et al., 2020c, 2020d; Zhu et al., 2020c).

Embora a origem exata do vírus ainda não esteja totalmente elucidada, análises genômicas sugerem que o SARS-CoV-2

provavelmente evoluiu de uma cepa viral presente em morcegos (Wan et al., 2020b). No entanto, o hospedeiro intermediário e a via exata de transmissão zoonótica para humanos permanecem incertos. Inicialmente, Ji et al. propuseram as cobras como possíveis hospedeiros intermediários (Ji et al., 2020). Posteriormente, pangolins foram sugeridos como candidatos potenciais, devido à semelhança genômica de 99% entre coronavírus isolados desses animais e o SARS-CoV-2. Contudo, essa diferença de 1% na sequência genômica é considerada significativa, e evidências conclusivas ainda estão em investigação (Yi et al., 2020) – conforme ilustrado na Figura 3.

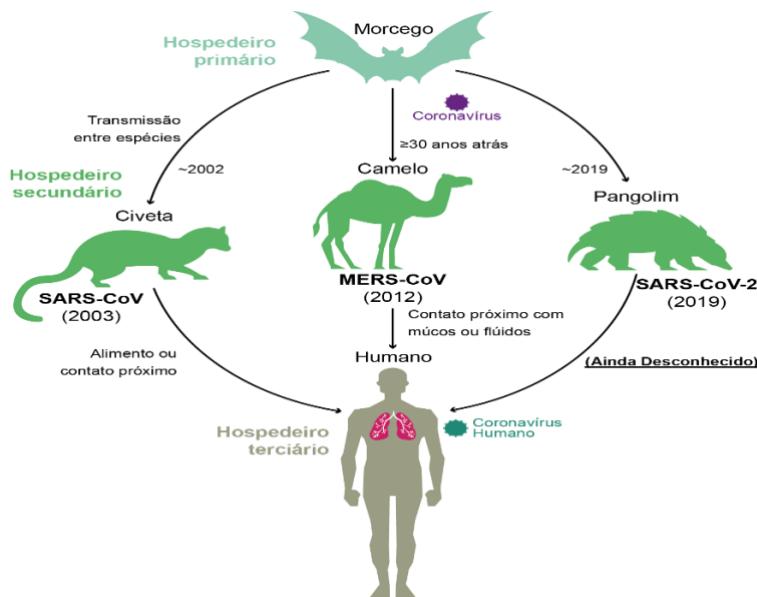


Figura 3. Transmissão de três coronavírus: SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 para humanos a partir de morcegos por meio de hospedeiros intermediários. Fonte: autoral, adaptado de Kirtipal, et al (Kirtipal; Bharadwaj; Kang, 2020).

Após a infecção humana, a transmissão do SARS-CoV-2 ocorre principalmente por meio de contato próximo, gotículas respiratórias e aerossóis (Kirtipal; Bharadwaj; Kang, 2020).

#### 1.4 Ciclo Viral do SARS-CoV-2

Todos os coronavírus compartilham estratégias semelhantes de entrada e replicação celular (Kirtipal; Bharadwaj; Kang, 2020).

A infecção inicia-se com a ligação da proteína S (spike) ao receptor da célula hospedeira, etapa fundamental para a determinação da gravidade da infecção e da patogênese viral. No SARS-CoV-2, a proteína S é uma glicoproteína trimérica de fusão composta por duas subunidades funcionais: S1, que contém o domínio de ligação ao receptor (RBD), e S2, responsável pela fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira. A subunidade S2 é composta por um peptídeo de fusão (PF) e duas regiões de repetição heptal (HR1 e HR2) (Kirtipal; Bharadwaj; Kang, 2020; Tay et al., 2020).

A fusão é iniciada quando o domínio S1 da proteína spike se liga ao receptor enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) na superfície da célula hospedeira. Esse evento desencadeia a endocitose viral e a exposição de proteases endossômicas. No interior do endossomo, a subunidade S1 é clivada, expondo o peptídeo de fusão, que se insere na membrana da célula. A subunidade S2, então, sofre uma reconfiguração estrutural, promovendo a aproximação entre HR1 e HR2, o que resulta na fusão das membranas e liberação do conteúdo viral no citoplasma (Bosch et al., 2004; Liu et al., 2004; Xiao et al., 2003) – Figura 4.

Uma característica distintiva do SARS-CoV-2 é a presença de um sítio de clivagem da furina (sequência “RPPA”) na junção S1/S2 da proteína spike – Figura 5. Essa região é clivada de forma eficiente durante a biossíntese, ao contrário do que ocorre no SARS-CoV, cuja proteína spike não sofre clivagem completa nesse ponto (Gusev et al., 2022; Walls et al., 2020).

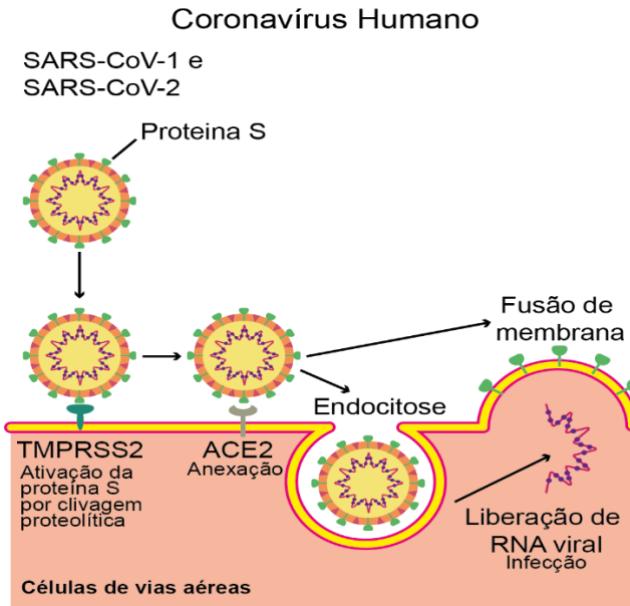


Figura 4. Ligação e entrada do coronavírus nas células das vias aéreas. A glicoproteína spike do envelope liga-se ao seu receptor celular ACE2. TMPRSS2: Protease transmembrana serina 2; ACE2: Enzima conversora de angiotensina 2; Proteína S: Proteína Spike. Fonte: autoral, adaptado de Kirtipal, et al (Kirtipal; Bharadwaj; Kang, 2020).

Além da furina, outras proteases, como TMPRSS2 (protease transmembrana serina 2) e cathepsinas, também participam da clivagem da proteína S, sendo sua expressão ampla um fator-chave para a patogênese da COVID-19 (Hoffmann et al., 2020; Ou et al., 2020).

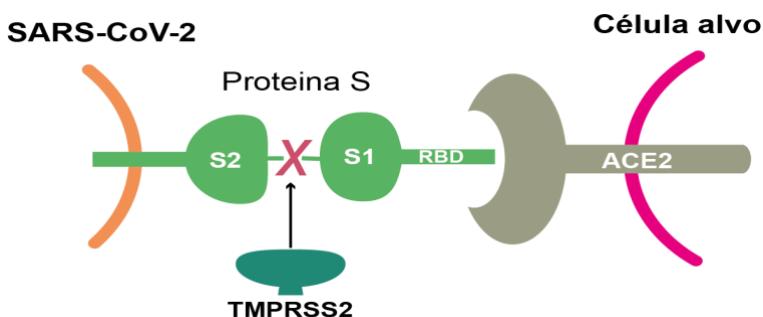


Figura 5. Sítio de clivagem da furina de S1/S2 no SARS-CoV-2. Convertases pró-proteínas (p. ex., furina) atuam após a ligação do vírus à ACE2. Proteases de superfície celular (p. ex., TMPRSS2) catalisam a clivagem de S1 e sua separação do domínio S2. TMPRSS2: Protease transmembrana serina 2; ACE2: Enzima conversora de angiotensina 2; Proteína S: Proteína Spike; RBD: domínio de ligação ao receptor. Fonte: autoral, adaptado de Gusev, et al (Gusev et al., 2022).

Uma vez no citoplasma, inicia-se a tradução do RNA viral e a replicação do genoma, com a produção de RNAs subgenômicos que codificam proteínas virais estruturais e não estruturais. As proteínas S, M e E são inseridas no retículo endoplasmático rugoso (RER) e transportadas ao compartimento intermediário entre o RER e o complexo de Golgi. Simultaneamente, a proteína N, associada ao RNA genômico, forma os nucleocapsídeos, que se associam às proteínas estruturais no compartimento RE-Golgi. Os vírions formados são acondicionados em vesículas derivadas do Golgi e exportados por exocitose (Azkur et al., 2020; Chams et al., 2020) – Figura 6.

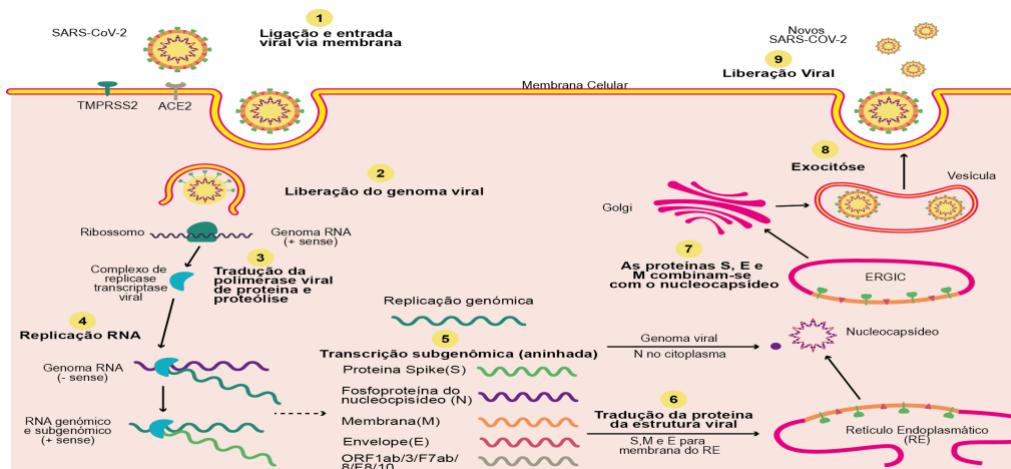


Figura 6. Ligação do vírus, internalização em células epiteliais e replicação. Representação esquemática das organizações genômicas e subgenômicas do SARS-CoV e replicação. TMPRSS2: Protease transmembrana serina 2; ACE2: Enzima conversora de angiotensina 2; RE: Retículo endoplasmático; ERGIC: Compartimento intermediário retículo endoplasmático-golgi. Fonte: autoral, adaptado de Azkur, et al (Azkur et al., 2020).

Estudos de expressão gênica demonstraram que o receptor ACE2 é altamente expresso em múltiplos tecidos, incluindo pulmão, coração, íleo, rim, bexiga e células endoteliais. No sistema respiratório, a ACE2 é especialmente abundante em células epiteliais da traqueia, brônquios, alvéolos, além de monócitos e macrófagos alveolares (Kirtipal; Bharadwaj; Kang, 2020; Zou et al., 2020). Evidências biofísicas e estruturais indicam que a proteína S do SARS-CoV-2 possui uma afinidade de ligação ao ACE2 10 a 20

vezes maior do que a observada no SARS-CoV (WRAPP et al., 2020).

Após a entrada viral, diversos processos intracelulares podem ser ativados, incluindo apoptose programada e uma forma intensamente inflamatória de morte celular denominada piroptose (ORTEGA-PAZ et al., 2021).

## 1.5 Ativação do Sistema Imune

### 1.5.1 Apresentação do antígeno

Após a entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira, o sistema imunológico reconhece o vírus por meio de seus epítópos de superfície, desencadeando respostas imune inata e adaptativa. A resposta inata é iniciada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), especialmente os receptores Toll-like (TLRs), expressos em células dendríticas e macrófagos (Darif et al., 2021; Shah et al., 2020). Os TLRs apresentam distribuição subcelular específica, sendo TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 localizados em endossomos, enquanto outros atuam na membrana plasmática. Estão presentes em diversas células imunes, como DCs, macrófagos, células NK e células T e B (Khanmohammadi; Rezaei, 2021).

No contexto da COVID-19, os TLRs 3, 7 e 8 são particularmente relevantes, promovendo a produção de interferons (IFNs), TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 (Darif et al., 2021; Shah et al., 2020). Essas respostas contêm a infecção até a ativação da imunidade adaptativa. Nessa fase, os peptídeos virais são apresentados por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC): classe I às células T CD8+ citotóxicas e classe II às células T CD4+ auxiliares (Azkur et al., 2020; Shah et al., 2020).

A variabilidade genética do MHC pode influenciar a suscetibilidade e gravidade da doença (Tavasolian et al., 2021). Uma

análise in silico da afinidade de ligação e apresentação de peptídeos do SARS-CoV-2 ao MHC classe I foi conduzida por Nguyen et al., e revelou que HLA-A\*02:02, HLA-B\*15:03 e HLA-C\*12:03 apresentaram maior afinidade, em relação ao A\*25:01, B\*46:01 e C\*01:02 (Nguyen et al., 2020).

Células B também são ativadas diretamente por antígenos virais ou via interação com células T CD4+, contribuindo para a resposta humoral (Azkur et al., 2020).

A ação coordenada das células T e B é essencial para eliminar o vírus e prevenir sua disseminação.

### **1.5.2 Resposta Imune Inata**

Diversos PRRs participam da detecção do RNA viral, incluindo TLRs endossomais (TLR3, 7, 8, 9), RIG-I e MDA5. Estes últimos ativam a proteína MAVS, desencadeando cascatas que envolvem TRAF3, NF-κβ, TBK1, IRF3 e IRF7, culminando na transcrição de IFNs tipo I e citocinas pró-inflamatórias (Khanmohammadi; Rezaei, 2021; Schultze; Aschenbrenner, 2021).

Os IFNs tipo I se ligam aos receptores IFNAR (cadeia alfa do receptor de interferon-alfa/beta), ativando JAK1 e Tyk2, e a fosforilação de STAT1/STAT2/IRF9, o que induz a transcrição de genes estimulados por interferon (ISGs) com efeitos antivirais (Gusev et al., 2022; Schultze; Aschenbrenner, 2021).

A capacidade de ajustar a resposta do IFN é crucial, pois tanto a sua superativação quanto a sua subativação são prejudiciais ao hospedeiro. Uma análise longitudinal confirmou um pico precoce com subsequente declínio de IFN $\alpha$ , e IFN tipo 1 em pacientes com COVID-19 leve a moderada, enquanto os níveis aumentaram ainda mais, principalmente durante a segunda semana em pacientes graves (LUCAS et al., 2020). A dinâmica dos IFNs tipo I em pacientes graves está de acordo com os achados em um modelo murino de infecção por SARS-CoV-2, ilustrando que os IFNs tipo I não

controlam a replicação do SARS-CoV-2 in vivo, mas são importantes impulsionadores de respostas patológicas (Israelow et al., 2020).

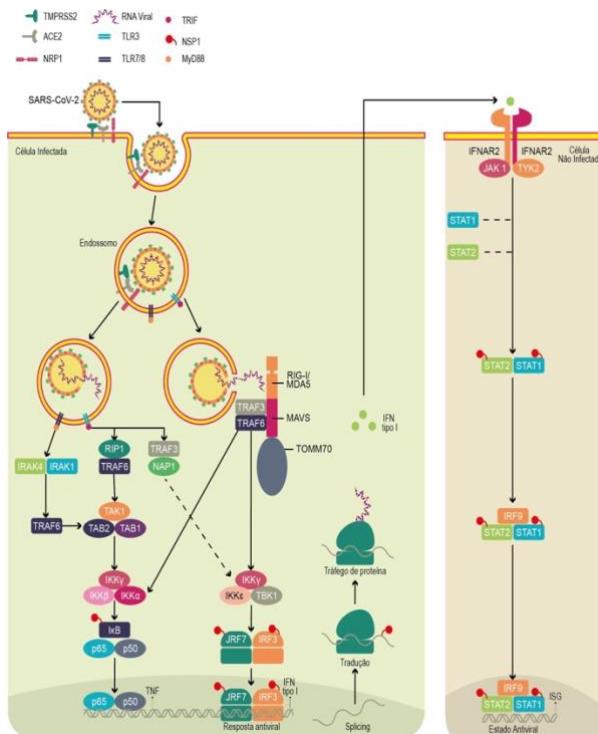


Figura 7. Eventos de sinalização intracelular. SARS-CoV-2 é reconhecido por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que reconhecem RNA, incluindo TLR3 e TLR7 endossômicos, bem como por RIG-I e MDA5 citoplasmáticos. ACE2: Enzima conversora de angiotensina 2; IFNAR1: Cadeia alfa do receptor de interferon- $\alpha/\beta$ ; IKB: Inibidor de kB; IKK $\alpha/\beta/\gamma/\epsilon$ : IKB quinase  $\alpha/\beta/\gamma/\epsilon$ ; IRAK1/4: Quinase 1 associada ao receptor de interleucina-1/4; IRF3/7/9: Fator regulador do interferon 3/7/9; ISG: Genes estimulados por interferon; MDA5: Gene 5 Associado à Diferenciação do Melanoma; p50/65: duas subunidades de NF- $\kappa\beta$ ; RIG-I: Sensores Citosólicos Gene 1 Induzível por Ácido Retinóico; RIP1: Receptor serina/treonina quinase 1; STAT1/2: transdutor de sinal e ativador da transcrição 1/2; TAB1/2: Proteína de ligação à quinase 1 ativada por TGF- $\beta$  1/2; TAK1: TGF-beta quinase ativada; TBK1: quinase 1 de ligação ao TANK; TLR3: Receptor toll like tipo 3; TLR7/8: complexo de receptores toll-like tipo 7 e 8; TRAF3/6: TNF fator 3/6 associado ao receptor; TRIF: Adaptador contendo domínio TIR indutor de Interferon  $\beta$ ; TMPRSS2: Protease transmembrana serina 2. Fonte: autoral, adaptado de Schultze, et al (Schultze; Aschenbrenner, 2021).

O SARS-CoV-2 emprega uma estratégia multifacetada para evadir o sistema imunológico e antagonizar o sistema IFN na COVID-19 (Acharya; Liu; Gack, 2020; Blanco-Melo et al., 2020). Algumas proteínas do SARS-CoV-2 foram identificadas como neutralizantes da ação antiviral do IFN: proteína não estrutural 16 (NSP16) suprime o splicing global do mRNA e diminui o reconhecimento do RNA viral pelos receptores de helicase intracelulares; proteína não estrutural 1 (NSP1) leva à inibição global

da tradução do mRNA ao se ligar ao RNA ribossomal 18S no canal de entrada do mRNA; proteína não estrutural 18 e 9 (NSP18; NSP9) interferem no tráfego de proteínas para a membrana celular (BANERJEE et al., 2020; GORDON et al., 2020). As proteínas ORF3b, ORF6, ORF8 também são capazes de inibir IRF3 e IRF7 e a transcrição de IFNs (Ramasamy; Subbian, 2021a). Todos os mecanismos, independentemente, conduzem à redução da produção de IFN tipo I pela célula infectada (BANERJEE et al., 2020; GORDON et al., 2020).

Os TLR 3, 7 e 8 também ativam a secreção de fator de necrose tumoral (TNF) e consequentemente há aumento da secreção da IL-6 (Ablamunits; Lepsy, 2022; Schultze; Aschenbrenner, 2021).

Os inflamassomas são outra importante via de ativação da imunidade inata, e a superexpressão de componentes da via do inflamassoma foi demonstrada em tecidos pulmonares de pacientes com COVID-19, principalmente em leucócitos e, em menor extensão, em pneumócitos e células endoteliais vasculares (Potere et al., 2023).

Eles são grandes complexos inflamatórios encontrados principalmente no citosol de monócitos, macrófagos e células epiteliais de barreira. A proteína intracelular NLRP3 são Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) pertencente à subfamília de receptores semelhantes a NOD (NLRs), que são ativados por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Na ausência de sinais de ativação, a NLRP3 forma um complexo com HSP90 e SGT1 no citoplasma (Yin et al., 2023).

Embora o mecanismo exato pelo qual o SARS-CoV-2 ativa a proteína NLRP3 ainda não seja completamente compreendido, estudos sugerem que o vírus codifica três proteínas de canal iônico chamadas viroporinas: a proteína E, o ORF3a e a ORF8a (figura 8). A proteína E forma um canal de íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) nas

membranas do Compartimento Intermediário do Aparelho de Golgi e do Retículo Endoplasmático e leva à ativação do inflamassoma NLRP3 através do transporte de Ca<sup>2+</sup>. A proteína E também ativa o NF-κβ como um primeiro sinal da ativação do inflamassoma NLRP3. A proteína ORF3a e ORF8a, ativam o inflamassoma NLRP3 induzindo o efluxo de K<sup>+</sup> e ativação do NF-κβ (SHAH, 2020).

Quando ativada, a NLRP3, juntamente com a proteína adaptadora ASC PYCARD, forma um complexo ativador de caspase-1 conhecido como inflamassoma NLRP3, que após estimulado ativa a procaspase-1 para gerar a caspase-1 ativa, que então converte o precursor da citocina pró-IL-1β e pró IL-18 em IL-1β e IL-18 maduras. A caspase-1 também cliva a gasdermina D (GSDMD) para produzir fragmentos N-terminais que migram para a membrana celular, formando poros que permitem a liberação extracelular de IL-1β e IL-18. A ativação da caspase-1 e GSDMD também pode induzir piroptose. Ao contrário de outras formas de morte celular programada, a piroptose é caracterizada por edema e ruptura celular, com liberação de conteúdo pró-inflamatório intracelular (DINARELLO, 2018; SWANSON; DENG; TING, 2019).

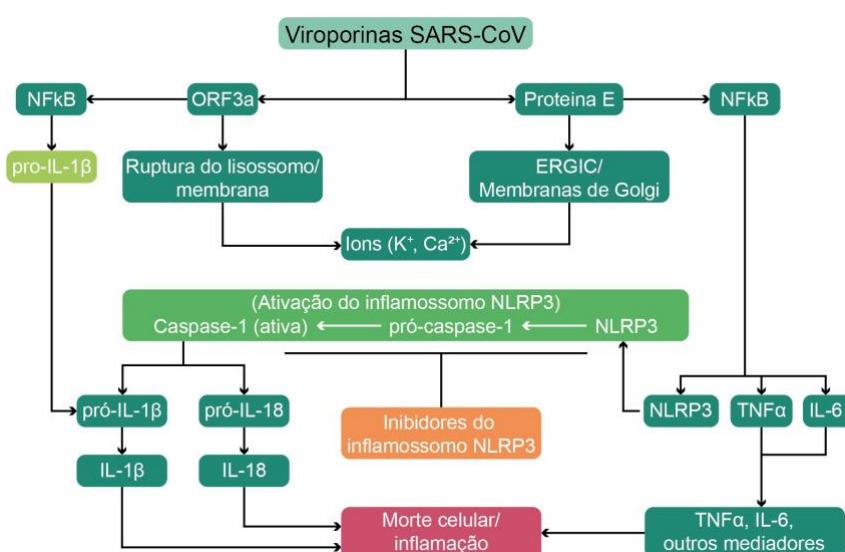


Figura 8. Representação esquemática da ativação do inflamassoma NLRP3 mediada pelo SARS-CoV e cascatas inflamatórias subsequentes que levam à inflamação e morte celular. NF-κB: Fator Nuclear

Associado ao Membro da Família TRAF; ORF: Quadros de leitura abertos do SARS-CoV; ERGIC: Compartimento intermediário retículo endoplasmático-golgi; NLRP3: Família de receptores do tipo OD, domínio 3 de pirina; IL-1 $\beta$ : Interleucina 1-beta; IL-6: Interleucina 6; IL-18: Interleucina 18; pró-IL1 $\beta$ : Pró interleucina 1beta; pró-IL-18: Pró interleucina 18; TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa. Fonte: autoral, adaptado de *Shah, et al* (*Shah, 2020*).

Uma vez liberadas, a IL-1 $\beta$  e a IL-18 exercem efeitos pleiotrópicos ligando-se, respectivamente, ao receptor de IL-1 Tipo I (IL-1RI) e ao receptor  $\alpha$  de IL-18 (IL-18R $\alpha$ ) nas células-alvo, levando à ativação do NF- $\kappa$ B e subsequente transcrição de uma ampla gama de genes e citocinas pró inflamatórias, como IL-6 (DINARELLO, 2018; KAPLANSKI, 2018).

Lucas et al., em um estudo de análise longitudinal das citocinas em pacientes com COVID-19, detectou que um aumento de IL-1  $\beta$  e IL-18 correlacionava-se com a gravidade da doença (Lucas et al., 2020b). Outros estudos observaram que o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), que bloqueia a IL-1, também foi associado à COVID-19 grave (Satış et al., 2021; Zhao et al., 2020b).

### **1.5.3 Resposta Imune Adaptativa**

A apresentação do antígeno desencadeia uma resposta imune humoral e celular específica contra a invasão viral, mediada por células B e T específicas do vírus, com a secreção de citocinas pró-inflamatórias, que desempenham um papel crucial na restrição da replicação viral, na redução da inflamação e na eliminação das células infectadas (Shah et al., 2020).

O sistema imunológico adaptativo consiste em três tipos principais de células: células B, células T CD4+ e células T CD8+. As células B produzem anticorpos. As células T CD4+, conhecidas como células auxiliares, possuem uma variedade de funções imunológicas, incluindo papéis auxiliares e efetores na resposta imune. As células T CD8+, conhecidas como células T citotóxicas, destroem as células infectadas (Sette; Crotty, 2021).

Os peptídeos virais da SARS-CoV-2 são reconhecidos por células apresentadoras de antígeno profissionais, principalmente

células dendríticas e macrófagos, através das proteínas do MHC de classe I para as células T citotóxicas CD8+, e MHC de classe II às células T CD4+. As células B também podem reconhecer diretamente os vírus e se ativar em resposta a eles, além de interagir com as células T CD4+ (Azkur et al., 2020).

#### 1.5.3.1 Células T

As células T CD8+ podem induzir a apoptose de células infectadas por vírus através de diferentes vias, incluindo o contato direto célula-célula mediado pela interação entre moléculas de superfície, como Fas (CD95) e FasL (CD95L). Além disso, o TRAIL expresso nas células T CD8+ pode interagir com seus receptores DR4 e/ou DR5, induzindo a apoptose de células infectadas. As células T CD8+ também podem secretar perforinas e granzimas, que formam poros na membrana celular e induzem a apoptose, através da ativação das caspases. Além disso, as células T CD8+ produzem citocinas inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e TNF, que podem promover direta ou indiretamente a morte celular de células infectadas por vírus (Schmidt; Varga, 2018).

As células T CD4+ orquestram a imunidade adaptativa, produzindo citocinas e quimiocinas que aumentam as respostas das células T CD8+ citotóxicas e são indispensáveis para a produção de anticorpos dependentes de células B e a geração de plasmócitos. Elas diferenciam-se em subpopulações funcionalmente distintas de células efetoras, Th1, Th2, Th17, T reguladora e Thf (células auxiliares foliculares), caracterizadas por fatores de transcrição específicos (Schmidt; Varga, 2018).

As células Th1 produzem elevadas concentrações de interleucina-2 (IL-2) e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), atuando como potentes ativadoras de macrófagos. Por outro lado, as células Th2 promovem a imunidade mediada por eosinófilos e independente de fagócitos, essencial no combate a parasitas helmínticos. Elas secretam predominantemente IL-4, IL-5 e IL-13, citocinas que estimulam a produção de anticorpos do tipo IgE. As células Th17

secretam IL-17, IL-22 e outras citocinas e quimiocinas que recrutam neutrófilos e monócitos. As células T reguladoras expressam CD25 e o fator de transcrição FOXP3 e desempenham um papel fundamental no controle anti-inflamatório/imunossupressor inibindo a ação pró-inflamatória Th1 e Th17, por meio da produção de IL-10, IL-35 e fator de crescimento transformador TGF- $\beta$ . As células Thf são as auxiliares das células B e são essenciais para o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes, bem como das células B de memória e da imunidade humoral de longo prazo (BLUESTONE et al., 2009; CROTTY, 2019; KLEINEWIETFELD; HAFLER, 2013; SETTE; CROTTY, 2021).

O aumento significativo nos níveis séricos de IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , CXCL10 e CCL2 em pacientes com infecção por SARS-CoV-2 sugere fortemente uma resposta imune predominantemente do tipo Th1 (Huang et al., 2020a; Tay et al., 2020).

O perfil da resposta imunológica mediada pelas células T CD4+ e CD8+ na infecção por SARS-CoV-2 ainda não foi completamente elucidado. No entanto, estudos recentes sugerem que as células T CD8+ são detectadas de forma menos consistente do que as células T CD4+ (Anka et al., 2021b; Sette; Crotty, 2021; Zheng et al., 2020b). Além disso, as células T CD8+ em pacientes com COVID-19 grave apresentaram uma redução significativa na atividade da granzima e uma superexpressão de receptores inibitórios, incluindo CD279 (PD-1), o que sugere que o vírus promove uma ativação excessiva inicial seguida pela exaustão subsequente das células T CD8+ (ANKA et al., 2021b; ZHENG et al., 2020).

#### **1.5.3.2 Células B**

A ativação das células T CD4+ induz a sua migração para os centros germinativos, onde se diferenciam em células T auxiliares foliculares (Tfh). A interação entre as células Tfh e as células B foliculares promove uma série de processos, incluindo a troca de isótipo, hipermutação somática e rápida proliferação celular. Como resultado, as células B foliculares se diferenciam em dois subtipos

principais: plasmócitos produtores de anticorpos de alta afinidade e longa duração, ou células B de memória (Primorac et al., 2022).

Semelhante a muitas outras doenças virais, um aumento na IgM específica do vírus na fase aguda, seguido por um aumento na IgG específica do vírus em fases posteriores, foi observado no curso da COVID-19 (Sette; Crotty, 2021).

A interação entre a imunidade celular e humoral é complexa e pode variar em termos de composição e eficácia. Uma resposta humoral tardia e níveis elevados de IgG, IgM e IgA estão associados a desfechos clínicos desfavoráveis (Primorac et al., 2022).

#### **1.5.4 Mediadores Séricos Solúveis na COVID-19**

A infecção por SARS-CoV-2 tem sido associada a uma resposta imunológica desproporcional de mediadores séricos solúveis, incluindo as citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento solúveis (Darif et al., 2021). Distintos perfis de secreção destes fatores foram associados à imunopatogênese e desfecho clínico da COVID-19.

A resposta imune hiperativa do hospedeiro à infecção por SARS-CoV-2 leva a uma reação inflamatória exagerada. Níveis circulantes elevados de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7, CXCL8, IL-9, IL-10, IL-17, IL-18, IL-22, IL-33, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$ , CXCL10, CCL2, CCL3 CCL4 foram relatados em pacientes com COVID-19, particularmente naqueles internados na unidade de terapia intensiva (UTI) (Jafarzadeh et al., 2020; Zhou et al., 2020e).

Além disso, amostras do lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com COVID-19 mostram o acúmulo de várias quimiocinas, como CCL2, CCL3, CCL4, CCL7, CCL8, CCL20, CXCL10, CXCL6 e CXCL11, sendo que muitas dessas quimiocinas são secretadas por monócitos ou macrófagos (Jafarzadeh et al., 2020; Liao et al., 2020; Zhou et al., 2020e).

#### 1.5.4.1 Citocinas

As citocinas desempenham um papel muito importante em quase todos os aspectos da inflamação e da imunidade, incluindo proliferação, maturação, migração e adesão celular. Elas também desempenham um papel importante na diferenciação e ativação de células imunes, sendo responsáveis pela regulação do equilíbrio entre as respostas imunes inata e adaptativa (Broker et al., 2010).

##### 1.5.4.1.1 Interleucinas

As interleucinas (ILs), pertencem à família de citocinas, estão envolvidas na diferenciação e ativação de células imunes, direcionando-as para os locais de infecção, aumentando a sinalização de fase aguda, ativando células epiteliais e mediando a produção secundária de citocinas (Broker et al., 2010).

A interleucina-6 (IL-6) desempenha um papel fundamental na patogênese da COVID-19, modulando a quimiotaxia dos neutrófilos. Produzida por uma ampla gama de células, incluindo células estromais, linfócitos B e T, macrófagos, monócitos, células dendríticas, mastócitos e células não linfocíticas, como fibroblastos e células endoteliais, a IL-6 está criticamente envolvida na inflamação. Ela aumenta a produção de proteínas da fase aguda e níveis elevados de IL-6 podem ativar o sistema de coagulação e aumentar a permeabilidade vascular, facilitando a disseminação da inflamação. Além disso, a produção de IL-6 é amplificada pela presença de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Broker et al., 2010; Scheller; Rose-John, 2006).

Revisões sistemáticas e metanálises têm demonstrado que níveis séricos elevados de IL-6 são observados em mais de 50% dos pacientes com COVID-19(Fara et al., 2020; PACES et al., 2020) e estão associados a desfechos clínicos adversos, incluindo tempestade de citocinas, admissão em unidade de terapia intensiva

(UTI), SDRA e óbito (Chau et al., 2021; Ling et al., 2021; Zhou et al., 2020a) .

O SARS-CoV-2 demonstrou induzir a secreção de citocinas da família IL-1, IL-1 $\beta$  e IL-18, que desempenham papéis importantes na inflamação, hematopoiése e fibrose (Dinarello, 2018b; Qin et al., 2020; TUFAN; AVANOĞLU GÜLER; MATUCCI-CERINIC, 2020). Estudos têm relatado níveis elevados de citocinas da família IL-1 no plasma de pacientes com COVID-19, com níveis significativamente mais altos observados em casos graves em comparação com casos leves (Henry et al., 2020; Lucas et al., 2020b; Qin et al., 2020).

A infecção por SARS-CoV-2 induz a ativação e maturação da IL-1 $\beta$ , que subsequentemente ativa outras citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6 e TNF- $\alpha$ . Níveis elevados de IL-1 $\beta$  têm sido associados à SDRA, hipercoagulação, coagulação intravascular disseminada e à maioria dos casos graves de COVID-19 (Costela-Ruiz et al., 2020; Ong et al., 2020).

A IL-17 é produzida por linfócitos Th17 e outras células, incluindo células T CD8+ e células NK. A IL-17 atua como uma citocina neutrofílica promotora de inflamação cujos níveis aumentam durante processos inflamatórios e doenças autoimunes (Fajgenbaum; June, 2020a). A dinâmica da interleucina-17 (IL-17) na infecção por SARS-CoV-2 permanece controversa, com resultados conflitantes. Alguns estudos sugerem que os níveis de IL-17 estão aumentados em pacientes com COVID-19 e apresentam uma correlação positiva com a gravidade da doença (Huang et al., 2020b; Pacha; Sallman; Evans, 2020). Outros estudos, como o de Wan et al., não encontraram diferenças significativas nos níveis de IL-17 entre pacientes com COVID-19 grave e leve, bem como entre indivíduos não infectados e pacientes com COVID-19 (Wan et al., 2020a).

Dentre as citocinas reguladoras, a IL-10 é uma das mais bem caracterizadas na infecção por SARS-CoV-2. Ela atua como uma

citocina anti-inflamatória e é um regulador de feedback importante, modulando negativamente a imunidade inata e adaptativa por meio de efeitos imunossupressores. É secretada por vários tipos de células, incluindo subconjuntos de células Th1, Th2 e Th17, células TReg, células TCD8+, células B, mastócitos, eosinófilos, macrófagos e células dendrítica. A IL-10 está elevada na COVID-19 (Sun et al., 2020), e acredita-se que este seja um mecanismo de feedback negativo para suprimir a inflamação e desfechos clínicos desfavoráveis como SDRA e óbito (Hsu et al., 2022).

#### **1.5.4.1.2 Interferons**

Os interferons são citocinas antivirais que inibem a replicação viral e estimulam as respostas imunes inata e adaptativa, desempenhando um papel crucial na resposta imunológica a infecções virais. Eles são secretados por células dendríticas, linfócitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e osteoblastos. São classificados em três tipos principais com base nos receptores de sinal: IFN tipo I (IFN-I; IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ), IFN tipo II (IFN- $\gamma$ ) e IFN tipo III (IFN- $\lambda$ 1) (Gresser, 1990; Rojas et al., 2021).

Evidências crescentes têm destacado o papel crucial das respostas ao IFN- $\gamma$  no desenvolvimento de COVID-19 grave, com diversos mecanismos que exacerbam a hiperinflamação. Estudos longitudinais recentes demonstraram que os níveis de IFN- $\alpha$  no sangue periférico permanecem elevados em pacientes com COVID-19 grave. Além disso, os monócitos clássicos exibem respostas inflamatórias induzidas tanto por IFN- $\gamma$  quanto por TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Lee et al., 2020).

#### **1.5.4.1.3 TNF- $\alpha$**

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória secretada por macrófagos, monócitos, células Th1, células Th17, células T CD8+ e células dendríticas durante a fase aguda da inflamação ou infecção (Hsu et al., 2022). É um importante mediador pleiotrópico das respostas inflamatórias sistêmicas agudas e regula

simultaneamente a apoptose e a proliferação celular, promovendo a produção de outras quimiocinas e citocinas (Guo et al., 2022).

Em pacientes com COVID-19 há aumento de secreção de TNF- $\alpha$  (Feldmann et al., 2020), e em casos graves de COVID-19, níveis sistêmicos elevados de TNF- $\alpha$  foram associados à SDRA, coagulação intravascular disseminada e menor sobrevida (Jia et al., 2021; Montazersaheb et al., 2022; Song et al., 2020; Wang et al., 2020b).

#### **1.5.4.2 Quimiocinas**

As quimiocinas são citocinas com propriedades quimiotáticas que regulam os padrões migratórios e o posicionamento das células do sistema imune, desempenhando um papel essencial nos processos inflamatórios e na resposta imunológica (Griffith; Sokol; Luster, 2014) e estão diretamente envolvidos na patogênese de desfechos clínicos graves da COVID-19, como óbito (Hsu et al., 2022).

A CXCL10, também conhecida como IP-10, pertence à família das quimiocinas C-X-C. Liga-se ao receptor CXCR3 e atua como quimiotático para células imunes. Isso aumenta a quimiotaxia, a apoptose, o crescimento celular, a angiogênese e o recrutamento de macrófagos, células Th1 e células NK (Liu et al., 2011). Vários estudos demonstraram que na COVID-19, os níveis séricos de CXCL10 estão altamente associados à gravidade da doença e à carga viral (Darif et al., 2021; Ghazavi et al., 2021; Guo et al., 2021; Pons et al., 2021; Yang et al., 2020).

A CCL3 ou proteína inflamatória de macrófagos-1 alfa (MIP-1 $\alpha$ ) é uma quimiocina CC envolvida na adesão e migração celular. Em pacientes com COVID-19, foi associada à tempestade de citocinas (Ramasamy; Subbian, 2021b).

A CCL2 ou proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) é uma quimiocina da família CC que desempenha um papel fundamental no processo inflamatório. Ela atua como um potente

agente quimiotático, atraindo monócitos e outras células inflamatórias para o local da inflamação, e também pode intensificar a expressão de outros fatores e células inflamatórias (Singh; Anshita; Ravichandiran, 2021). Pesquisadores demonstraram que a CCL2 e seu receptor (CCR2) estão envolvidos no recrutamento de monócitos e na infiltração dessas células nos pulmões de pacientes com COVID-19. Além disso, níveis elevados de CCL2 foram observados no LBA de pacientes com COVID-19 grave, o que está relacionado a tempestade de citocinas e promoção de infiltração de células mieloides nas vias aéreas e danos alveolares adicionais (Ranjbar et al., 2022).

#### **1.5.4.3 Fatores Estimulador de Colônias**

A superfamília dos fatores estimuladores de colônias (CSF) estão envolvidos na mielopose, ou seja, na geração de monócitos, macrófagos, células dendríticas e fagócitos polimorfonucleares (p. ex., neutrófilos e eosinófilos). A família possui 2 membros principais: G-CSF e GM-CSF (Becher; Tugues; Greter, 2016).

Essas glicoproteínas têm diversas origens celulares, incluindo macrófagos, células T, mastócitos, células NK, células endoteliais e fibroblastos. Inicialmente, eles foram relacionados como fator de crescimento hematopoietico, mas acredita-se atualmente que desempenhe um papel essencial na coordenação da resposta imunológica entre linfócitos e células mieloides, estimulando a secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF) (Becher; Tugues; Greter, 2016).

Na COVID-19 os níveis séricos de G-CSF e GM-CSF são regulados positivamente. As porcentagens de células T CD4+, T CD8+, células natural killer e células B que expressam GM-CSF são significativamente maiores no soro de pacientes com COVID-19 em comparação com controles saudáveis e COVID-19 leve. Além disto, há evidências de que a expansão de células imunes que expressam GM-CSF se correlaciona com a gravidade da doença na COVID-19 (Mehta et al., 2020).

### 1.5.5 Tempestade de Citocinas

O termo “tempestade de citocinas” refere-se à superprodução de citocinas inflamatórias por células imunes hiperativadas. Isso ocorre devido à uma resposta imunológica desproporcional, de etiologia variada e pode causar síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS), disfunção múltipla de órgãos e óbito (Fajgenbaum; June, 2020b).

Durante uma tempestade de citocinas, níveis elevados de citocinas circulatórias desencadeiam um ciclo de feedback positivo nas células imunes. Isso leva ao recrutamento contínuo dessas células para os locais de inflamação, causando um aumento exponencial tanto da inflamação quanto da lesão aos órgãos (Song et al., 2020).

Na COVID-19, o SARS-CoV-2 estimula várias células infectadas, incluindo células epiteliais pulmonares e macrófagos alveolares, a liberar citocinas e quimiocinas. Os principais mediadores envolvidos nas tempestades de citocinas são ILs, IFNs, TNFs, CSFs e a família das quimiocinas. As quimiocinas, por sua vez, ativam macrófagos, células dendríticas e outras células imunes para induzir uma resposta inflamatória agressiva e a liberação subsequente de um grande número de mediadores séricos solúveis pró-inflamatórios desencadeando uma tempestade de citocinas (tabela 1). Após isso, as quimiocinas recrutam células inflamatórias adicionais, como monócitos e fagócitos, para o local da inflamação, resultando em uma amplificação da cascata da resposta inflamatória (Hsu et al., 2022).

A tempestade de citocinas foi observada em casos graves de COVID-19 e desencadeia uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada com alta mortalidade (Darif et al., 2021).

Vários mecanismos têm sido implicados na tempestade de citocinas induzida pelo SARS-CoV-2. Estudos recentes sugerem que uma resposta atrasada ao interferon e a replicação viral precoce

nos pulmões, combinadas com um aumento do influxo de células imunes inatas, podem contribuir para o dano tecidual e perpetuar um ciclo inflamatório de auto amplificação. Esse processo pode ser impulsionado pela liberação descontrolada de citocinas inflamatórias induzidas pelo fator de transcrição NF-κB, que está associado à patogênese da COVID-19 (Blanco-Melo et al., 2020).

*Tabela 1.* Mediadores Séricos Solúveis na Tempestade de Citocinas

Mediadores	Fonte de célula Principal	Tipos e Funções
<b>Citocinas e fatores de crescimento</b>		
Interleucina-1	Macrófagos, células epiteliais, células piroptóticas	Citocina alarmina pró-inflamatória; função pirogênica, macrófagos e ativação de células Th17
Interleucina-2	Células T	Fator de crescimento de células T efetoras e reguladoras
Interleucina-6	Macrófagos, células T, células endoteliais	Citocina pró-inflamatória; função pirogênica, aumento da produção de anticorpos, indução de reagentes de fase aguda
Interleucina-9	Célula Th9	Proteção contra infecções por helmintos, ativação de mastócitos, associação com interferon tipo I na Covid-19
Interleucina-10	Células T reguladoras, células Th9	Citocina anti-inflamatória; inibição de células Th1 e liberação de citocina
Interleucina-12	Células dendríticas, macrófagos	Ativação da via Th1; indução de interferon-γ de células Th1, CTLs e células NK; atuação em sinergia com a interleucina-18
Interleucina-17	Células Th17, células NK, células linfoides inatas do grupo 3	Promovendo inflamação neutrofílica, proteção contra infecções bacterianas e fúngicas
Interleucina-18	Monócitos, macrófagos, células dendríticas	Citocina alarmina pró-inflamatória; ativação da via Th1, atuando em sinergia com a interleucina-12
Interleucina-33	Macrófagos, células dendríticas, mastócitos, células epiteliais	Citocina alarmina pró-inflamatória; amplificação de células Th1 e Th2, ativação de células NK, CTLs e mastócitos

Interferon-γ	Células Th1, CTLs, células linfoides inatas do grupo 1 e células NK	Citocina pró-inflamatória; ativação de macrófagos
Fator de necrose tumoral	Macrófagos, células T, células NK, mastócitos	Aumento da permeabilidade vascular; função pirogênica
GM-CSF	Células Th17	Citocina pró-inflamatória
VEGF	Macrófagos	Angiogênese
<b>Quimiocinas</b>		
Interleucina-8 (CXCL8)	Macrófagos, células epiteliais	Recrutamento de neutrófilos
MIG (CXCL9)	Monócitos, células endoteliais, queratinócitos	Quimiocina induzível por interferon; recrutamento de células Th1, células NK, células dendríticas plasmocitoides
IP-10 (CXCL10)	Monócitos, células endoteliais, queratinócitos	Quimiocina induzível por interferon; recrutamento de macrófagos, células Th1, células NK
MCP-1 (CCL2)	Macrófagos, células dendríticas, miócitos cardíacos	Recrutamento de células Th2, monócitos, células dendríticas, basófilos
MIP-1α (CCL3)	Monócitos, neutrófilos, células dendríticas, células NK, mastócitos	Recrutamento de macrófagos, células Th1, células NK, eosinófilos, células dendríticas; função pirogênica
MIP-1β (CCL4)	Macrófagos, neutrófilos, endotélio	Recrutamento de macrófagos, células Th1, células NK, células dendríticas
BLC (CXCL13)	Células B, células dendríticas foliculares	Recrutamento de células B, células T CD4, células dendríticas

## 1.6 Fisiopatologia

O SARS-CoV-2 utiliza o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) para facilitar sua entrada nas células-alvo, o que resulta na regulação negativa desses receptores e no consequente aumento da produção de angiotensina 2 (AT2). A elevação dos níveis de Ang 2 pode aumentar a permeabilidade vascular pulmonar e contribuir para lesões pulmonares. Cerca de 83% dos receptores ACE2 estão localizados na superfície luminal das células epiteliais alveolares do tipo II, tornando essas células os principais alvos da infecção viral (Ochani et al., 2021). Além disso, a ampla expressão de ACE2 em tecidos extrapulmonares — como coração, rins, endotélio e trato gastrointestinal — pode estar

associada à disfunção multiorgânica observada em pacientes com COVID-19 (Zhang et al., 2020).

As fases clínicas da infecção pelo SARS-CoV-2 podem ser categorizadas em três fases: (1) fase de viremia, na qual o vírus entra no sangue periférico a partir dos pulmões; (2) fase aguda ou pneumonia, em que pacientes imunocomprometidos podem evoluir para um quadro crítico, em que pacientes imunocomprometidos podem evoluir para um quadro crítico, marcado por linfopenia significativa (com redução dos linfócitos T e B), elevação acentuada de citocinas inflamatórias e alterações nos marcadores de coagulação, como níveis elevados de dímero D; (3) fase de recuperação ou de disseminação inflamatória na qual pode haver melhora clínica progressiva ou, alternativamente, evolução para coagulação intravascular disseminada (CIVD) e disfunção multiorgânica, associadas à ativação exacerbada da cascata de coagulação e à tempestade de citocinas (Ochani et al., 2021).

Achados histopatológicos na biópsia pulmonar em pacientes com SDRA demonstram dano alveolar difuso com exsudatos fibromixoides celulares, edema pulmonar, descamação de pneumócitos e formação de membrana hialina. Além disso, também foi observado infiltrados inflamatórios mononucleares intersticiais, dominados por linfócitos (Tian et al., 2020; Xu et al., 2020).

A expressão de ACE2 foi identificada no endotélio arterial e venoso de vários órgãos. Em pacientes com COVID-19 a lesão endotelial mediada pelo SARS-CoV-2 caracterizada por níveis elevados de fator de von Willebrand e a endotelite, marcada pela presença de neutrófilos e macrófagos ativados, foram evidenciadas em múltiplos leitos vasculares, incluindo pulmões, rins, coração, intestino delgado e fígado (Gupta et al., 2020; Varga et al., 2020). Essa agressão ao endotélio pode desencadear uma produção excessiva de trombina, inibir a fibrinólise e ativar vias do sistema complemento, promovendo um estado de tromboinflamação que

culmina na deposição de microtrombos e na disfunção da microvasculatura (Bikdeli et al., 2020; Gupta et al., 2020). Ademais, a interação entre plaquetas e neutrófilos, assim como a ativação de macrófagos, pode intensificar a resposta pró-inflamatória por meio da liberação de citocinas, da formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) e do acúmulo de fibrina e/ou microtrombos. As NETs, por sua vez, podem causar danos adicionais ao endotélio e ativar tanto a via extrínseca quanto a via intrínseca da coagulação (Gupta et al., 2020; Zuo et al., 2020).

A lesão renal aguda (LRA) é uma complicação frequente em pacientes com COVID-19, sendo caracterizada por hipotensão, comprometimento da microvasculatura renal, redução da perfusão e distúrbios hemostáticos (Batlle et al., 2020). O SARS-CoV-2 pode infectar diretamente células renais que expressam o receptor ACE2, como os túbulos proximais e os podócitos, promovendo o acúmulo de angiotensina 2 e o desequilíbrio do sistema renina-angiotensina. Esses eventos contribuem para disfunção glomerular, fibrose intersticial, vasoconstrição e resposta inflamatória exacerbada (Vaduganathan et al., 2020). Além disso, citocinas inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6), podem interagir com as células renais, aumentando a permeabilidade vascular e agravando o dano renal (Taverna et al., 2021). Os interferons (IFNs), por sua vez, também desempenham um papel importante, contribuindo para a perda de podócitos e estimulando processos de glomeruloesclerose, o que perpetua o desenvolvimento da LRA (Legrand et al., 2021).

O SARS-CoV-2 também demonstra propriedades neuroinvasivas, que permitem sua disseminação do trato respiratório superior para o sistema nervoso central (SNC) por meio do bulbo olfatório, promovendo inflamação e desmielinização neural (Asadi-Pooya; Simani, 2020). A presença de receptores ACE2 nas células ciliadas da mucosa olfatória possibilita que o vírus atinja o líquido cefalorraquidiano (LCR) em um período de até sete dias após a infecção, o que pode desencadear uma resposta inflamatória

exacerbada com aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6. Essa resposta inflamatória pode resultar em danos estruturais e disfunções metabólicas no SNC (Hsu et al., 2022).

O SARS-CoV-2 pode infectar diretamente os cardiomiócitos, provocando lesão miocárdica e desencadeando uma intensa resposta imune (Hsu et al., 2022). As alterações cardíacas associadas incluem espasmo coronariano, lesão hipóxica, formação de microtrombos, lesão endotelial vascular direta, hipercoagulabilidade e instabilidade de placas ateroscleróticas. Esses mecanismos patológicos elevam significativamente o risco de infarto agudo do miocárdio, decorrente de oclusão coronariana aguda (Ackermann et al., 2020).

A lesão hepática na COVID-19 pode ser causada diretamente pela infecção viral das células hepáticas, e o grau de lesão hepática parece estar correlacionado com a gravidade da doença. Os mecanismos que causam lesão hepática em pacientes com COVID-19 permanecem obscuros; no entanto diversas teorias foram postuladas: (1) infecção viral direta de células epiteliais gastrointestinais mediada por ACE2 para desregular as funções hepáticas; (2) estado crítico do paciente e lesões imunomediadas, como tempestade de citocinas, hipóxia associada à pneumonia, ou ativação do sistema complemento mediada por IL-6 e consequente aumento da permeabilidade vascular; e (3) hepatotoxicidade por fármacos (Hsu et al., 2022).

Um estudo de autópsia conduzido por Wichmann et al. demonstrou uma alta incidência de Trombose Venosa Profunda (TVP) (58%), com um terço dos pacientes com COVID-19 apresentando Embolia Pulmonar (EP) como causa direta de óbito (Wichmann et al., 2020).

Outros achados histopatológicos incluem atrofia esplênica, necrose dos linfonodos hilares e hemorragia focal no rim (Ochani et al., 2021)

### **1.7 Manifestações Clínicas**

As manifestações clínicas descritas neste estudo referem-se às cepas B.1.1.28 e B.1.1.33 do SARS-CoV-2, que foram as duas principais linhagens virais em circulação no Brasil até 2021 (“Saúde MdS-SdVe. 52 Boletim Epidemiológico Especial - Doença pelo Coronavírus COVID-19 2021 04/03/2021”, 2021). É importante notar que outras variantes do vírus podem apresentar quadros clínicos distintos.

O período de incubação do SARS-CoV-2 varia entre 1 e 14 dias. No entanto, o período médio predominante é de 3 a 7 dias (Hsu et al., 2022).

O espectro clínico da infecção por SARS-CoV-2 é amplo, abrangendo infecção assintomática, doença leve do trato respiratório superior, até pneumonia viral grave com insuficiência respiratória, SDRA, CIVD e óbito (Zhou et al., 2020b).

A COVID-19 apresenta inicialmente sintomas semelhantes aos da gripe, incluindo febre, tosse seca, mialgia, fadiga, dispneia e anorexia. Apresentações atípicas incluem diarreia e náusea. Quadros graves podem progredir para lesão pulmonar aguda grave SIRS e SDRA. As manifestações extrapulmonares incluem os sistemas neurológico, olfatório, cardiovascular, digestivo, hepatobiliar, renal, endocrinológico e dermatológico.

A lesão renal aguda (LRA) é uma complicação frequente da COVID-19, associada a uma maior mortalidade. Estudos têm demonstrado que a LRA ocorre em uma proporção significativa de pacientes hospitalizados com COVID-19, com taxas de 37% a 90% em pacientes gravemente doentes, aumentando proporcionalmente à gravidade da doença. Além disso, a necessidade de diálise é comum, afetando cerca de 14% dos pacientes (Argenziano et al., 2020; Hirsch et al., 2020). Anormalidades urinárias, como hematúria

e proteinúria, são também frequentes, com relatos de até 87% de proteinúria em pacientes gravemente enfermos (Cummings et al., 2020a; Hirsch et al., 2020). Alterações eletrolíticas, incluindo hipercalemia e acidose, são comuns em pacientes com COVID-19, mesmo na ausência de LRA, possivelmente devido à alta renovação celular associada à doença (Gupta et al., 2020).

Pacientes com COVID-19 podem apresentar uma variedade de sintomas neurológicos leves e inespecíficos, incluindo cefaleia (8-42%), tontura (12%), mialgia e/ou fadiga (11-44%), anorexia (40%), anosmia (5%) e ageusia (5%) (Ellul et al., 2020; Gupta et al., 2020). Em casos mais graves, podem ocorrer complicações neurológicas mais graves, como acidente vascular cerebral agudo (6%), confusão ou comprometimento da consciência (8-9%) (Morassi et al., 2020); e polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda (síndrome de Guillain-Barré) (Pimentel et al., 2023; Zhao et al., 2020a). Além disso, casos de meningoencefalite, síndrome da encefalopatia hemorrágica posterior reversível e encefalopatia necrosante aguda também foram relatados (Ellul et al., 2020; Gupta et al., 2020).

Revisões abrangentes descreveram as manifestações neurooftalmológicas da COVID-19, incluindo congestão conjuntival isolada, neurite óptica, conjuntivite e alterações retinianas (Cheema et al., 2020; Gold; Galetta, 2021; Wesselingh; Wesselingh, 2023; Wu et al., 2020).

Diversas apresentações cardiovasculares da COVID-19 foram relatadas. O SARS-CoV-2 pode causar danos cardiovasculares diretos e indiretos, incluindo lesão miocárdica, síndromes coronárias agudas (SCA), cardiomiopatia, cor pulmonale agudo, arritmias e choque cardiogênico, bem como as complicações trombóticas (Clerkin et al., 2020; Driggin et al., 2020; Ullah et al., 2020). A lesão miocárdica, com elevação de biomarcadores cardíacos acima do percentil 99 do limite superior de referência, ocorreu em 20 a 30% dos pacientes hospitalizados com COVID-19, com taxas mais altas

(55%) entre aqueles com doença cardiovascular preexistente (Guo et al., 2020; Ullah et al., 2020).

Wang et al, em um estudo com 138 pacientes internados com COVID19 observou que arritmias cardíacas, como fibrilação atrial de início recente, bloqueio cardíaco e arritmias ventriculares, são prevalentes, ocorrendo em 17% dos pacientes hospitalizados e 44% dos pacientes em UTI (Wang et al., 2020a).

As manifestações gastrointestinais mais frequentes são dor abdominal, vômitos, diarreia, anorexia e náuseas. A prevalência dos sintomas pode variar de acordo com as características da população estudada (Gupta et al., 2020).

As manifestações endocrinológicas incluem hiperglicemia exacerbada, cetose euglicêmica e cetoacidose diabética (Gupta et al., 2020).

As manifestações cutâneas mais comuns associadas à COVID-19 incluem lesões maculopapulares, seguidas por lesões do tipo *chilblain*, urticária, lesões livedoides/necróticas, lesões vesiculares e outras erupções cutâneas não específicas. É importante notar que não há uma manifestação cutânea patognomônica da COVID-19, pois essas lesões também podem ser observadas em outras infecções virais (Arefinia et al., 2023; Danarti et al., 2023).

A taxa de mortalidade associada à COVID-19 aumenta progressivamente com a idade, observando-se um aumento significativo acima dos 80 anos. Além disso, a presença de comorbidades, como diabetes, doença cardíaca, doença renal crônica, doença pulmonar crônica e outros fatores sociodemográficos também estão associados a um aumento na taxa de mortalidade (Chow et al., 2020; Hsu et al., 2022).

## 1.8 Métodos Diagnósticos

Em resposta à rápida disseminação da COVID-19, várias técnicas de diagnóstico foram propostas para detectar a infecção por SARS-CoV-2. No entanto, nem todas as abordagens sugeridas foram validadas para uso clínico ou aceitas para diagnóstico. Atualmente, as duas principais categorias de técnicas de diagnóstico recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Food and Drug Administration (FDA) incluem: (1) testes de amplificação de ácido nucleico (NAAT) e (2) testes sorológicos para detecção de antígenos virais (Chung et al., 2024).

A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) é a técnica mais proeminente na categoria NAAT para a detecção de SARS-CoV-2. Considerada o padrão-ouro pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a RT-qPCR é amplamente utilizada devido à sua alta sensibilidade e especificidade (Castellanos; Somoza, 2023). Diversos tipos de amostras clínicas são adequadas para RT-qPCR, incluindo swabs nasofaríngeos, swabs orofaríngeos, saliva orofaríngea posterior e escarro. O swab nasofaríngeo é considerado o padrão-ouro para detecção de SARS-CoV-2, graças à sua ampla aplicação na detecção de patógenos respiratórios e facilidade de obtenção (Tan et al., 2021; Wang et al., 2020c).

Os testes sorológicos para detecção de SARS-CoV-2 podem ser classificados em duas categorias principais: testes baseados em anticorpos e testes baseados em antígenos (Maia et al., 2022). Os testes baseados em anticorpos detectam a presença de anticorpos específicos contra o vírus no hospedeiro, enquanto os testes baseados em antígenos detectam a presença de antígenos virais. No entanto, os testes sorológicos baseados em anticorpos não são recomendados para o diagnóstico de infecção aguda por SARS-CoV-2, pois os pacientes podem levar de 1 a 2 semanas para produzir anticorpos detectáveis. Em vez disso, esses testes são úteis

para determinar se um indivíduo já foi infectado ou se recuperou de SARS-CoV-2 anteriormente (Chung et al., 2024).

Em contraste, os testes baseados em antígenos têm alto valor diagnóstico para detecção de infecção viral atual, pois a presença de antígenos indica infecção ativa. A detecção de antígenos do SARS-CoV-2 pode ser realizada por meio de kits de teste rápido de antígeno (RAT) ou ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), que empregam anticorpos de captura direcionados às proteínas spike ou nucleocapsídeo do vírus (Chung et al., 2024).

### 1.9 Tratamento

O tratamento da COVID-19 envolve uma estratégia diversificada, que visa prevenir a replicação viral e aliviar sintomas e complicações. Durante a pandemia, vários ensaios clínicos foram realizados para avaliar medicamentos existentes e descobrir novos tratamentos. Atualmente, existem vários medicamentos aprovados para o tratamento da COVID-19, com destaque para terapias antivirais e imunomoduladora (Choi et al., 2024; Chung et al., 2024).

Os principais antivirais são: remdesivir e nirmatrelvir-ritonavir (Paxlovid). O remdesivir é um pró-fármaco nucleotídeo que tem como alvo a RNA polimerase dependente de RNA viral (RdRp) do SAR-CoV-2. Os ensaios clínicos indicaram que o Remdesivir poderia reduzir o risco de óbito ou hospitalização em 87% quando comparado a um placebo e que o efeito da medicação depende do estágio de replicação viral, sendo o Remdesivir eficaz no estágio inicial da infecção (Gottlieb et al., 2022; Pan et al., 2022).

O Nirmatrelvir-ritonavir (Paxlovid) é uma combinação de Nirmatrelvir, um inibidor de protease, e ritonavir, um inibidor do citocromo P450 3A4 (CYP3A4) e está indicado em casos leve a moderado, principalmente em adultos com alto risco de óbito ou hospitalização (Choi et al., 2024; Chung et al., 2024).

O tratamento com imunomoduladores na COVID-19 tem como objetivo prevenir e reduzir a tempestade de citocinas, modulando a

resposta imune e diminuindo a inflamação. A Anakinra é um inibidor do receptor de interleucina IL-1 tipo I que bloqueia tanto a IL-1 $\alpha$  quanto a IL-1 $\beta$ . Recebeu autorização de uso emergencial da FDA (Food and Drug Administration) para tratar pacientes adultos hospitalizados com pneumonia por COVID-19 que necessitam de oxigênio suplementar e apresentam alto risco de progressão para insuficiência respiratória grave (Choi et al., 2024; Chung et al., 2024).

O tocilizumabe, um inibidor do receptor de IL-6, que bloqueia a ligação da IL-6 aos seus receptores, foi autorizado pela FDA para uso em pacientes com 2 anos ou mais, hospitalizados com COVID-19, que estão recebendo glicocorticoides sistêmicos e necessitam de oxigênio suplementar ou ventilação mecânica (Choi et al., 2024).

O baricitinibe é um inibidor da Janus Kinase (JAK) que bloqueia a sinalização JAK/STAT, especificamente JAK1 e JAK2. A FDA aprovou o baricitinibe para tratar adultos hospitalizados com COVID-19 que necessitam de oxigênio suplementar, oxigenação por membrana extracorpórea ou ventilação mecânica. A via JAK/STAT é crucial para a resposta imune e a sinalização de citocinas, incluindo interleucinas, e a proliferação de células T (Choi et al., 2024; Chung et al., 2024).

Anticorpos monoclonais que bloqueiam a adesão celular do SARS-CoV-2 não são mais recomendados no tratamento da COVID-19 devido a um mecanismo de evasão imunológica. Anticorpos monoclonais terapêuticos aprovados não conseguiram neutralizar subvariantes ômicron, como BQ.1.1 ou XBB (Chung et al., 2024).

## 2. JUSTIFICATIVA

Embora o perfil de mediadores séricos solúveis — incluindo citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento — desempenhe um papel crucial na fisiopatologia da COVID-19, ainda existe uma lacuna significativa na literatura quanto à avaliação das diferenças e da evolução longitudinal desses marcadores ao longo do curso da doença, especialmente em pacientes com quadros graves.

A correlação entre esses mediadores e desfechos clínicos relevantes, como a necessidade de ventilação mecânica e a ocorrência de óbito, é fundamental para aprofundar a compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos e para subsidiar decisões terapêuticas mais eficazes.

Essas informações são essenciais para a estratificação de risco, seleção de intervenções adequadas, triagem precoce de casos graves e avaliação prognóstica em contextos clínicos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Analisar a resposta imune por meio da assinatura de mediadores séricos solúveis: quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e reguladoras e fatores de crescimento em pacientes com COVID-19 grave.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- 1) Relacionar os dados obtidos com a gravidade do quadro apresentado pelo paciente;
- 2) Associar os mediadores solúveis analisados com desfechos clínicos desfavoráveis (necessidade de uso de ventilação mecânica e óbito);
- 3) Comparar os mediadores solúveis analisados ao longo do acompanhamento cinético na internação hospitalar com desfechos clínicos desfavoráveis (necessidade de uso de ventilação mecânica e óbito);
- 4) Avaliar o potencial dos mediadores séricos solúveis como preditores de desfechos clínicos desfavoráveis (necessidade de ventilação mecânica e óbito).

## 4. MÉTODOS

### 4.1 Desenho do Estudo

Estudo observacional prospectivo conduzido entre maio de 2020 e setembro de 2020, durante o pico de circulação das cepas B.1.1.28 e B.1.1.33 do SARS-CoV-2, na pandemia de COVID-19 no Distrito Federal, Brasil.

### 4.2 População

Pacientes com diagnóstico de COVID-19 grave, internados no Hospital Universitário de Brasília (HUB), Hospital Regional de Taguatinga (HRT), Hospital Regional da Asa Norte (HRAN), participantes de um amplo protocolo de pesquisa denominado projeto TARGET(Kurizky et al., 2021), foram incluídos na admissão hospitalar (D0) e monitorados por 20 dias consecutivos.

**Critérios de inclusão:** capacidade de compreensão; diagnóstico de COVID-19 (RT PCR SARS CoV2 positivo);

**Critérios de exclusão:** doença mental orgânica, funcional ou oligofrenia, que comprometiam a qualidade da informação fornecida pelo paciente.

Casos graves de COVID-19 incluíram pacientes com dificuldade respiratória, frequência respiratória  $\geq 30/\text{min}$  ou saturação de oxigênio  $\leq 93\%$  em ar ambiente. Os pacientes com COVID-19 foram categorizados em subgrupos de acordo com o resultado da doença, denominados: Ventilação não mecânica (nMV), Ventilação mecânica (MV), Alta e Óbito.

Para todos os pacientes que atenderam aos critérios de inclusão, dados demográficos e clínicos foram obtidos de prontuários médicos.

O grupo controle, composto por controles saudáveis (HC) pré-pandêmicos não infectados, pareado por sexo e idade, foi selecionado por amostragem não probabilística de conveniência de

um biorrepositório mantido no Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Minas), Belo Horizonte, Brasil.

Todos os participantes da investigação assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com a Declaração de Helsinque e Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil para pesquisas envolvendo seres humanos. O estudo foi registrado na Plataforma Brasileira de Registro de Ensaios Clínicos (ReBEC, RBR-62zdkk) e aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, CAAE 30846920.7.0000.0008).

#### **4.3 Amostras Biológicas**

Os pacientes elegíveis foram submetidos a coleta sanguínea de sangue periférico por punção venosa em três tempos consecutivos: na admissão hospitalar (D0), na primeira (D1-6) e a partir da segunda (D7-20) semana de internação hospitalar. Amostras de soro foram obtidas por centrifugação (1400 x g, 10 min, 4°C) das amostras originais em até 12 h após a coleta de sangue. Todas as amostras foram criopreservadas em freezer -80°C até o momento do processamento para análise de mediadores solúveis séricos no Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ – Minas Gerais.

A dosagem de mediadores solúveis circulantes foi realizada pela plataforma Luminex Bio-Plex ProTM human cytokines 27 (Bio-Rad Laboratories, California, EUA) para a pesquisa simultânea dos seguintes analitos: quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5 e CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-15), citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13) e fatores de crescimento (IL-2, IL-7, FGF-basic, PDGF, VEGF, G-CSF e GM-CSF). A técnica utilizada apresenta limites mínimos de detecção geralmente na faixa de 0,2–5 pg/mL, dependendo do mediador analisado (Tabela Suplementar

1). Um técnico treinado realizou os ensaios multiplex de microesferas em lotes paralelos na unidade de citometria de fluxo. A análise quantitativa dos mediadores solúveis séricos foi realizada utilizando um ajuste de curva logística de 5 parâmetros a partir de curvas padrão, com resultados expressos em pg/mL.

#### 4.4 Análise Estatística

Uma variedade de softwares foi empregada para análise de dados, visando aproveitar ao máximo as funcionalidades de cada pacote estatístico. Embora alguns softwares compartilhem funções semelhantes, cada um oferece recursos específicos que contribuem para uma análise exploratória mais abrangente.

Análises estatísticas descritivas foram realizadas e o teste de normalidade dos dados foi avaliado pelo teste de Shapiro-Wilk, utilizando o software Prism 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Os níveis basais de mediadores solúveis no soro do grupo COVID-19 no momento D0 foram comparados aos Controles Saudáveis pré-pandêmicos não infectados (HC), utilizando o teste de Mann-Whitney, considerando a distribuição não paramétrica de todos os conjuntos de dados. Em todos os casos, um limiar de  $p < 0,05$  foi considerado para significância estatística.

A análise de correlação (testes de correlação de Pearson e Spearman) foi utilizada para construir matrizes de correlação e montar redes integrativas. Apenas correlações significativas com  $p < 0,05$  foram consideradas. As matrizes de correlação foram construídas utilizando o software R (Project for Statistical Computing versão 3.0.1) e o pacote “corrplot”. Uma chave de cores com escala de -1 a +1 foi utilizada para identificar correlações positivas (azul) e negativas (vermelho), com quadrados brancos indicando correlações não significativas. O software Cytoscape, uma plataforma de código aberto (disponível em <https://cytoscape.org>), foi utilizado para criar layouts de cluster. Redes de mediadores

solúveis séricos foram projetadas utilizando um layout de rede de cluster para representar cada categoria de mediadores solúveis séricos (quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas regulatórias e fatores de crescimento).

O software MATLAB foi utilizado para Análise de Componentes Principais (PCA) e análise de regressão. Os dados de PCA foram reunidos para verificar a capacidade dos mediadores séricos solúveis de agrupar COVID-19 de pacientes saudáveis, bem como subgrupos de COVID-19, de acordo com o desfecho da doença.

O modelo de regressão multivariada foi treinado utilizando o aplicativo Regression Learner do MATLAB, atribuindo valores de 0 às classes HC, nMV e Alta, e valores de 1 às classes COVID-19, MV e Óbito. Vinte e quatro modelos de regressão diferentes foram testados com um método de validação cruzada de 10 vezes, com o objetivo de prever os valores de 0 ou 1 a partir dos valores de mediadores solúveis séricos. Em cada cenário, o melhor modelo foi selecionado com base no maior R-quadrado (COVID vs HC - Modelo Boosted Tree Coarse; nMV vs MV - Modelo Gaussian SVM; Alta vs Óbito - Modelo Medium Gaussian SVM).

A magnitude da alteração nos níveis séricos de mediadores solúveis no grupo COVID-19 foi calculada como a razão entre os níveis séricos observados para cada paciente com COVID-19 no momento da admissão (D0), D1-6 e D7-20, dividida pelos valores medianos relatados para Controles Saudáveis (HC) pré-pandêmicos não infectados. A magnitude das alterações nos níveis séricos de mediadores solúveis foi determinada considerando: níveis diminuídos ( $\leq 3x$ ), inalterados ( $0,4x - 2x$ ) e aumentados ( $\geq 3x$ ) em relação aos valores medianos observados no grupo de pacientes com COVID-19. Gráficos orbitais foram gerados utilizando o Microsoft Excel versão 2012.

As construções de mapas de calor foram montadas utilizando formatação condicional no Microsoft Excel. A análise foi realizada utilizando os valores medianos da magnitude da alteração nos mediadores solúveis séricos no grupo COVID-19 em relação ao grupo HC. Uma chave de cores foi utilizada para sublinhar os atributos com níveis diminuídos (variação <1x, em direção ao verde), inalterados (variação =1x, preto) ou aumentados (variação >1x, em direção ao vermelho). Diagramas de linha do tempo foram empregados para identificar mediadores solúveis comuns e seletivos com níveis diminuídos ( $\leq 0,3x$ , verde) ou aumentados ( $\geq 3x$ , vermelho) ao longo da linha do tempo cinética.

A análise da curva ROC (Receiver Operating Characteristic) foi realizada utilizando o software MedCalc, versão 7.3.0.0 (Ostend, Bélgica, URL <https://www.medcalc.org/>) para cada mediador solúvel, a fim de avaliar os índices de desempenho (área sob a curva ROC = AUC, Sensibilidade = Se, Especificidade = Sp e Razão de Verossimilhança = RV). Os valores de AUC foram considerados para pré-selecionar mediadores solúveis para análise posterior. Um diagrama de dispersão dos valores individuais foi construído para fornecer o desempenho detalhado dos mediadores solúveis séricos pré-selecionados.

#### **4.5 Redação e Revisão**

A redação e revisão do manuscrito foram aprimoradas com o auxílio da ferramenta de inteligência artificial ChatGPT (OpenAI), utilizada para sugestões linguísticas e melhoria da concisão textual. Todo o conteúdo científico foi elaborado e validado pela autora, que assume total responsabilidade pela precisão das informações apresentadas.

## 5. RESULTADOS

Foram incluídos 82 pacientes com diagnóstico confirmado de COVID-19 grave, por meio de RT-PCR positivo para SARS-CoV-2, que atendiam aos critérios de inclusão e estavam internados em hospitais participantes entre maio e setembro de 2020. A distribuição dos pacientes nos subgrupos, de acordo com os desfechos clínicos, foi a seguinte: ventilação não mecânica (nMV,  $n = 71$ ), ventilação mecânica (MV,  $n = 11$ ), alta hospitalar ( $n = 75$ ) e óbito ( $n = 7$ ).

Ao todo, foram coletadas 213 amostras biológicas, distribuídas conforme o tempo de coleta: 82 amostras na admissão hospitalar (D0), 84 amostras entre o primeiro e o sexto dia após a admissão (D1–6) e 46 amostras entre o sétimo e o vigésimo dia (D7–20).

O grupo controle saudável (HC) foi composto por uma amostra de conveniência não probabilística, totalizando 164 indivíduos saudáveis, recrutados previamente à pandemia.

O desenho geral do estudo está ilustrado na Figura 9.

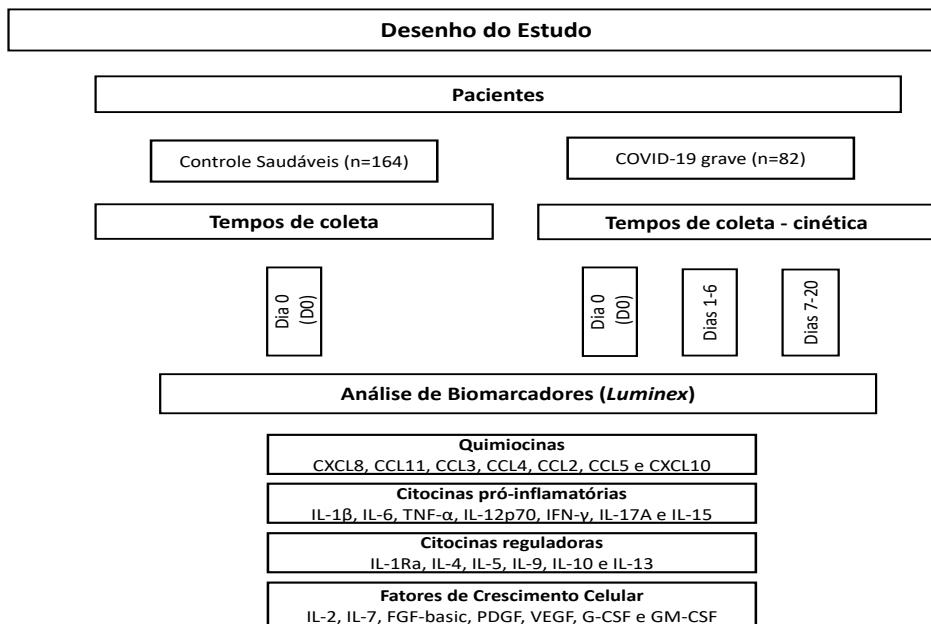


Figura 9. Visão geral da população de estudo.

## 5.1 Perfil da População Estudada

O grupo de pacientes com COVID-19 foi composto por 48 homens e 34 mulheres, com idades variando entre 23 e 76 anos (mediana = 50 anos).

Os sintomas mais frequentemente relatados foram dispneia, tosse e febre. As comorbidades mais prevalentes foram hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus. As principais características clínicas da amostra estão resumidas na Tabela 2.

Todos os pacientes com COVID-19 receberam tratamento com corticosteroides (metilprednisolona ou dexametasona), antibióticos (ceftriaxona, azitromicina ou ampicilina/sulbactam) e anticoagulantes (heparina de baixo peso molecular).

*Tabela 2.* Dados representados como número de indivíduos (%), exceto pela idade (mediana, mínimo-máximo), gênero (F/M). Somente as comorbidades e sintomas mais frequentes estão listados.

	Controles saudáveis (n=164)	Pacientes graves COVID-19 (n=82)
Idade (anos; mediana, min-máx)	50 (23-76)	50 (23-76)
Sexo, F/M	68/96	34/48
<b>Comorbidades</b>		
Hipertensão, n/total	N.D.	34/82 (41)
Diabetes, n/total (%)	N.D.	20/82 (24)
Doenças respiratórias, n/total (%)	N.D.	7/82 (8)
Doença cardiovascular, n/total (%)	N.D.	6/82 (7)
Outras	N.D.	3/82 (3)
<b>Sintomas na admissão hospitalar</b>		
Febre, n/total (%)	N.D.	55/82 (67)
Tosse, n/total (%)	N.D.	65/82 (79)
Dispneia, n/total (%)	N.D.	71/82 (86)
Dor torácica, n/total (%)	N.D.	23/82 (24)
Ventilação mecânica, n/total (%)	N.D.	11/82 (13)
Óbito, n/total (%)	N.D.	7/82 (8)

## 5.2 Perfil Geral de Mediadores Séricos Solúveis em Pacientes com COVID-19 Grave no Momento da Admissão Hospitalar

Os níveis de mediadores solúveis séricos (quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias ou regulatórias e fatores de crescimento)

em pacientes com COVID-19 grave foram quantificados no momento da admissão hospitalar (D0) e comparados aos níveis observados em controles saudáveis pré-pandêmicos não infectados (HC) (Figura 10). A análise de dados demonstrou que, no geral, o grupo COVID-19 exibiu uma tempestade massiva de mediadores solúveis em comparação aos controles saudáveis, caracterizada por níveis aumentados de CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-1Ra, IL-9, FGF-básico, G-CSF e IL-2; e níveis reduzidos de CCL11, IL-12, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, PDGF, VEGF, GM-CSF e IL-7.

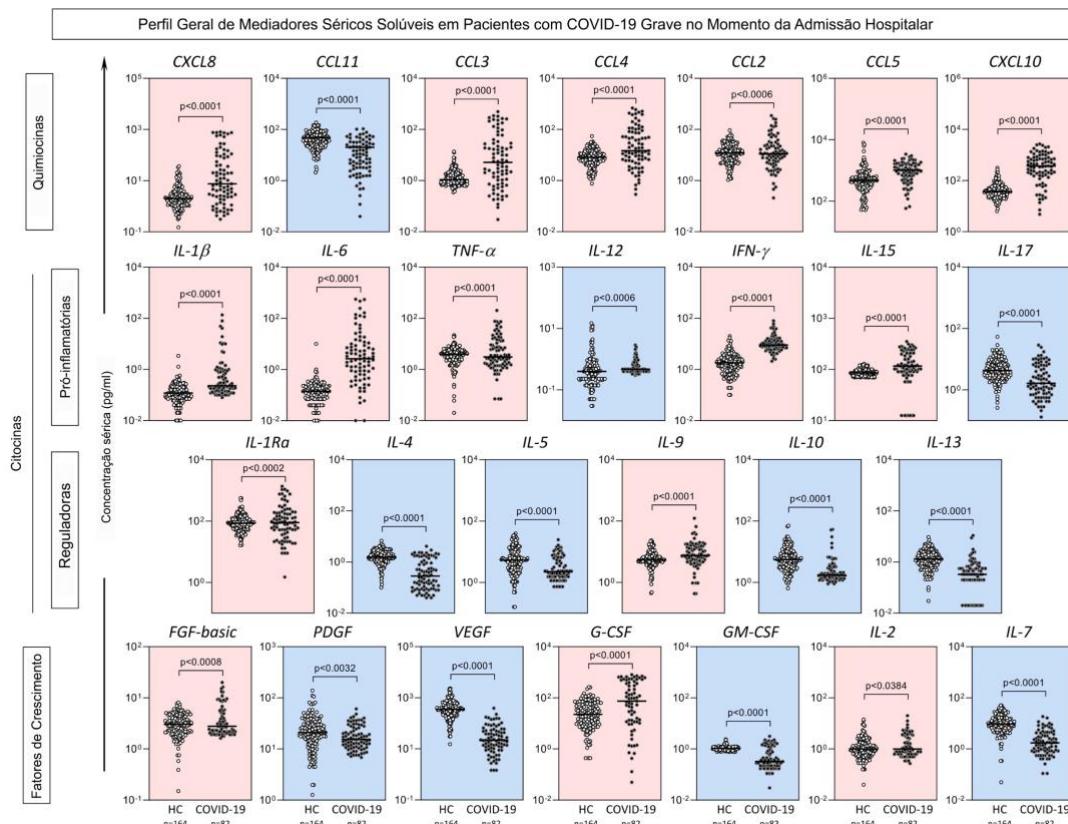


Figura 10. Perfil geral de mediadores séricos solúveis em pacientes com COVID-19 grave na admissão hospitalar (D0). Os níveis séricos de quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-17), citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-7) foram medidos em pacientes com COVID-19 na admissão hospitalar (D0, n=82) e Controles Saudáveis pré-pandêmicos não infectados (HC, n=164). Os resultados são apresentados como distribuição de dispersão dos valores individuais (pg/mL) em escala logarítmica, com linhas indicando os valores medianos. A análise comparativa entre COVID-19 e HC foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, e as diferenças significativas em p < 0,05 foram destacadas por linhas de

conexão e valores de p fornecidos na figura. Os fundos coloridos destacam os níveis diminuídos (azul) ou aumentados (rosa) de mediadores séricos solúveis na COVID-19 em comparação com HC.

Análises adicionais compararam os níveis de mediadores solúveis séricos em pacientes com COVID-19 classificados de acordo com o desfecho da doença, denominados: Ventilação Não Mecânica (nMV) vs. Ventilação Mecânica (MV) e Alta vs. Óbito. A análise comparativa revelou que os pacientes nos grupos MVn e Alta apresentaram níveis mais elevados de CCL3 e G-CSF, enquanto os pacientes nos grupos MV e Óbito exibiram níveis mais elevados de CXCL10 e IL-6, além de níveis mais baixos de IL-10 (Tabela 3).

*Tabela 3.* Perfil panorâmico de mediadores solúveis séricos medidos na admissão hospitalar (D0) em pacientes com COVID-19 GRAVE de acordo com o desfecho da doença

Parâmetros	Subgrupos de COVID-19			
	nMV (n=71)	MV (n=11)	Altas (n=75)	Óbitos (n=7)
CXCL8	8.9 (1.7-91.2)	8.9 (4.3-294)	10.2 (2.1-88.4)	7.3 (3.6-289)
CCL11	11.1 (3.2-32.2)	5.5 (0.6-21.8)	10.4 (3.3-31.7)	4.5 (1.1-16.2)
<b>CCL3</b>	<b>↑5.9 (0.8-31.3)*</b>	2.2 (1.1-8.5)	<b>↑5.7 (1.1-29)*</b>	2.5 (1.3-147)
CCL4	19.1 (6.1-85.0)	11.1 (5.7-72.7)	18.9 (6.4-81.3)	12.2 (6.2-198)
CCL2	10.4 (4.9-24.2)	11.8 (4.7-54.4)	11.3 (5.6-23.0)	10.9 (4.6-78.9)
CCL5	1.010 (477-1,569)	854 (514-1,650)	962 (480-1,558)	863 (683-1,560)
<b>CXCL10</b>	<b>339 (146-711)</b>	<b>↑557 (249-1.425)*</b>	353 (151-716)	<b>↑555 (296-1.904)*</b>
IL-1 $\beta$	0.3 (0.1-0.9)	0.2 (0.1-0.5)	0.3 (0.1-0.9)	0.2 (0.2-1.0)
<b>IL-6</b>	<b>2.0 (0.5-7.2)</b>	<b>↑5.4 (2.5-10.9)*</b>	2.1 (0.5-7.1)	<b>↑4.2 (1.8-65.9)*</b>
TNF- $\alpha$	3.4 (1.4-13.1)	2.7 (1.5-8.8)	3.5 (1.5-11.9)	1.6 (1.6-13.8)
IL-12	0.5 (0.4-0.8)	0.5 (0.5-0.9)	0.5 (0.4-0.8)	0.5 (0.5-1.2)
IFN- $\gamma$	8.9 (6.6-13.6)	9.8 (8.3-19.0)	8.9 (7.0-14.5)	9.8 (7.2-19.7)
IL-15	117 (90.4-208)	90.4 (81.9-151)	117 (90.4-208)	106 (79.9-212)
IL-17	1.6 (0.7-6.3)	1.3 (0.8-3.0)	1.6 (0.7-6.0)	1.3 (1.0-5.6)
IL-1Ra	93.5 (41.3-193)	69.1 (34.3-181)	93.5 (45.2-190)	60.1 (36.1-163)
IL-4	0.3 (0.1-1.1)	0.2 (0.1-0.3)	0.3 (0.1-1.1)	0.2 (0.1-1.1)
IL-5	2.4 (1.6-6.6)	2.0 (1.6-4.3)	2.4 (1.6-6.4)	2.2 (1.8-6.4)
IL-9	7.3 (4.7-15.4)	10.3 (5.4-15.0)	7.4 (5.1-13.8)	13.4 (5.4-15.1)
<b>IL-10</b>	<b>1.8 (1.4-2.8)</b>	<b>↓1.5 (1.2-2.1)*</b>	1.8 (1.5-2.8)	<b>↓1.3 (1.2-10.3)</b>
IL-13	0.5 (0.2-0.6)	0.3 (0.2-1.3)	0.3 (0.2-0.6)	0.3 (0.1-1.6)
FGF-basic	2.8 (2.2-5.7)	2.3 (2.1-2.9)	2.8 (2.2-5.2)	2.3 (2.1-6.1)
PDGF	21.6 (10.3-58.8)	23.7 (8.9-38.3)	21.6 (10.0-51.8)	23.7 (13.1-37.6)
VEGF	15.6 (11.1-26.4)	15.2 (10.7-21.3)	15.6 (11.4-25.2)	12.7 (10.7-26.5)
<b>G-CSF</b>	<b>↑97.0 (11.7-438)*</b>	11.6 (3.6-46.7)	<b>94.0 (13.0-416)*</b>	11.3 (3.4-38.3)
GM-CSF	0.4 (0.2-1.3)	0.3 (0.2-0.8)	0.4 (0.2-1.2)	0.3 (0.2-1.0)
IL-2	1.1 (0.6-3.5)	0.8 (0.6-1.7)	1.1 (0.6-3.3)	0.8 (0.6-3.1)
IL-7	1.8 (0.8-4.2)	1.0 (0.8-8.0)	1.8 (0.8-4.0)	1.0 (0.8-5.1)

nMV = Ventilação Não-Invasiva; MV = Ventilação Mecânica.

Os dados são apresentados como valores medianos do intervalo interquartil (IIQ) do 25º ao 75º, expressos em pg/mL. Diferenças significativas em  $p<0,05$  são sublinhadas com \* e destacadas em negrito.

### **5.3 Análise de Redes Integrativas de Mediadores Séricos Solúveis em Pacientes com COVID-19 Grave na Admissão Hospitalar**

Análises de redes integrativas foram realizadas com o objetivo de explorar a complexa estrutura funcional dos mediadores séricos solúveis em pacientes com COVID-19 grave (Figura 11). Os resultados revelaram que esses pacientes apresentaram uma rede mais densa e robusta de interações entre mediadores (252 correlações fortes), em comparação com os controles saudáveis (56 correlações fortes). A análise comparativa da conectividade entre citocinas pró-inflamatórias e reguladoras evidenciou uma predominância do eixo pró-inflamatório no grupo COVID-19 (razão = 1,9), contrastando com a menor predominância observada nos controles (razão = 0,8).

Análises adicionais por subgrupos demonstraram que pacientes que necessitaram de ventilação mecânica (MV) ou que evoluíram para óbito apresentaram redes ainda mais complexas (362 e 302 correlações fortes, respectivamente), em comparação com pacientes que não necessitaram de ventilação mecânica (nMV, 274 correlações) ou que receberam alta hospitalar (264 correlações).

A razão entre conectividade pró-inflamatória e reguladora no momento da admissão hospitalar (D0) revelou uma predominância do eixo pró-inflamatório nos pacientes com desfechos clínicos favoráveis (nMV e alta hospitalar; razão = 1,9), enquanto essa predominância foi atenuada nos pacientes com pior evolução clínica (MV = 1,3; óbito = 1,1), conforme ilustrado na Figura 11.

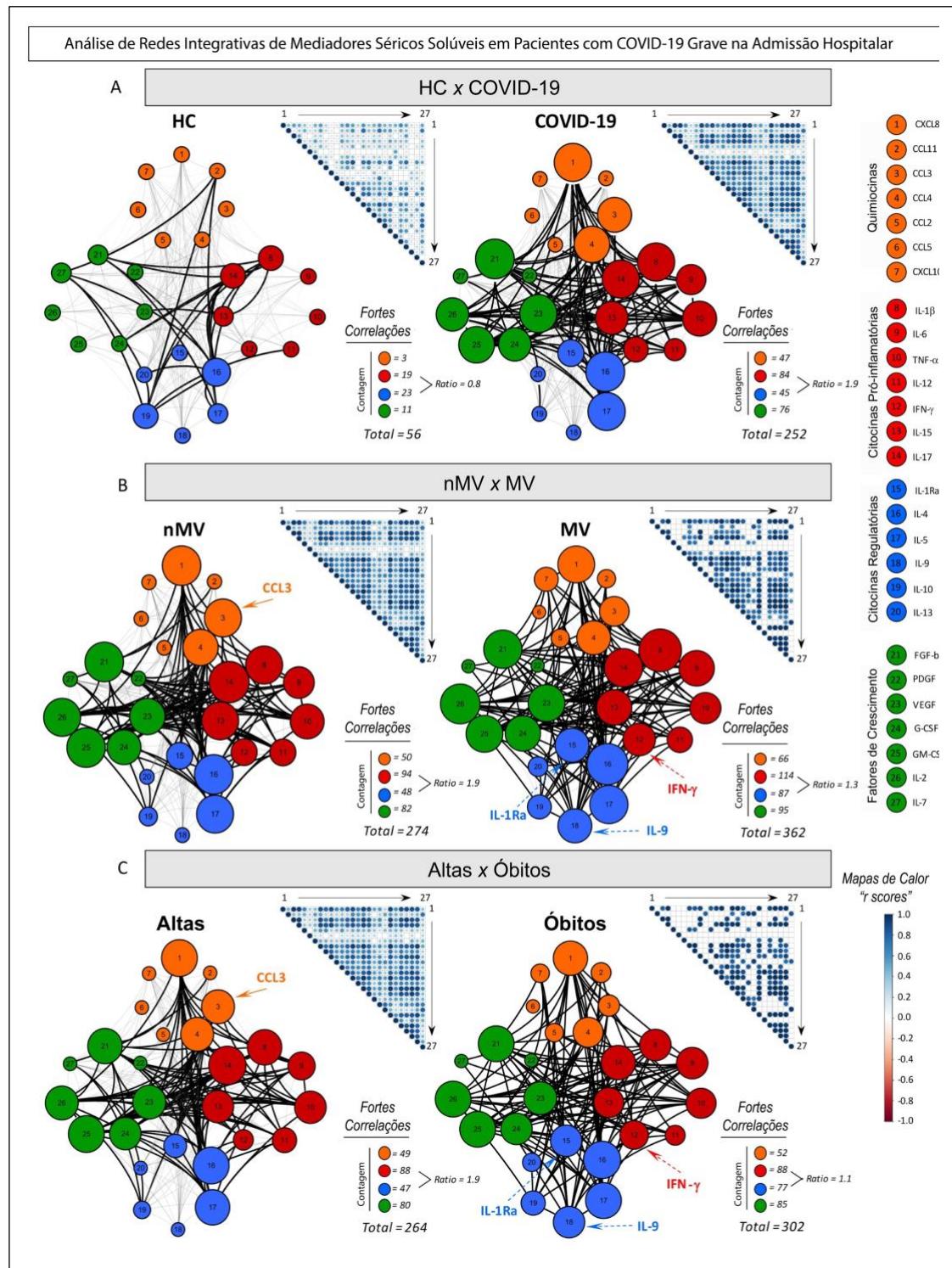


Figura 11. Matrizes de correlação e redes de mediadores séricos solúveis em pacientes com COVID-19 grave na admissão hospitalar (D0). Matrizes de correlação e redes de mediadores séricos solúveis em pacientes com COVID-19 grave na admissão hospitalar (D0). **(A)** Matrizes de correlação abrangentes e redes foram montadas para quimiocinas séricas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento observados em pacientes com COVID-19 grave ( $n = 82$ ) e Controles Saudáveis (HC,  $n = 164$ ) pré-pandêmicos não infectados. Os pacientes com COVID-19 foram categorizados em subgrupos de acordo com o desfecho da doença, denominados: **(B)** Ventilação Não Mecânica (MVn,  $n = 71$ ) vs Ventilação Mecânica (VM,  $n = 11$ ) e **(C)** Alta ( $n = 75$ ) vs Óbito ( $n = 7$ ). Os mediadores solúveis foram medidos pela plataforma Luminex Bio-Plex, conforme descrito em Material e Métodos. As análises de dados foram realizadas pelos testes de classificação de Pearson e Spearman, e correlações significativas com  $p < 0,05$  foram empregadas para construir uma visão geral dos modelos de matrizes com cada interseção quadrada representando os escores de correlação "r"

entre pares de atributos. Uma chave de cores com escala de -1 a +1 foi usada para identificar correlações positivas (azul) e negativas (vermelho), e quadrados brancos indicaram correlações não significativas. As redes foram construídas considerando todas as correlações significativas, usando um layout de cluster para cada categoria de mediadores solúveis séricos, com nós representando: quimiocinas (nós laranja – 1=CXCL8; 2=CCL11; 3=CCL3; 4=CCL4; 5=CCL2, 6=CCL5 e 7=CXCL10), pró-inflamatórias (nós vermelhos – 8=IL-1 $\beta$ ; 9=IL-6; 10=TNF- $\alpha$ ; 11=IL-12; 12=IFN- $\gamma$ ; 13=IL-15 e 14=IL-17), citocinas regulatórias (nós azuis – 15=IL-1Ra; 16=IL-4; 17=IL-5; 18=IL-9; 19=IL-10 e 20=IL-13) e fatores de crescimento (nós verdes – 21=FGF-básico; 22=PDGF; 23=VEGF; 24=G-CSF; 25=GM-CSF; 26=IL-2 e 27=IL-7). As bordas de conexão ilustram correlações fracas/moderadas (pontuações “r” entre |0,1 a 0,67|, linhas cinzas finas) e fortes (pontuações “r”  $\geq$  |0,67|, linhas pretas grossas). Correlações negativas são representadas por linhas tracejadas. Os tamanhos dos nós são proporcionais ao número de conectividade de vizinhança forte entre pares de atributos. O número de correlações fortes (Total e Intra-cluster), bem como a razão pró-inflamatória/regulatória de correlações fortes foram usados para análise comparativa de COVID-19 vs HC e entre subgrupos de COVID-19 (nMV vs MV e Alta vs Óbito). Os nós com conectividade de vizinhança distinta associados a bom (nMV e Alta) ou mau prognóstico (MV e Óbito) são destacados por setas contínuas ou tracejadas, respectivamente.

Para melhor compreender esses achados quantitativos, foi conduzida uma análise qualitativa dos mediadores pró-inflamatórios e reguladores específicos envolvidos nas correlações. Os resultados indicaram que pacientes que necessitaram de ventilação mecânica ou evoluíram para óbito apresentaram um número aumentado de correlações fortes envolvendo IFN- $\gamma$ , IL-1Ra e IL-9, em comparação com aqueles que não necessitaram de ventilação mecânica ou que tiveram alta. Especificamente, observaram-se os seguintes padrões de correlação nos grupos nMV vs. MV e Alta vs. Óbito, respectivamente: IFN- $\gamma$  (9 vs. 15 e 6 vs. 12), IL-1Ra (9 vs. 16 e 8 vs. 14) e IL-9 (16 vs. 0 e 14 vs. 0).

#### **5.4 Análise Multivariada de Mediadores Séricos Solúveis em Pacientes com COVID-19 Grave na Admissão Hospitalar**

Análises multivariadas de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento foram conduzidas por meio de Análise de Componentes Principais (PCA) e regressão multivariada, com o objetivo de avaliar a capacidade dos mediadores séricos solúveis em distinguir pacientes com COVID-19 de controles saudáveis pré-pandêmicos não infectados (HC) (Figura 12).

Os resultados da PCA revelaram que os pacientes com COVID-19 formaram um agrupamento (cluster) distinto dos controles, com base nas coordenadas dos dois primeiros

componentes principais. A análise vetorial indicou que os seguintes mediadores estavam fortemente associados ao grupo COVID-19: CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-1Ra, IL-9, FGF-básico, G-CSF e IL-2. Por outro lado, os mediadores associados aos indivíduos controles foram: CCL11, IL-12, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, PDGF, VEGF, GM-CSF e IL-7.

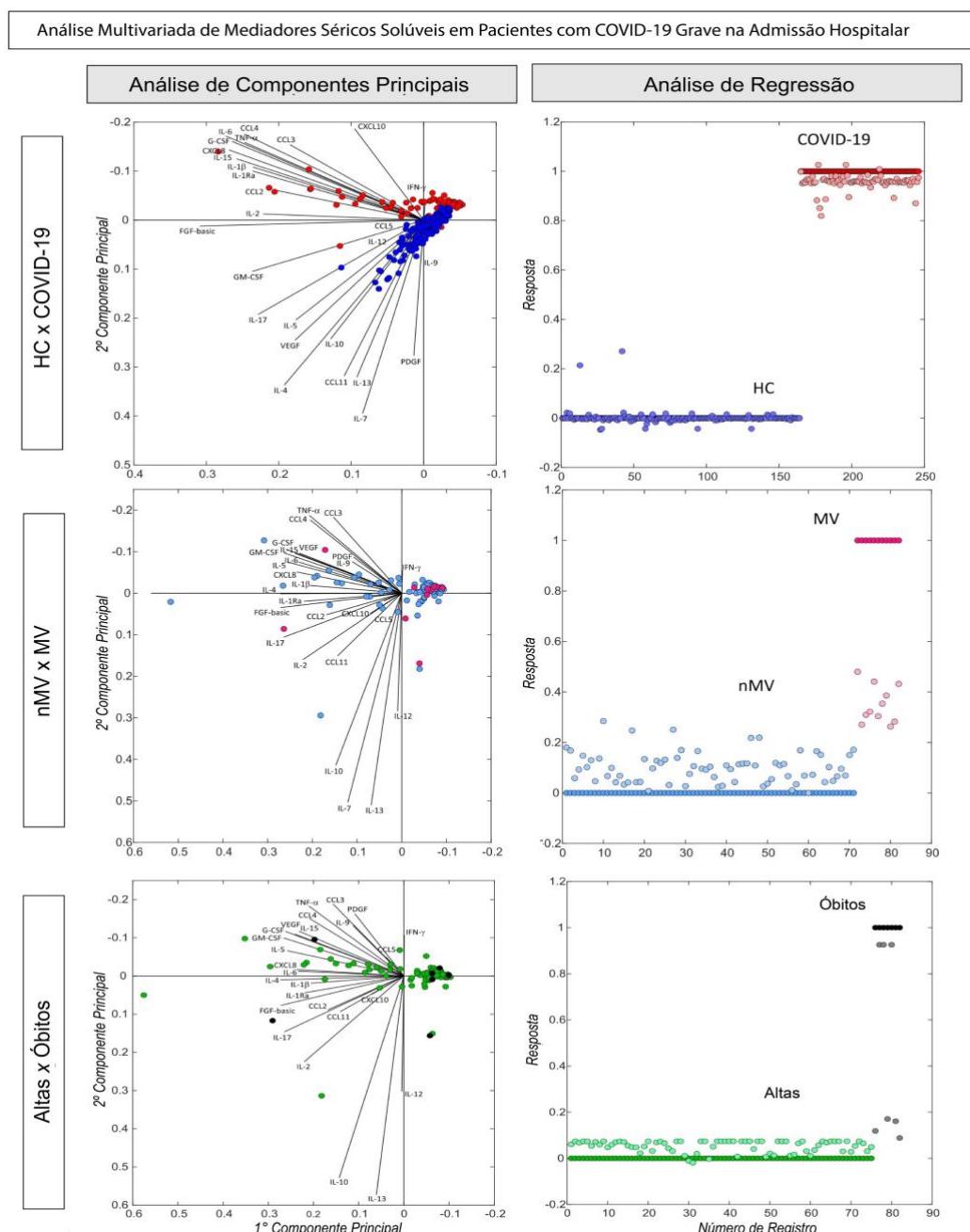


Figura 12. Análise multivariada de mediadores séricos solúveis em pacientes com COVID-19 grave de acordo com o desfecho da doença. Análise multivariada de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento foram realizadas para verificar a capacidade dos mediadores séricos solúveis de agrupar a COVID-19 ( $n = 82$ ) dos Controles Saudáveis pré-pandêmicos não infectados (HC,  $n = 164$ ), bem como subgrupos de COVID-19, de acordo com o desfecho da doença, denominados: Ventilação Não Mecânica (nMV,  $n = 71$ ) vs Ventilação Mecânica (MV  $n = 11$ ) e Alta ( $n = 75$ ) vs Óbito ( $n = 7$ ). Os mediadores solúveis foram medidos pela plataforma Luminex Bio-Plex, conforme descrito em Material e Métodos. Análise de Componentes Principais (PCA) e análise de regressão multivariada foram realizadas pelo software MATLAB, conforme descrito em Material e Métodos. As coordenadas PCA (1º e 2º componentes principais) foram utilizadas para comparar e visualizar o agrupamento de COVID-19 vs. HC, nMV vs. MV e Alta vs. Óbito. O modelo de regressão multivariada foi treinado utilizando o Regression Learner, atribuindo valores 0 às classes HC, nMV e Alta e valores 1 às classes COVID-19, MV e Óbito. O modelo selecionado para análise foi obtido após 10 vezes o treinamento, com base no maior R-quadrado.

A regressão multivariada corroborou os achados da PCA, reforçando o potencial dos mediadores séricos na discriminação entre pacientes com COVID-19 e indivíduos saudáveis. No entanto, os resultados não indicaram que o perfil de mediadores solúveis séricos seja capaz de distinguir subgrupos de pacientes com COVID-19 com base nos desfechos clínicos avaliados.

### **5.5 Magnitude de Alterações nos Mediadores Séricos Solúveis na Admissão Hospitalar de Pacientes Graves com COVID-19 Grave de Acordo com o Desfecho da Doença**

Para avaliar a magnitude das alterações nos níveis séricos de mediadores solúveis em pacientes com COVID-19 grave, foram calculadas as razões de variação entre os valores individuais de cada mediador na admissão hospitalar (D0) e os valores medianos correspondentes observados no grupo controle saudável (HC). Essa análise abrangeu quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento.

Os dados revelaram que os pacientes com COVID-19 grave apresentaram uma resposta pró-inflamatória exacerbada, evidenciada por elevações expressivas nos níveis de IL-6 e CXCL10, com ordens de magnitude de  $\geq 19x$  e  $\geq 10x$ , respectivamente. Em contraste, foi observado um perfil imunorregulador comprometido, com níveis significativamente

reduzidos de IL-4, IL-13 e IL-10, cujas magnitudes foram de 0,1x, 0,2x e 0,3x, respectivamente. O G-CSF destacou-se como o único fator de crescimento com magnitude aumentada nos pacientes com COVID-19.

Análises adicionais estratificaram os pacientes com COVID-19 de acordo com os desfechos clínicos: ventilação não mecânica (nMV) versus ventilação mecânica (MV) e alta hospitalar versus óbito. Os resultados demonstraram que os subgrupos nMV e alta apresentaram maiores ordens de magnitude para CCL3 (6x e 5x, respectivamente) e G-CSF (4x). Por outro lado, os subgrupos MV e óbito exibiram maiores magnitudes para IL-6 (39x e 30x, respectivamente) e CXCL10 (15x) (Figura 13).

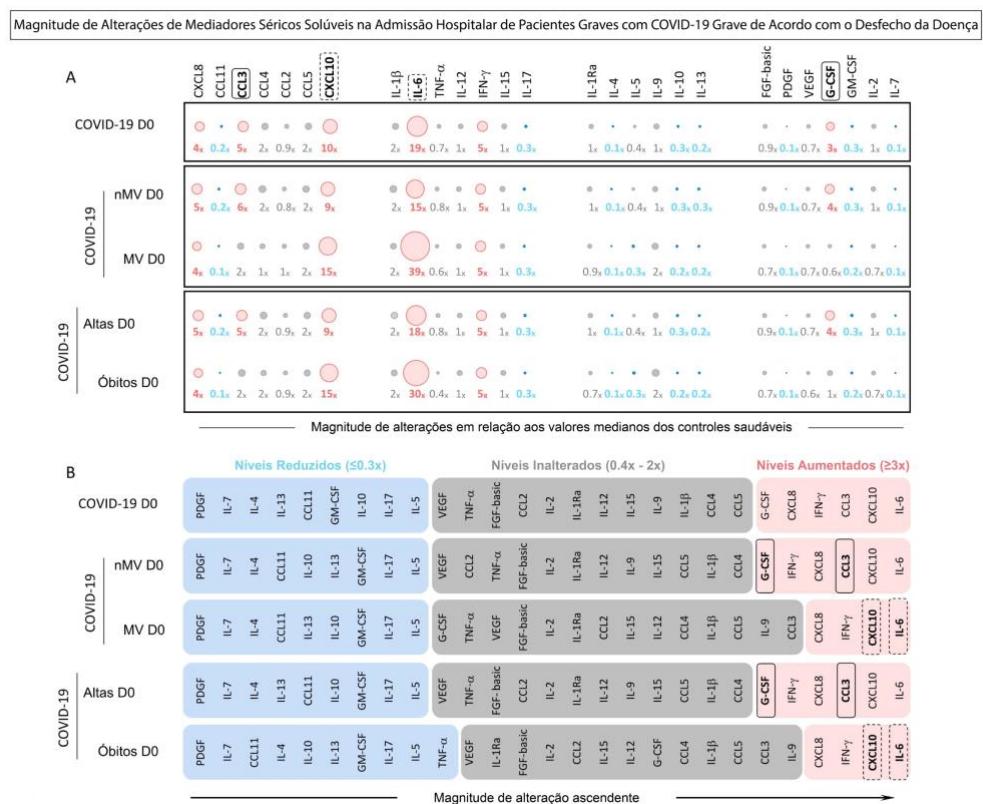


Figura 13. Magnitude de alterações dos mediadores séricos solúveis na admissão hospitalar (D0) de pacientes com COVID-19 grave de acordo com o desfecho da doença. A magnitude de alteração das quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-17), citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2 e IL-7) foram calculados em pacientes com COVID-19 ( $n=82$ ), posteriormente categorizados em subgrupos de acordo com o

resultado da doença, denominados: Ventilação não mecânica (nMV, n=71) vs Ventilação mecânica (MV, n=11) e Alta (n=75) vs Óbito (n=7). Os mediadores séricos solúveis foram medidos pela plataforma Luminex Bio-Plex, conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados são apresentados como a proporção dos níveis observados para cada paciente com COVID-19 na admissão (D0) dividida pelos valores medianos relatados para Controles Saudáveis (HC, n=164) pré-pandêmicos não infectados. (A) Os gráficos orbitais das magnitudes de alteração demonstram os níveis diminuídos ( $\leq 0,3x$ , azul), inalterados (0,4-2x, cinza) ou aumentados ( $\geq 3x$ , rosa) em relação aos valores medianos observados no HC. (B) Assinaturas ascendentes das magnitudes de alteração foram realizadas para identificar mediadores séricos solúveis de bom (nMV e Alta, retângulos contínuos) ou mau prognóstico (MV e Óbitos, retângulos tracejados).

As magnitudes dos marcadores séricos foram posteriormente classificadas em ordem crescente, sendo distribuídas em três categorias: magnitudes reduzidas ( $\leq 0,3x$ ), magnitudes inalteradas (0,4x a 2x) e magnitudes aumentadas ( $\geq 3x$ ), conforme os desfechos clínicos dos pacientes.

Os resultados indicaram que G-CSF e CCL3 estavam seletivamente aumentados em pacientes com prognóstico favorável (nMV e alta hospitalar). Adicionalmente, embora CXCL10 e IL-6 apresentassem níveis elevados em todos os subgrupos de pacientes com COVID-19, suas ordens de magnitude foram mais acentuadas nos grupos com prognóstico desfavorável (MV e óbito), em comparação com os grupos de melhor evolução clínica (Figura 13).

## **5.6 Cinética Temporal da Magnitude de Alterações dos Mediadores Séricos Solúveis em Pacientes com COVID-19 Grave de Acordo com o Desfecho da Doença**

Com o objetivo de caracterizar a evolução temporal dos mediadores séricos solúveis em pacientes com COVID-19 grave, foram avaliadas suas magnitudes em três momentos consecutivos: admissão hospitalar (D0,  $n = 82$ ), entre 1 e 6 dias após a admissão (D1–6,  $n = 84$ ) e entre 7 e 20 dias após a admissão (D7–20,  $n = 46$ ).

Durante o acompanhamento cinético, observaram-se alterações significativas nos níveis de diversos mediadores. Foi identificado um aumento na ordem de magnitude ( $\geq 3x$ ) para CXCL8,

CCL3, IL-6, IFN- $\gamma$  e G-CSF, enquanto uma redução significativa ( $\leq 0,3x$ ) foi observada para CCL11, IL-4, IL-5, IL-10, PDGF e IL-7.

Especificamente, os níveis de IL-6 permaneceram persistentemente elevados ao longo do tempo (D0 = 19x; D1-6 = 10x; D7-20 = 11x), ao passo que os níveis de CXCL10 apresentaram um declínio progressivo (D0 = 10x; D1-6 = 3x; D7-20 = 1x). Essas tendências foram confirmadas por representações visuais em mapa de calor (Figura 14).

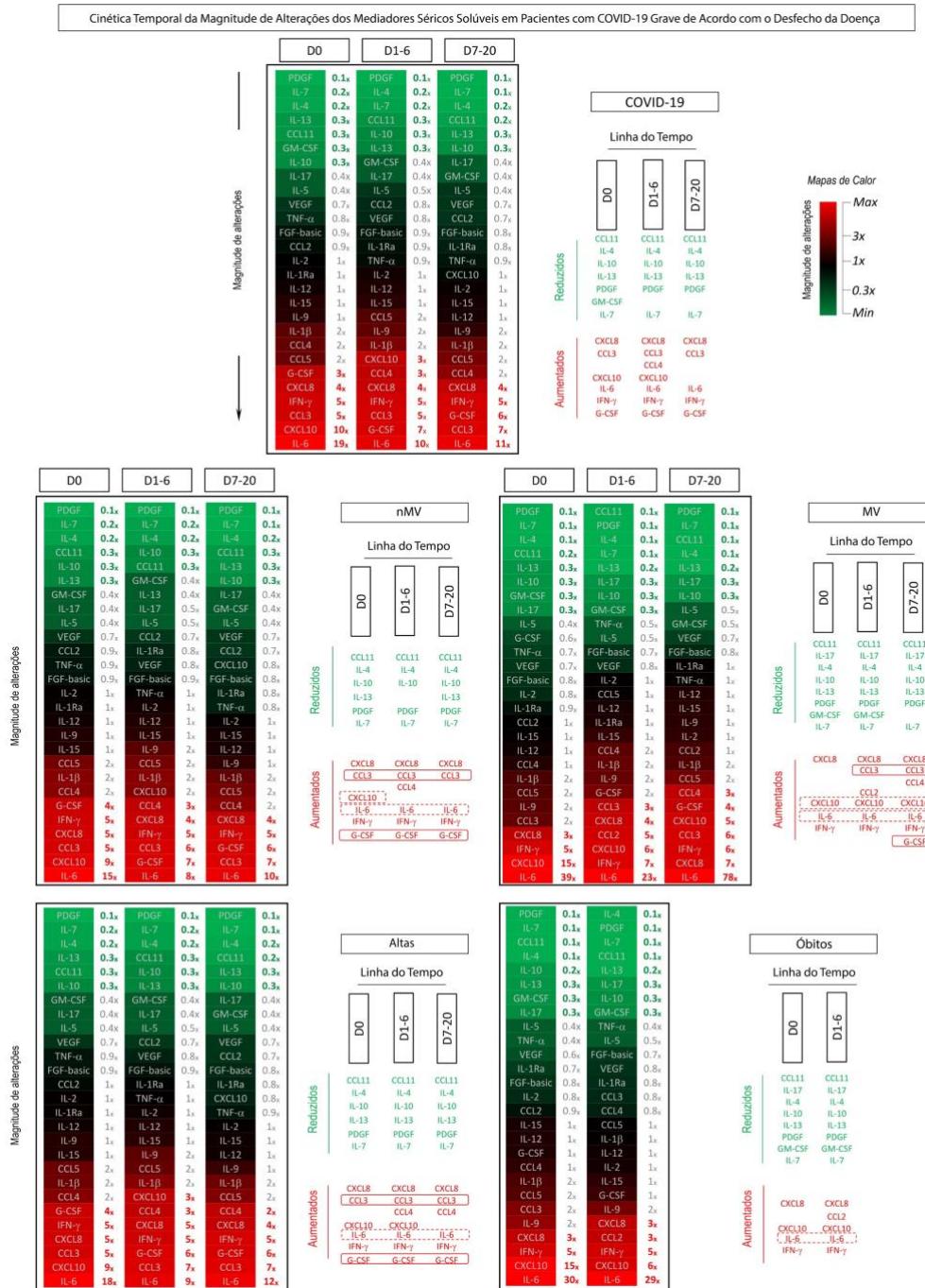


Figura 14. Cinética temporal da magnitude de alterações dos mediadores séricos solúveis em pacientes com COVID-19 grave de acordo com o desfecho da doença. As magnitudes das quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-17), citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-7) foram avaliadas ao longo do acompanhamento cinético após a admissão (D0, D1-6 e D7-20) em pacientes com COVID-19 ( $n = 82$ ), posteriormente categorizados em subgrupos de acordo com o desfecho da doença, denominados: Ventilação não mecânica (nMV,  $n = 71$ ) vs Ventilação mecânica (MV,  $n = 11$ ) e Alta ( $n = 75$ ) vs. Óbito ( $n = 7$ ). Os mediadores séricos solúveis foram medidos pela plataforma Luminex Bio-Plex, conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados são apresentados como a proporção dos níveis observados para cada paciente com COVID-19 ao longo do acompanhamento cinético, dividida pelos valores medianos relatados para Controles Saudáveis (CS) pré-pandêmicos não infectados (HC,  $n = 164$ ). Os dados são apresentados em construções de mapas de calor que ilustram a assinatura ascendente das magnitudes de alteração ao decorrer do acompanhamento cinético. Uma chave de cores foi usada para sublinhar os atributos com níveis diminuídos (magnitude <1x, em direção ao verde), inalterados (magnitude =1x, preto) ou aumentados (magnitude >1x, em direção ao vermelho). Uma análise mais aprofundada foi realizada por diagramas de linha do tempo para identificar mediadores solúveis comuns e seletivos (retângulos) com níveis diminuídos ( $\leq 0,3x$ , verde) ou aumentados ( $\geq 3x$ , vermelho) ao longo da linha do tempo. Os mediadores séricos solúveis de bom (nMV e Alta) ou mau prognóstico (MV e Óbito) são destacados por retângulos contínuos ou tracejados, respectivamente.

A cinética temporal dos mediadores séricos solúveis foi analisada em subgrupos de pacientes com COVID-19, stratificados de acordo com os desfechos clínicos: necessidade de ventilação mecânica (nMV vs. MV) e evolução para alta hospitalar ou óbito (Figura 14).

Os resultados demonstraram que pacientes que evoluíram para ventilação mecânica apresentaram um aumento progressivo nos níveis de IL-6 ao longo do tempo (D0 = 39x; D7–20 = 78x), enquanto aqueles que não necessitaram de ventilação (nMV) exibiram uma leve redução nos níveis dessa citocina (D0 = 15x; D7–20 = 10x).

Adicionalmente, pacientes do grupo MV mantiveram níveis elevados de CXCL10 em todos os pontos temporais avaliados (D0 = 15x; D1–6 = 6x; D7–20 = 5x). Em contraste, os pacientes nMV apresentaram níveis aumentados de CXCL10 apenas no início (D0

= 9x), seguidos por um declínio progressivo (D1–6 = 2x; D7–20 = 0,8x).

A comparação entre pacientes que receberam alta hospitalar e aqueles que evoluíram para óbito revelou que estes últimos apresentaram níveis mais elevados de IL-6 e CXCL10 nos respectivos pontos temporais avaliados (Figura 14).

Além disso, níveis aumentados de CCL3 e G-CSF foram observados predominantemente na admissão hospitalar (D0) e mantidos ao longo do tempo em pacientes com desfecho clínico favorável (nMV e alta hospitalar). Por outro lado, pacientes com prognóstico desfavorável (MV e óbito) apresentaram elevações tardias ou ausência de aumentos significativos desses mediadores durante o período de acompanhamento (Figura 14).

### **5.7 Desempenho de Mediadores Séricos Solúveis para Classificar Pacientes com COVID-19 Grave de Acordo com o Desfecho da Doença**

Para avaliar a utilidade de parâmetros imunológicos como ferramentas complementares para o diagnóstico e prognóstico da COVID-19, foi analisada a aplicabilidade de mediadores séricos solúveis como biomarcadores laboratoriais. Desta forma, foram analisados os níveis de concentração desses mediadores na admissão (D0) e a variação dos níveis séricos ao longo do tempo, calculada como a razão de concentração de valores do D1-6/D0. O desempenho desses biomarcadores foi avaliado pela análise da curva ROC, e a área sob a curva ROC (AUC) foi utilizada como medida de acurácia global.

Os índices de desempenho dos mediadores séricos solúveis na admissão (D0) para classificar pacientes com COVID-19 e do grupo HC são mostrados na Figura 15. Os dados demonstraram que PDGF, IFN- $\gamma$  e IL-6 exibiram acurácia global elevada (AUC>0,9)

configurando-se como mediadores solúveis confiáveis para discriminar pacientes com COVID-19 dos controles saudáveis (HC).

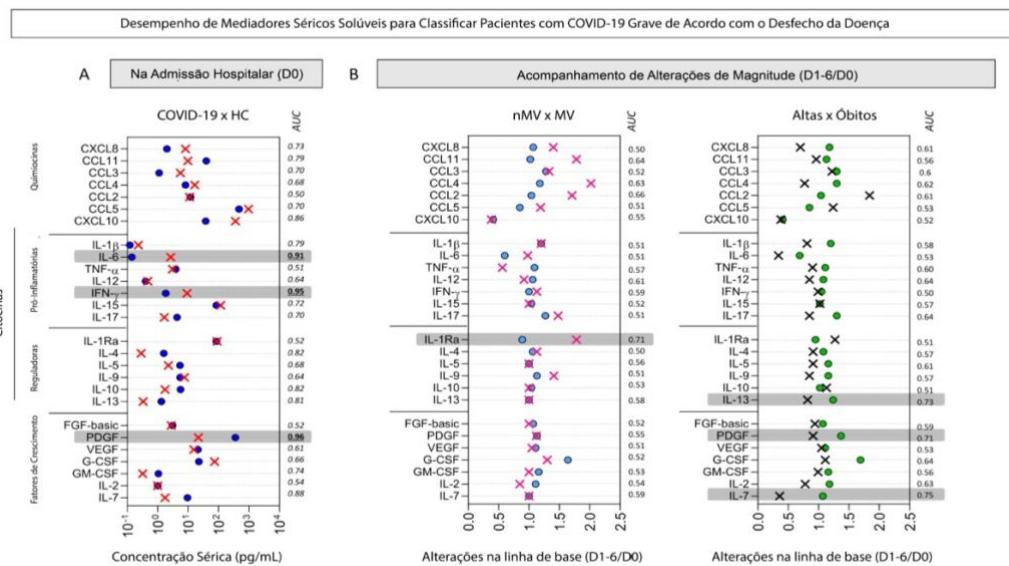


Figura 15. Desempenho de Mediadores Séricos Solúveis para Classificar Pacientes com COVID-19 Grave de Acordo com o Desfecho da Doença. O desempenho de quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-17), citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-7) para classificar pacientes com COVID-19 foi avaliado para identificar parâmetros imunológicos candidatos para fins complementares de diagnóstico e prognóstico. Análises da curva ROC (Receiver Operating Characteristic) foram construídas para cada mediador solúvel e a área sob a curva ROC (AUC) foi usada como escores de precisão global. **(A)** A concentração sérica de mediadores solúveis (pg/mL) quantificada na admissão (D0) foi empregada para classificar pacientes com COVID-19 (X vermelho, n=82) de Controles Saudáveis pré-pandêmicos não infectados (HC, círculo azul royal, n=164) e os mediadores solúveis com AUC >0,9 (fundo cinza) pré-selecionados para análise posterior. **(B)** A variação relativa (fold change) em relação à linha de base (D1-6/D0) foi empregada para classificar subgrupos de pacientes com COVID-19 de acordo com o desfecho da doença, denominados: Ventilação Não Mecânica vs. Ventilação Mecânica (nMV, círculo azul claro, n=71; MV, X rosa, n=11) e Alta vs. Óbito (círculo verde, n=75; X preto, n=7). A variação foi calculada para cada mediador solúvel como a proporção dos níveis séricos observados nos dias 1 a 6 na admissão, dividida pelos valores relatados na admissão (D0). Mediadores solúveis com AUC > 0,7 (fundo cinza) foram pré-selecionados para análise posterior.

Com o objetivo de explorar de forma mais aprofundada o desempenho dos mediadores séricos solúveis previamente selecionados (PDGF, IFN- $\gamma$  e IL-6) na classificação de pacientes com COVID-19, foram conduzidas análises de distribuição por

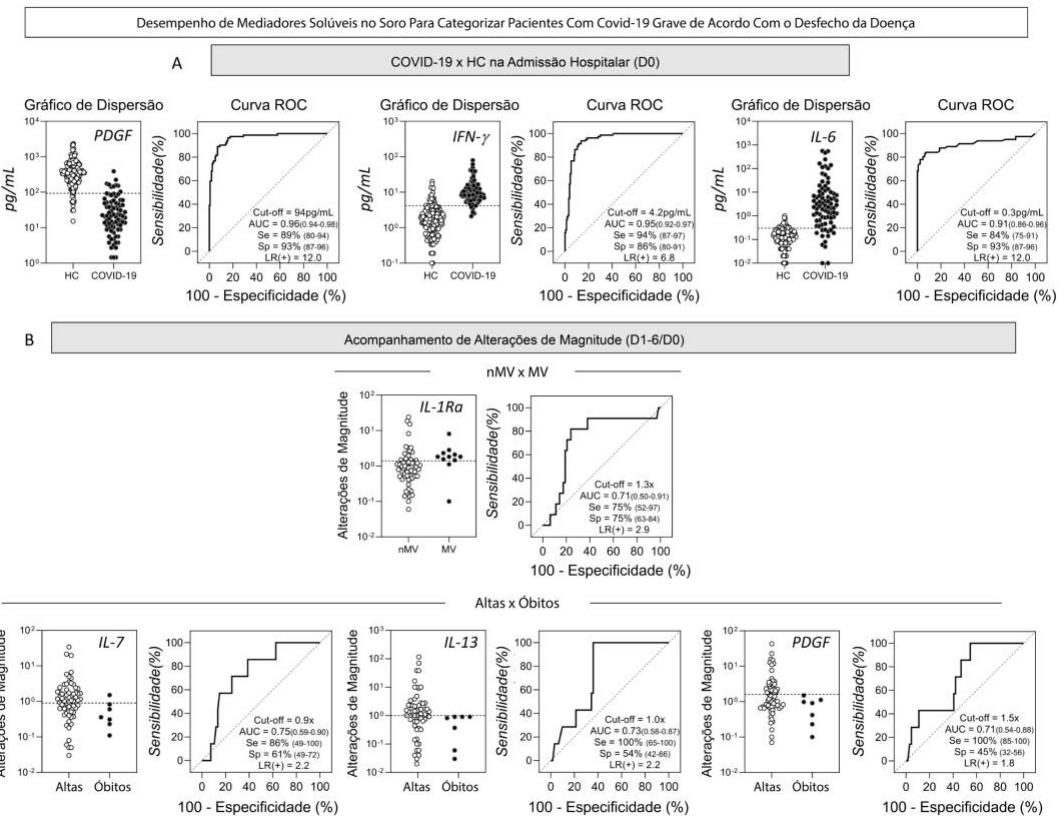
diagramas de dispersão, bem como curvas ROC (Figura 16). A distribuição por diagrama de dispersão dos valores individuais mostrou que níveis reduzidos de PDGF (ponto de corte = 94 pg/mL; Se = 89%; Sp = 93%) e níveis aumentados de IFN- $\gamma$  (ponto de corte = 4,2 pg/mL; Se = 94%; Sp = 86%) e IL-6 (ponto de corte = 0,3 pg/mL; Se = 84%; Sp = 93%) na admissão hospitalar (D0) foram capazes de diferenciar corretamente os pacientes com COVID-19 dos pacientes saudáveis do grupo controle (Figura 16). Uma descrição detalhada dos índices de desempenho dos mediadores séricos solúveis admissão hospitalar (D0) é apresentada na Tabela 4.

A variação nos níveis de mediadores séricos solúveis ao longo do tempo, calculada pela razão D1–6/D0, e seu desempenho na classificação de subgrupos de pacientes com COVID-19 segundo os desfechos clínicos, estão apresentados na Figura 16B.

Os dados demonstraram que a IL-1Ra apresentou desempenho discriminatório relevante para diferenciar pacientes nMV de MV (AUC = 0,71). Adicionalmente, IL-7, IL-13 e PDGF exibiram melhor desempenho na distinção entre os subgrupos Alta e Óbito, com valores de AUC de 0,75, 0,73 e 0,71, respectivamente. Esses mediadores foram, portanto, pré-selecionados para análises subsequentes (Figura 16B).

A análise da distribuição dos valores individuais em gráficos de dispersão revelou que o aumento nos níveis de IL-1Ra (ponto de corte = 1,3x; sensibilidade = 75%; especificidade = 75%) foi capaz de distinguir corretamente pacientes MV de nMV. Por outro lado, reduções nos níveis de IL-7 (ponto de corte = 0,9x; sensibilidade = 86%; especificidade = 61%), IL-13 (ponto de corte = 1,0x; sensibilidade = 100%; especificidade = 54%) e PDGF (ponto de corte = 1,3x; sensibilidade = 100%; especificidade = 45%) foram associadas ao desfecho clínico de óbito (Figura 16B).

Detalhamentos adicionais dos índices de desempenho das variações nos níveis dos mediadores séricos ao longo do tempo (D1–6/D0) encontram-se apresentados na Tabela 5.



**Figura 16.** Desempenho de mediadores séricos solúveis para classificar pacientes com COVID-19 grave de acordo com o desfecho da doença. O desempenho de mediadores séricos solúveis previamente selecionados na classificação de pacientes com COVID-19 grave foi analisado em detalhes, utilizando índices adicionais com o objetivo de reforçar o uso de parâmetros imunológicos putativos como ferramentas complementares para diagnóstico e prognóstico. A distribuição por gráfico de dispersão dos valores individuais e a análise da curva ROC (Receiver Operating Characteristic) foram construídas para cada mediador solúvel e os índices de desempenho (área sob a curva ROC - AUC, Sensibilidade-Se, Especificidade-Sp e Razão de verossimilhança - LR) são fornecidos na figura.

**(A)** A concentração sérica de PDGF, IFN- $\gamma$  e IL-6 (pg/mL) quantificada na admissão (D0) apresentou melhor desempenho para classificar pacientes com COVID-19 (círculos pretos, n=82) dos Controles Saudáveis pré-pandêmicos não infectados (HC, círculo branco, n=164). Os pontos de corte específicos foram definidos para cada mediador solúvel selecionado da seguinte forma: PDGF (94pg/mL); IFN- $\gamma$  (4,2pg/mL) e IL-6 (0,3pg/mL).

**(B)** A razão (D1-6/D0) de IL-1Ra apresentou maior desempenho para classificar Ventilação Não Mecânica (nMV, círculo branco, n=71) de Ventilação Mecânica (MV, círculo preto, n=11). IL-7, IL-13 e PDGF apresentaram melhor desempenho para classificar Alta (círculo branco, n=75) de Óbito (círculo preto, n=7). Os pontos de corte específicos foram definidos para a razão (D1-6/D0) de cada mediador solúvel selecionado da seguinte forma: IL-1Ra (1,3x); IL-7 (0,9x) e IL-13 (1,0x) e PDGF (1,5x).

Tabela 4. Índices de desempenho dos mediadores séricos solúveis medidos na admissão (D0) para classificar pacientes com COVID-19 grave de acordo com o desfecho da doença

COVID-19 x HC					nMV x MV					Altas x Óbitos					
Parâmetros	Ponto de corte	AU C	S e	Sp	Parâmetros	Ponto de corte	AU C	S e	Sp	Parâmetros	Ponto de corte	AU C	S e	Sp	
<b>PDGF</b>	<b>93.7</b>	<b>0.96</b>	<b>89</b>	<b>93</b>	CXCL10	993.1	0.65	82	46	CCL11	1.6	0.65	88	43	
<b>IFN-γ</b>	<b>4.2</b>	<b>0.95</b>	<b>94</b>	<b>86</b>	CCL11	1.6	0.61	87	36	IL-12	0.4	0.64	39	86	
<b>IL-6</b>	<b>0.3</b>	<b>0.91</b>	<b>84</b>	<b>93</b>	IL-6	2.4	0.62	52	82	CXCL10	1288.3	0.64	89	43	
IL-7	4.5	0.88	79	84	IL-15	90.4	0.61	73	60	IL-10	1.3	0.6	77	57	
CXCL10	129.7	0.86	78	95	CCL2	3.4	0.61	23	0	10	IL-6	115.2	0.57	93	29
IL-10	2.3	0.82	72	88	IL-10	1.3	0.59	76	46	IFN-γ	16.7	0.57	84	43	
IL-4	0.6	0.82	68	93	GM-CSF	0.4	0.58	45	73	IL-1Ra	78.0	0.56	58	71	
IL-13	0.6	0.81	74	82	IFN-γ	8.1	0.58	38	82	GM-CSF	0.3	0.56	51	71	
IL-1β	0.1	0.79	99	42	G-CSF	16.0	0.58	71	60	IL-9	13.0	0.55	73	57	
CCL11	13.0	0.79	56	91	IL-12	0.4	0.57	37	82	CCL2	3.4	0.55	22	10	
GM-CSF	0.7	0.74	68	100	FGF-basic	2.9	0.57	45	82	IL-15	90.4	0.55	70	50	
CXCL8	4.0	0.73	63	79	IL-1β	0.2	0.56	49	73	VEGF	12.7	0.54	65	57	
IL-15	101.4	0.72	64	84	IL-4	0.2	0.56	58	64	TNF-α	1.6	0.54	72	57	
CCL5	699.8	0.7	65	79	IL-2	0.8	0.56	55	64	IL-4	0.2	0.54	60	71	
IL-17	1.7	0.7	52	90	CCL4	18.2	0.55	51	73	CXCL8	1.9	0.53	25	10	
CCL3	4.1	0.7	53	94	TNF-α	3.5	0.55	44	73	FGF-basic	2.7	0.53	53	71	
IL-5	2.4	0.68	61	82	IL-5	2.2	0.55	52	73	IL-1β	0.2	0.53	51	71	
CCL4	23.2	0.68	45	96	IL-9	9.3	0.54	63	60	PDGF	8.1	0.53	21	10	
G-CSF	92.9	0.66	49	92	CCL3	2.5	0.54	61	64	IL-7	1.0	0.52	67	57	
IL-12	0.3	0.64	99	44	IL-7	1.3	0.54	59	64	CCL5	835.9	0.52	44	71	
IL-9	7.2	0.64	56	74	IL-17	3.0	0.52	35	82	CCL4	18.2	0.52	51	71	
VEGF	19.8	0.61	68	57	PDGF	51.5	0.52	27	91	IL-2	4.6	0.51	88	29	
IL-2	3.4	0.54	26	93	IL-1Ra	81.2	0.52	54	64	IL-17	1.6	0.51	49	71	
IL-1Ra	166.8	0.52	32	87	CCL5	863.3	0.52	58	64	IL-13	2.1	0.51	96	29	

FGF-basic	8.3	0.52	18	99	VEGF	21.3	0.51	30	82	G-CSF	674.9	0.51	98	33
TNF- $\alpha$	10.7	0.51	27	97	IL-13	1.1	0.51	88	27	CCL3	268.1	0.50	96	29
CCL2	45.6	0.50	81	4	CXCL8	1.9	0.50	25	10 0	IL-5	2.2	0.50	52	71

HC = Controles de Saúde; nMV = Ventilação Não-Invasiva; MV = Ventilação Mecânica; AUC = Área Sob a Curva de Característica de Operador do Receptor (ROC); Se = Sensibilidade; Sp = Especificidade

**Tabela 5.** Índices de desempenho das alterações nos níveis de mediadores séricos solúveis ao longo da linha do tempo (D1-6/D0)

nMV vs MV									Altas x Óbitos			
Parâmetros	Ponto de corte	AUC	Se	Sp	Parâmetros	Ponto de corte	AUC	Se	Sp			
<b>IL-1Ra</b>	<b>1.3</b>	<b>0.71</b>	<b>75</b>	<b>75</b>	<b>IL-7</b>	<b>0.8</b>	<b>0.75</b>	<b>61</b>	<b>86</b>			
CCL2	0.5	0.66	42	100	<b>IL-13</b>	<b>1.0</b>	<b>0.73</b>	<b>54</b>	<b>100</b>			
CCL11	0.9	0.64	49	86	<b>PDGF</b>	<b>1.5</b>	<b>0.71</b>	<b>45</b>	<b>100</b>			
CCL4	0.6	0.63	42	100	IL-12	1.0	0.64	52	86			
IL-12	1.3	0.61	34	89	IL-17	1.6	0.64	39	100			
IFN- $\gamma$	0.9	0.59	42	89	G-CSF	1.6	0.64	53	100			
IL-7	1.5	0.59	37	89	IL-2	1.1	0.63	52	100			
IL-13	0.3	0.58	83	44	CCL4	2.1	0.62	36	100			
TNF- $\alpha$	0.6	0.57	73	56	CXCL8	2.8	0.61	36	100			
IL-5	1.4	0.56	37	89	CCL2	1.8	0.61	77	67			
PDGF	0.7	0.55	30	100	IL-5	1.1	0.61	51	86			
CXCL10	0.2	0.55	76	44	CCL3	3.3	0.6	34	100			
IL-2	1.1	0.54	51	67	TNF- $\alpha$	1.7	0.6	35	100			
GM-CSF	1.6	0.53	31	89	FGF-basic	1.3	0.59	35	100			
IL-10	0.8	0.53	76	44	IL-1b	1.3	0.58	41	100			
FGF-basic	1.2	0.52	40	78	IL-15	1.4	0.57	34	100			
CCL3	1.2	0.52	49	67	IL-4	1.6	0.57	29	100			
IL-15	1.2	0.52	36	86	IL-9	0.9	0.57	69	67			
G-CSF	1.7	0.52	49	75	CCL11	0.4	0.56	75	50			
IL-6	1.6	0.51	37	78	GM-CSF	1.6	0.56	33	100			
VEGF	1.1	0.51	48	78	CCL5	1.2	0.53	66	71			
IL-9	1.4	0.51	68	57	IL-6	0.4	0.53	64	57			
CCL5	1.0	0.51	59	67	VEGF	1.0	0.53	41	86			
IL-17	1.7	0.51	33	89	CXCL10	3.6	0.52	93	29			
IL-1b	1.5	0.51	37	89	IL-1Ra	1.2	0.51	67	57			
IL-4	1.6	0.50	28	89	IL-10	1.3	0.51	80	43			
CXCL8	3.0	0.50	34	89	IFN-g	0.9	0.50	45	71			

HC = Controles de Saúde; nMV = Ventilação Não-Invasiva; MV = Ventilação Mecânica; AUC = Área Sob a Curva de Característica de Operador do Receptor (ROC); Se = Sensibilidade; Sp = Especificidade.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Descrição da Amostra Populacional

Este estudo foi delineado como uma investigação exploratória, utilizando distintos modelos de análise descritiva com o objetivo de caracterizar o perfil panorâmico de mediadores séricos solúveis em pacientes com COVID-19 grave, de acordo com os respectivos desfechos clínicos.

O trabalho desenvolveu-se no auge da primeira onda da pandemia quando havia incertezas sobre a evolução clínica da doença e escassez de informações epidemiológicas consolidadas. Nesse período crítico, conseguimos estruturar rapidamente o projeto, iniciar a coleta de dados e implementar a análise dos mediadores séricos, mesmo em meio às enormes dificuldades logísticas e assistenciais que os hospitais enfrentavam.

Em nossa amostra, o sexo masculino foi o mais prevalente. Embora estudos meta-analíticos sugiram que não há diferença significativa entre os gêneros em termos de contrair a infecção por COVID-19 (Binns et al., 2022), outros estudos indicam que o sexo masculino está associado a maior mortalidade, admissão em UTI e outros desfechos graves (Chaturvedi et al., 2022; Peckham et al., 2020). A predominância do sexo masculino em nossa amostra, composta por pacientes com quadros graves, corrobora os achados previamente descritos na literatura. No entanto, vale destacar que, nesse estudo, não foi realizada uma estratificação das amostras com base no desfecho clínico ou no gênero dos pacientes.

A idade mediana dos nossos pacientes foi consistente com as descrições epidemiológicas da COVID-19, que geralmente reportam uma idade média em torno de 50 anos, semelhante à encontrada em nossa amostra (Hu et al., 2021).

Entre os fatores de risco classicamente relacionados a COVID-19 grave, encontram-se a hipertensão, diabetes mellitus, doença arterial

coronariana, e obesidade (Gupta; Marzook; Ahmad, 2022; Ng et al., 2021). Nossa amostra de pacientes graves era composta por 41% de hipertensos, em conformidade com as médias descritas. No entanto, o nosso estudo não contemplou uma caracterização detalhada das amostras com base nos desfechos clínicos ou nas comorbidades associadas.

## 6.2 Mediadores Séricos Solúveis

Nossos resultados mostraram que o grupo com COVID-19 grave apresentou níveis elevados de mediadores solúveis, especialmente quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, em comparação ao grupo controle saudável. Esses achados são consistentes com estudos prévios que demonstraram que a COVID-19 induz uma liberação maciça de mediadores imunológicos, incluindo quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (Ghazavi et al., 2021; Guo et al., 2021; Ling et al., 2021).

A produção excessiva de mediadores solúveis pró-inflamatórios é um aspecto chave da pandemia de SARS-CoV-2 e um fator contribuinte importante para a mortalidade em um subgrupo de pacientes com COVID-19 (Channappanavar; Perlman, 2017; Olbei et al., 2021). Alguns estudos sugerem que certos mediadores solúveis podem ser preditivos da progressão clínica da doença, tornando o monitoramento desses marcadores biológicos útil para identificar pacientes com risco de complicações e óbito (Lucas et al., 2020c). Nossos resultados demonstraram padrões distintos de mediadores séricos solúveis associados a diferentes desfechos da doença. Pacientes que evoluíram para não-necessidade de ventilação mecânica (nMV) e alta apresentaram níveis mais elevados de CCL3 e G-CSF, enquanto aqueles que progrediram para ventilação mecânica (MV) e óbito apresentaram níveis mais elevados de CXCL10 e IL-6, além de níveis mais baixos de IL-10.

Estudos prévios sugeriram que monócitos e subpopulações de macrófagos pulmonares desempenham um papel relevante, orquestrando a resposta inflamatória em pacientes com COVID-19. Os macrófagos são

células fundamentais do sistema imunológico inato, desempenhando papéis essenciais na detecção e fagocitose de agentes infecciosos e na resolução de distúrbios inflamatórios. Os macrófagos são importantes células apresentadoras de抗ígenos para as células T, evento inicial da inflamação que promove a liberação de mediadores solúveis chave, incluindo quimiocinas e moléculas pró-inflamatórias, que possuem funções antimicrobianas. Entretanto, uma tempestade descontrolada de mediadores solúveis pode favorecer o estabelecimento de uma resposta inflamatória exacerbada contribuindo para o dano pulmonar e vascular extenso (MA et al., 2019; MERAD; MARTIN, 2020; SEFIK et al., 2022; ZHANG et al., 2021). Desta forma, subpopulações de macrófagos podem estar relacionados com diferentes desfechos clínicos.

Estudos anteriores mostraram que a administração de G-CSF aumenta o número de linfócitos e células T, melhorando os sintomas clínicos em pacientes graves de COVID-19 (Chen et al., 2020). Considerando o papel do G-CSF como um potente fator estimulante da hematopoiese (Mu et al., 2021), níveis precoces mais altos de G-CSF em pacientes com COVID-19 podem ter um efeito protetor, prevenindo a linfopenia associada a casos graves e fatais da doença (Cao, 2020; Melo et al., 2021; Moutchia et al., 2020; Panda et al., 2021; Zheng et al., 2020a). No entanto, a literatura apresenta resultados conflitantes sobre o papel do G-CSF no resultado da COVID-19, possivelmente devido à variação no momento da medição do G-CSF. Em contraste, a associação de G-CSF com um prognóstico favorável, observada em nossos pacientes, diverge de estudos prévios que sugeriram que níveis aumentados de G-CSF estavam associados à gravidade da COVID-19 (Guo et al., 2021). Um ponto importante a ser considerado é a cinética da resposta imune ao longo do processo infeccioso, geralmente avaliada como tempo pós início de sintomas ou pós admissão hospitalar. Portanto, análises comparativas entre estudos devem ser feitas com cautela. Neste sentido, visando talvez validar os achados relacionados ao papel do G-CSF são necessários estudos adicionais com uma ampla amostragem populacional para

esclarecer a relação entre os níveis de G-CSF e progressão da doença em pacientes com COVID-19.

Na avaliação longitudinal, observamos que os níveis de CCL3 tanto na admissão hospitalar quanto seu aumento progressivo estão associados a um melhor desfecho clínico, incluindo redução da necessidade de ventilação mecânica e alta hospitalar. Embora a literatura associe o aumento de CCL3 à tempestade de citocinas em casos graves de COVID-19 (Hamza et al., 2022; Ramasamy; Subbian, 2021a), nossos achados sugerem que o aumento de CCL3 pode estar relacionado a um melhor prognóstico em pacientes graves. Esses resultados inéditos na literatura podem contribuir para uma melhor compreensão da dinâmica das citocinas na COVID-19 grave e têm implicações importantes para o manejo clínico desses pacientes.

Estudos recentes utilizando sequenciamento de RNA de célula única em pacientes com COVID-19 identificaram que subconjuntos de macrófagos produtores de CCL2 e CXCL10 são abundantes no lavado broncoalveolar de pacientes com COVID-19 grave e são potenciais mediadores da doença grave (Liao et al., 2020). Embora nossa investigação não tenha analisado componentes celulares, nossos achados sugerem que a ativação de monócitos/macrófagos durante a COVID-19 pode levar a níveis aumentados de CXCL10, contribuindo para desfechos clínicos desfavoráveis, como ventilação mecânica e óbito. Isso destaca a importância de entender melhor a imunidade orquestrada por quimiocinas. Nossos resultados são consistentes com a literatura existente em muitos aspectos, mas também apresentam algumas discrepâncias. Notavelmente, o aumento acentuado de CXCL10 e IL-6 em nossos pacientes corrobora estudos anteriores que associam essas citocinas à gravidade e progressão da COVID-19 (Coomes; Haghbayan, 2020; Darif et al., 2021; Ghazavi et al., 2021; Guo et al., 2021; Ling et al., 2021; Mojtabavi; Saghazadeh; Rezaei, 2020; Pons et al., 2021; Udomsinprasert et al., 2021).

Em nosso estudo, os níveis séricos de IL-10 estavam reduzidos nos pacientes com COVID-19 em comparação aos controles, e atingiram valores ainda mais baixos entre aqueles que evoluíram para óbito. Esses achados divergem de grandes estudos recentes, como os de Margiotta et al. (2025) e Deng et al. (2024), que reportaram aumento de IL-10 em formas graves da doença, interpretando essa citocina como parte da resposta anti-inflamatória compensatória e, em alguns contextos, até como fator protetor associado a variantes genéticas (Deng et al., 2024; Margiotta et al., 2025). Essa discrepância pode refletir diferentes momentos da evolução clínica captados pelas coletas — já que IL-10 pode apresentar elevação precoce, mas queda acentuada em fases críticas de falência imunológica. Além disso, fatores como heterogeneidade da amostra (idade, comorbidades, perfil genético) e as características específicas do nosso desenho de estudo podem ter influenciado os resultados. Portanto, nossos dados reforçam a noção de que a cinética de IL-10 é dinâmica e que sua interpretação deve considerar tanto o estágio da doença quanto o contexto clínico e populacional avaliado.

Outro mediador sérico solúvel que apresentou resultados contraditórios em relação a estudos prévios foi o VEGF (Sahebnasagh et al., 2021), cujos níveis estavam diminuídos em pacientes com COVID-19, na admissão hospitalar, em comparação com controles saudáveis. Altos níveis de VEGF foram associados a maior gravidade de doença como manifestações intestinais, SDRA e óbito (Sahebnasagh et al., 2021; Zeng et al., 2022). Estudos em modelo animal que simulam a inflamação intestinal após estimulação com a proteína spike do SARS-CoV-2 mostraram que o VEGF é produzido em excesso no duodeno antes de sua elevação na circulação (ZENG et al., 2022). Isso sugere que diferenças cinéticas podem ocorrer durante a disseminação local e sistêmica do VEGF. Portanto, a diferença cinética inicial e tardia do VEGF pode ser uma explicação plausível para as discrepâncias observadas entre os estudos clínicos.

Para avaliar a utilidade e precisão dos marcadores séricos solúveis como modelo de classificação e teste diagnóstico, realizamos uma análise de curva ROC. Os resultados mostraram que as concentrações séricas de PDGF, IFN- $\gamma$  e IL-6 medidas na admissão hospitalar (DO) apresentaram uma elevada precisão global (AUC > 0,9), permitindo distinguir pacientes com COVID-19 de pacientes saudáveis (HC) com alta precisão.

O interferon (IFN) desempenha um papel central na resposta imunológica à COVID-19, embora de forma dinâmica e multifásica. Evidências recentes mostram que a produção adequada e precoce de IFNs do tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) é essencial para conter a replicação viral, enquanto atrasos ou bloqueios dessa via estão associados à evolução grave (Yang, 2025). Por outro lado, a persistência ou exacerbação da sinalização de IFNs pode contribuir para o estado de inflamação desregulada característico da fase crítica da doença. Estudos longitudinais amplos, como o de Ghaffarpour et al. (2025), confirmam que níveis elevados de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  estão associados a maior gravidade, enquanto o IFN- $\gamma$  tende a se elevar nas fases mais tardias, acompanhando a hiperinflamação (Ghaffarpour et al., 2025). Esses dados reforçam que o IFN não deve ser interpretado como marcador estático, mas sim como componente central e dinâmico da resposta antiviral inicial e, em contextos distintos, da resposta inflamatória desregulada em fases críticas da COVID-19.

Em nossa análise, os níveis séricos elevados de IFN- $\gamma$  mostraram boa acurácia para distinguir pacientes com COVID-19 grave em relação aos controles saudáveis (HC). No entanto, esse mediador não apresentou acurácia satisfatória para predizer desfechos clínicos desfavoráveis, como necessidade de ventilação mecânica ou óbito. Interessantemente, IL-6 exibiu padrão semelhante, também se mostrando útil para discriminar casos graves de controles, mas com baixa performance prognóstica. Esses achados sugerem que tanto IFN- $\gamma$  quanto IL-6 representam componentes centrais da resposta imunológica ao SARS-CoV-2, sendo consistentemente elevados em diferentes estágios clínicos

da doença devido ao seu papel crucial no combate ao vírus. No entanto, reforçam-se como marcadores de gravidade mais do que como preditores de desfecho, o que está em consonância com a natureza dinâmica e multifásica da resposta imune descrita em estudos recentes.

A evidência obtida neste estudo sugere uma assinatura imune centrada em macrófagos, caracterizada pela expressão concomitante de IL-6 e pela ativação sustentada via IFN- $\gamma$ , represente um eixo crítico da resposta imune desregulada em pacientes com COVID-19 grave. O IFN- $\gamma$ , ao ativar macrófagos em um fenótipo pró-inflamatório, potencializa a produção de IL-6, contribuindo para a manutenção de um ambiente hiperinflamatório. Essa assinatura pode explicar tanto a elevação consistente desses mediadores em pacientes graves, observada em nosso estudo, quanto sua limitada acurácia prognóstica, já que refletem um mecanismo central da resposta ao SARS-CoV-2 presente em diferentes estágios clínicos. Além disso, sugere-se que a persistência dessa ativação macrofágica, em vez de sua intensidade isolada, seja o fator determinante para a progressão da doença e para a falência de órgãos associada à tempestade de citocinas.

Além disso, o PDGF se destacou como um biomarcador solúvel capaz de distinguir não apenas pacientes com COVID-19 grave de indivíduos saudáveis, mas também de diferenciar desfechos clínicos ruins (ventilação mecânica e óbito) de bons desfechos (sem ventilação mecânica e alta). Nossos achados indicaram que os níveis de PDGF estavam significativamente diminuídos em pacientes com COVID-19 em comparação com controles saudáveis. Essa descoberta contrasta com estudos anteriores que relataram níveis mais elevados de PDGF-AA e PDGF-BB em pacientes com COVID-19 (Petrey et al., 2021). Esses achados aparentemente controversos podem refletir características clínicas intrínsecas da população estudada. Neste estudo, os autores observaram que a coorte apresentou contagens plaquetárias normais e que todos os pacientes com COVID-19 receberam tratamento trombopropilaxia padrão (Petrey et al., 2021). No entanto, é importante notar que nosso estudo mediu os níveis de PDGF em amostras de soro,

enquanto o estudo mencionado mediu os níveis de PDGF-AA e PDGF-BB em amostras de plasma. Os níveis de PDGF diferem significativamente em amostras de soro e plasma. Estudos prévios destacaram que fatores de crescimento podem se acumular nos grânulos α das plaquetas, o que pode explicar as diferenças observadas entre as medições no plasma e no soro (Italiano et al., 2008; Lakka Klement et al., 2009). Portanto, é recomendável utilizar fatores de transformação para normalizar os níveis de PDGF e permitir comparações precisas entre estudos. Infelizmente, não avaliamos os parâmetros hematológicos no momento da coleta das amostras biológicas, o que impediu a aplicação desses fatores de correção. Futuras investigações que considerem esses fatores são necessárias para normalizar os dados e torná-los comparáveis entre estudos distintos.

As curvas ROC também foram capazes de identificar outras moléculas promissoras, IL-1Ra, IL-13 e IL-7, para distinguir pacientes com COVID-19 que evoluíram para um prognóstico pior (MV e Óbito).

A IL-Ra é uma citocina inibitória precoce que suprime citocinas pró-inflamatórias e as respostas dos linfócitos T. A IL-1Ra é uma citocina que controla as respostas inflamatórias durante os estágios iniciais da ativação imune (Iwasaki; Pillai, 2014). A IL-1Ra liga-se competitivamente ao IL-1R (Arend et al., 1998) e é produzida por monócitos, macrófagos ou células dendríticas (Benedict, 2003). A IL-1Ra pode modular a produção de IL-1 e TNF- $\alpha$  (Oleksowicz; Dutcher, 1994) e IFN tipo I (Theofilopoulos et al., 2005). Um estudo longitudinal conduzido por Zhao e colaboradores (Zhao et al., 2020b) revelou que a produção precoce de mediadores inibitórios, como IL-1Ra, estava significativamente associada à forma grave da COVID-19, em contraste com pacientes com formas leves da doença. Nossos achados corroboram esses resultados, mostrando que a IL-1Ra não apenas apresentou níveis séricos aumentados na admissão hospitalar de pacientes com COVID-19 grave, mas também se destacou como um biomarcador capaz de identificar desfechos ruins da doença. Isso sugere que a produção precoce de IL-1Ra pode influenciar a indução de citocinas pró-inflamatórias e antivirais durante a fase inicial da infecção

por coronavírus. O papel do IL-1Ra na resposta imune parece ser dependente do contexto, variando de acordo com as concentrações séricas observadas em infecções graves e leves. Enquanto em casos leves, o aumento de IL-1Ra pode ser contrabalançado por respostas imunes adaptativas robustas ao vírus, em casos graves, níveis significativamente mais elevados de IL-1Ra são observados, sugerindo uma resposta imune hiperativa que pode contribuir para a transição de um ambiente imune controlado e protetor para um quadro de dano tecidual induzido por inflamação.

Na COVID-19, estudos prévios sugerem que a resposta imunológica é predominantemente pró inflamatória. De um modo geral, as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 não estão associadas à tempestade de mediadores inflamatórios descritas na COVID-19 (Hu; Huang; Yin, 2021; Tay et al., 2020; Zhu, 2015). No nosso estudo a diminuição exacerbada de IL-13 emergiu como um biomarcador importante associado ao risco de desfecho grave. A IL-13 desempenha um papel importante em processos imunológicos, incluindo o recrutamento de macrófagos e eosinófilos para o compartimento pulmonar, induzindo a produção de muco. Neste contexto, a IL-13 pode exercer um papel relevante na orquestração das respostas protetoras e imunopatológicas pulmonares, tornando-a um alvo de grande interesse na patologia da COVID-19 (Pathinayake; Awatade; Wark, 2023). Em geral, estudos relacionados ao papel da IL-13 na COVID-19 demonstram que a elevação de IL-13, promovendo o recrutamento de macrófagos e eosinófilos e favorecendo a produção de muco, representa um evento deletério, contribuindo para o estabelecimento de mecanismos do tipo reação alérgica associado a piores desfechos clínicos. Estudos prévios demonstraram que pacientes hospitalizados com COVID-19 que apresentaram altos níveis de IL-13 tiveram piores desfechos clínicos, com elevação sustentada por semanas após o início dos sintomas (Donlan et al., 2021; Sasson; Moreau; Petri, 2023). Nossos resultados demonstraram baixa produção de IL-13 em pacientes com COVID-19 independente do desfecho clínico. Entretanto a análise cinética demonstrou que a incapacidade de sustentar a produção de IL-13 esteve associada a óbito.

Esses resultados, associados a observação que pacientes que evoluíram para óbito apresentaram também níveis inferiores de IL-7 e PDGF, sugerem que a evolução clínica para óbito esteve associada a uma disfunção imunológica generalizada.

A IL-7 é produzida por diversas células, incluindo células hepáticas fetais, células estromais da medula óssea (MO), timo e outras células epiteliais, como queratinócitos e enterócitos (ALPOGAN; VANDENBRINK, 2005). Essa citocina desempenha um papel crucial na defesa do hospedeiro, regulando o desenvolvimento e a homeostase de células imunes, incluindo linfócitos T, linfócitos B e células natural killer (NK). Deficiências em IL-7 também podem causar prejuízos graves no desenvolvimento de células imunes, como mostram estudos recentes (Chen et al., 2021a). Vários estudos prévios relataram níveis aumentados de IL-7 em pacientes com COVID-19, e o aumento dessa citocina foi associado à gravidade da doença (Fernandes; Barata, 2023). Por outro lado, estudos realizados por Bordoni et al e Neidleman et al, relataram níveis de IL-7R $\alpha$ , o receptor de IL-7, menores em pacientes com COVID-19 grave em comparação com casos leves, bem como em não sobreviventes em comparação com pacientes que sobreviveram a doenças graves. Esses achados sugerem que a modulação da expressão dos receptores de IL-7 pode reduzir a sobrevivência celular, a sinalização de células B e a produção de anticorpos em pacientes com COVID-19 (Bordoni et al., 2021; Neidleman et al., 2021). Esses achados estão em consonância com nossos resultados, pois observamos níveis diminuídos de IL-7 em pacientes com COVID-19 na admissão hospitalar. Além disso, análises longitudinais adicionais pela curva ROC demonstraram que níveis mais baixos IL-7 estavam associados a evolução para óbito.

Considerando as discrepâncias entre nossos resultados e os previamente relatados na literatura, uma hipótese plausível é que essas diferenças sejam atribuíveis a características clínicas intrínsecas das populações de estudo, incluindo comorbidades, fatores do hospedeiro, como idade e sexo, e ao intervalo entre a infecção e a admissão hospitalar (Chen et al., 2021b; Cummings et al., 2020b; Garibaldi et al., 2021; Petrilli

et al., 2020; Wu; McGoogan, 2020). Além disso, a análise da resposta imune considerando o tempo cinético desde o início dos sintomas ou admissão hospitalar pode gerar achados distintos.

É bem estabelecido que a terapia anti-inflamatória utilizada em casos graves de COVID-19 pode influenciar os níveis de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento. No entanto, no presente estudo, todos os pacientes com COVID-19 receberam terapia combinada de corticosteroides, antibióticos e heparina, independentemente da necessidade de ventilação mecânica ou do desfecho da doença. Portanto, é improvável que as diferenças observadas nos níveis de mediadores solúveis séricos entre os subgrupos de COVID-19 sejam atribuíveis à terapia como uma variável de confusão. Ainda assim, deve-se considerar que a resposta individual ao tratamento pode variar, e essa heterogeneidade biológica pode ter contribuído para parte da variabilidade observada nos níveis dos mediadores.

Com o objetivo de caracterizar a tempestade pró-inflamatória em pacientes com COVID-19 grave, avaliamos a magnitude das alterações nos níveis de mediadores séricos solúveis ao longo do tempo em comparação com os valores medianos de controles saudáveis. Nossos resultados mostraram que IL-6 e CXCL10 apresentaram as maiores ordem de magnitude em pacientes com prognósticos desfavoráveis (ventilação mecânica e óbito), enquanto G-CSF e CCL3 aumentaram seletivamente em pacientes com bom prognóstico.

Apesar do número substancial de estudos envolvendo mediadores solúveis em pacientes com COVID-19, biomarcadores preditivos são extremamente escassos (Del Valle et al., 2020). Para tanto, realizamos uma análise detalhada dos mediadores solúveis séricos e construímos redes de sistemas integrativos. Uma rede integrativa desequilibrada com predominância do eixo pró-inflamatório na admissão hospitalar (D0) foi associada a um melhor prognóstico, enquanto a análise qualitativa revelou que pacientes com pior prognóstico (MV e Óbito) apresentaram maior número de correlações fortes envolvendo IFN- $\gamma$ , IL-1Ra e IL-9. Esse

perfil misto pró-inflamatório/regulatório pode sugerir que esses pacientes (MV e Óbito) já apresentavam maior duração da doença e tiveram internação hospitalar mais tardia em comparação aos pacientes que apresentaram desfechos mais favoráveis (MVn e Alta).

Em conjunto, esses achados reforçam a presença de uma tempestade pró-inflamatória característica em pacientes com COVID-19 grave, evidenciando redes integrativas desreguladas envolvendo IFN- $\gamma$ , IL-1Ra e IL-9 já no momento da admissão hospitalar. Ademais, elevações na ordem de magnitude e alterações na cinética de mediadores séricos solúveis foram associadas a desfechos clínicos desfavoráveis nesses pacientes.

Além disso, IL-1Ra, IL-13, PDGF e IL-7 também se destacaram como moléculas promissoras para discriminar pacientes com COVID-19 que evoluíram para desfechos clínicos desfavoráveis, como necessidade de ventilação mecânica ou óbito.

De modo geral, esses resultados evidenciam o potencial de um conjunto selecionado de mediadores sistêmicos — incluindo IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-1Ra, IL-13, PDGF e IL-7 — como biomarcadores laboratoriais, capazes de fornecer informações adicionais relevantes para o manejo clínico de pacientes com COVID-19 grave.

### **6.3 Limitações**

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. A amostra relativamente reduzida de pacientes ressalta a necessidade de validação adicional dos achados em coortes maiores. Em particular, o número limitado de pacientes que evoluíram para óbito, em comparação àqueles que receberam alta hospitalar, pode comprometer a robustez estatística das conclusões.

Ademais, o estudo foi conduzido durante a circulação predominante das variantes B.1.1.28 e B.1.1.33 do SARS-CoV-2; portanto, a resposta

imunológica observada pode não refletir o perfil associado a variantes emergentes subsequentes.

Entre as limitações do estudo, destaca-se a exclusão de pacientes com doença mental orgânica, funcional ou oligofrenia, medida necessária para garantir a qualidade das informações coletadas. Contudo, reconhece-se que a COVID-19 pode cursar com manifestações neurológicas e neuropsiquiátricas, e esse subgrupo de pacientes não foi representado em nossa amostra.

Outra limitação do estudo está relacionada à técnica utilizada para a dosagem dos mediadores séricos solúveis pela plataforma Luminex Bio-Plex ProTM. Embora esta técnica seja amplamente empregada em pesquisas translacionais, apresenta restrições de sensibilidade na detecção de mediadores em baixas concentrações. Técnicas baseadas em PBMCs (Células Mononucleares de Sangue Periférico) poderiam oferecer maior acurácia, e detalhamento na caracterização das respostas imunológicas.

A perda de seguimento também impediu a realização de uma análise longitudinal prospectiva completa de todos os pacientes incluídos no momento da admissão hospitalar.

Além disso, o delineamento observacional do estudo, aliado à realização de múltiplas comparações sem ajustes para potenciais variáveis de confusão, comorbidades e o uso concomitante de diferentes medicamentos, representa uma limitação metodológica relevante. Embora todos os pacientes tenham recebido tratamento padronizado de suporte, não foram aplicados ajustes estatísticos específicos para avaliar o impacto individual de cada fármaco na resposta inflamatória.

Portanto, estudos adicionais, com maior poder amostral e controle rigoroso de fatores como sexo, idade e comorbidades, são necessários para aprofundar a compreensão dos mecanismos imunológicos associados à gravidade da COVID-19.

#### **6.4 Perspectivas**

Os resultados deste estudo reforçam a importância da resposta imune sérica no contexto da COVID-19 e sugerem direções relevantes para investigações futuras. Uma possibilidade é a estratificação imunológica dos pacientes, de modo a identificar perfis específicos de resposta inflamatória associados à gravidade da doença. Além disso, a análise personalizada dos mediadores séricos solúveis pode contribuir para estratégias individualizadas de manejo clínico, considerando a heterogeneidade biológica entre os pacientes. Outro aspecto promissor é o monitoramento dinâmico da resposta imune ao longo da evolução clínica, o que poderia auxiliar na definição do momento ideal para intervenções terapêuticas. Em conjunto, essas abordagens têm o potencial de subsidiar a identificação de biomarcadores preditivos e o desenvolvimento de estratégias de medicina personalizada em doenças infecciosas graves, como a COVID-19.

## 7. CONCLUSÃO

Em conclusão, os principais achados deste estudo destacam que, além da resposta pró-inflamatória exacerbada, redes integrativas desequilibradas e alterações significativas ao longo do acompanhamento cinético de mediadores solúveis durante a internação hospitalar, especialmente CXCL10, IL-6, CCL3 e G-CSF, estão associadas a desfechos clínicos distintos, tanto favoráveis quanto desfavoráveis, em pacientes com COVID-19 grave.

Além disso, identificamos um conjunto de biomarcadores promissores, incluindo IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-1Ra, IL-13, PDGF e IL-7, que podem ser úteis no manejo clínico de pacientes com COVID-19 grave.

## DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE

A autora declara não haver qualquer conflito de interesses relacionado a este trabalho.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLAMUNITS, Vitaly; LEPSY, Christopher. Blocking TNF signaling may save lives in COVID-19 infection. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 3, p. 2303–2309, 25 mar. 2022.

ACHARYA, Dhiraj; LIU, GuanQun; GACK, Michaela U. Dysregulation of type I interferon responses in COVID-19. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 7, p. 397–398, 26 jul. 2020.

ACKERMANN, Maximilian *et al.* Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 2, p. 120–128, 9 jul. 2020.

ALPOGAN, O.; VANDENBRINK, M. IL-7 and IL-15: therapeutic cytokines for immunodeficiency. **Trends in Immunology**, v. 26, n. 1, p. 56–64, jan. 2005.

ANKA, Abubakar Umar *et al.* Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 93, n. 4, 3 abr. 2021a.

ANKA, Abubakar Umar *et al.* Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 93, n. 4, 3 abr. 2021b.

AREFINIA, Nasir *et al.* A comprehensive narrative review of the cutaneous manifestations associated with COVID-19. **International Wound Journal**, v. 20, n. 3, p. 871–879, 13 mar. 2023.

ARENDS, William P. *et al.* INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ANTAGONIST: Role in Biology. **Annual Review of Immunology**, v. 16, n. 1, p. 27–55, abr. 1998.

ARGENZIANO, Michael G. *et al.* Characterization and clinical course of 1000 patients with COVID-19 in New York: retrospective case series. , 22 abr. 2020.

ASADI-POOYA, Ali A.; SIMANI, Leila. Central nervous system manifestations of COVID-19: A systematic review. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 413, p. 116832, jun. 2020.

AZKUR, Ahmet Kursat *et al.* Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. **Allergy**, v. 75, n. 7, p. 1564–1581, 11 jul. 2020.

BANERJEE, Abhik K. *et al.* SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses. **Cell**, v. 183, n. 5, p. 1325- 1339.e21, nov. 2020.

BATLLE, Daniel *et al.* Acute Kidney Injury in COVID-19: Emerging Evidence of a Distinct Pathophysiology. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 31, n. 7, p. 1380–1383, jul. 2020.

BECHER, Burkhard; TUGUES, Sonia; GRETER, Melanie. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. **Immunity**, v. 45, n. 5, p. 963–973, nov. 2016.

BENEDICT, Chris A. Viruses and the TNF-related cytokines, an evolving battle. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, n. 3–4, p. 349–357, jun. 2003.

BIKDELI, Behnoor *et al.* Pharmacological Agents Targeting Thromboinflammation in COVID-19: Review and Implications for Future Research. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 120, n. 07, p. 1004–1024, 30 jul. 2020.

BINNS, Colin W. *et al.* COVID and Gender: A Narrative Review of the Asia-Pacific Region. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 1, p. 245, 23 dez. 2022.

BLANCO-MELO, Daniel *et al.* Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. **Cell**, v. 181, n. 5, p. 1036- 1045.e9, maio 2020.

BLUESTONE, Jeffrey A. *et al.* The functional plasticity of T cell subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 11, p. 811–816, 7 nov. 2009.

BORDONI, Veronica *et al.* The unbalanced p53/SIRT1 axis may impact lymphocyte homeostasis in COVID-19 patients. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 105, p. 49–53, abr. 2021.

BOSCH, Berend Jan *et al.* The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. **Journal of Virology**, v. 77, n. 16, p. 8801–8811, 15 ago. 2003.

BOSCH, Berend Jan *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 22, p. 8455–8460, 18 jun. 2004.

BROCKER, Chad *et al.* Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. **Human Genomics**, v. 5, n. 1, p. 30, 2010.

CAO, Xuetao. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 5, p. 269–270, 9 maio 2020.

CASTELLANOS, Milagros; SOMOZA, Álvaro. Emerging clinically tested detection methods for COVID-19. **The FEBS Journal**, v. 290, n. 12, p. 3089–3104, 15 jun. 2023.

CHAMS, Nour *et al.* COVID-19: A Multidisciplinary Review. **Frontiers in Public Health**, v. 8, 29 jul. 2020.

CHAN, Jasper Fuk-Woo *et al.* Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 221–236, 28 jan. 2020.

CHANNAPPANAVAR, Rudragouda; PERLMAN, Stanley. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. **Seminars in Immunopathology**, v. 39, n. 5, p. 529–539, 2 jul. 2017.

CHATURVEDI, Rahul *et al.* COVID-19 complications in males and females: recent developments. **Journal of Comparative Effectiveness Research**, v. 11, n. 9, p. 689–698, jun. 2022.

CHAU, Alice S. *et al.* The Longitudinal Immune Response to Coronavirus Disease 2019: Chasing the Cytokine Storm. **Arthritis & Rheumatology**, v. 73, n. 1, p. 23–35, jan. 2021.

CHEEMA, Marvi *et al.* Keratoconjunctivitis as the initial medical presentation of the novel coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 55, n. 4, p. e125–e129, ago. 2020.

CHEN, Deng *et al.* Interleukin-7 Biology and Its Effects on Immune Cells: Mediator of Generation, Differentiation, Survival, and Homeostasis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2 dez. 2021a.

CHEN, Guang-Bin *et al.* Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on lymphocyte subsets in patients with COVID-19. **Infectious Diseases**, v. 52, n. 10, p. 759–761, 2 out. 2020.

CHEN, Yiyin *et al.* Aging in COVID-19: Vulnerability, immunity and intervention. **Ageing Research Reviews**, v. 65, p. 101205, jan. 2021b.

CHEN, Yu; LIU, Qianyun; GUO, Deyin. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 418–423, 7 abr. 2020.

CHOI, Hee Sun *et al.* Review of COVID-19 Therapeutics by Mechanism: From Discovery to Approval. **Journal of Korean Medical Science**, v. 39, n. 14, 2024.

CHOW, Nancy *et al.* Preliminary Estimates of the Prevalence of Selected Underlying Health Conditions Among Patients with Coronavirus Disease 2019 — United States, February 12–March 28, 2020. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 69, n. 13, p. 382–386, 3 abr. 2020.

CHUNG, Yiu-Sing *et al.* Comprehensive Review of COVID-19: Epidemiology, Pathogenesis, Advancement in Diagnostic and Detection Techniques, and Post-Pandemic Treatment Strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 15, p. 8155, 26 jul. 2024.

CLERKIN, Kevin J. *et al.* COVID-19 and Cardiovascular Disease. **Circulation**, v. 141, n. 20, p. 1648–1655, 19 maio 2020.

CONG, Yingying; VERLHAC, Pauline; REGGIORI, Fulvio. The Interaction between Nidovirales and Autophagy Components. **Viruses**, v. 9, n. 7, p. 182, 11 jul. 2017.

COOMES, Eric A.; HAGHBAYAN, Hourmazd. Interleukin-6 in Covid-19: A systematic review and <scp>meta-analysis</scp>. **Reviews in Medical Virology**, v. 30, n. 6, p. 1–9, 26 nov. 2020.

COSTELA-RUIZ, Víctor J. *et al.* SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 54, p. 62–75, ago. 2020.

CROTTY, Shane. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. **Immunity**, v. 50, n. 5, p. 1132–1148, maio 2019.

CUI, Jie; LI, Fang; SHI, Zheng-Li. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, 10 mar. 2019a.

CUI, Jie; LI, Fang; SHI, Zheng-Li. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, 10 mar. 2019b.

CUMMINGS, Matthew J. *et al.* Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study. , 20 abr. 2020a.

CUMMINGS, Matthew J. *et al.* Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study. **The Lancet**, v. 395, n. 10239, p. 1763–1770, jun. 2020b.

DANARTI, Retno *et al.* Cutaneous Manifestation in COVID-19: A Lesson Over 2 Years Into the Pandemic. **Clinical Medicine & Research**, v. 21, n. 1, p. 36–45, 2 mar. 2023.

DARIF, Dounia *et al.* The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: What goes wrong? **Microbial Pathogenesis**, v. 153, p. 104799, abr. 2021.

DEL VALLE, Diane Marie *et al.* An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. **Nature Medicine**, v. 26, n. 10, p. 1636–1643, 24 out. 2020.

DENG, XueJun *et al.* Impacts of Inflammatory Cytokines Variants on Systemic Inflammatory Profile and COVID-19 Severity. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 14, n. 2, p. 363–378, 20 fev. 2024.

DINARELLO, Charles A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 8–27, 16 jan. 2018a.

DINARELLO, Charles A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 8–27, 16 jan. 2018b.

DONLAN, Alexandra N. *et al.* IL-13 is a driver of COVID-19 severity. **JCI Insight**, 29 jun. 2021.

DRIGGIN, Elissa *et al.* Cardiovascular Considerations for Patients, Health Care Workers, and Health Systems During the COVID-19 Pandemic. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 75, n. 18, p. 2352–2371, maio 2020.

ELLUL, Mark A. *et al.* Neurological associations of COVID-19. **The Lancet Neurology**, v. 19, n. 9, p. 767–783, set. 2020.

FAJGENBAUM, David C.; JUNE, Carl H. Cytokine Storm. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 23, p. 2255–2273, 3 dez. 2020a.

FAJGENBAUM, David C.; JUNE, Carl H. Cytokine Storm. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 23, p. 2255–2273, 3 dez. 2020b.

FARA, Antonella *et al.* Cytokine storm and COVID-19: a chronicle of pro-inflammatory cytokines. **Open Biology**, v. 10, n. 9, 23 set. 2020.

FEHR, Anthony R.; PERLMAN, Stanley. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. In: [S.l.: S.n.]. p. 1–23.

FELDMANN, Marc *et al.* Trials of anti-tumour necrosis factor therapy for COVID-19 are urgently needed. **The Lancet**, v. 395, n. 10234, p. 1407–1409, maio 2020.

FERNANDES, Marta B.; BARATA, João T. IL-7 and IL-7R in health and disease: An update through COVID times. **Advances in Biological Regulation**, v. 87, p. 100940, jan. 2023.

GARIBALDI, Brian T. *et al.* Patient Trajectories Among Persons Hospitalized for COVID-19. **Annals of Internal Medicine**, v. 174, n. 1, p. 33–41, jan. 2021.

GHAFFARPOUR, Sara *et al.* Cytokine profiles dynamics in COVID-19 patients: a longitudinal analysis of disease severity and outcomes. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 14209, 23 abr. 2025.

GHAZAVI, Ali *et al.* Cytokine profile and disease severity in patients with COVID-19. **Cytokine**, v. 137, p. 155323, jan. 2021.

GOLD, Doria M.; GALETTA, Steven L. Neuro-ophthalmologic complications of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Neuroscience Letters**, v. 742, p. 135531, jan. 2021.

GORDON, David E. *et al.* A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. **Nature**, v. 583, n. 7816, p. 459–468, 16 jul. 2020.

GOTTLIEB, Robert L. *et al.* Early Remdesivir to Prevent Progression to Severe Covid-19 in Outpatients. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 4, p. 305–315, 27 jan. 2022.

GRESSER, Ion. Biologic Effects of Interferons. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 95, n. 6, p. S66–S71, dez. 1990.

GRIFFITH, Jason W.; SOKOL, Caroline L.; LUSTER, Andrew D. Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 32, n. 1, p. 659–702, 21 mar. 2014.

GUO, Jing *et al.* Cytokine Signature Associated With Disease Severity in COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 20 ago. 2021.

GUO, Tao *et al.* Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **JAMA Cardiology**, v. 5, n. 7, p. 811, 1 jul. 2020.

GUO, Yi *et al.* Targeting TNF- $\alpha$  for COVID-19: Recent Advanced and Controversies. **Frontiers in Public Health**, v. 10, 11 fev. 2022.

GUPTA, Aakriti *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 7, p. 1017–1032, 10 jul. 2020.

GUPTA, Anamika; MARZOOK, Hezlin; AHMAD, Firdos. Comorbidities and clinical complications associated with SARS-CoV-2 infection: an overview. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 23, n. 2, p. 313–331, 1 abr. 2022.

GUSEV, Evgenii *et al.* SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1716, 2 fev. 2022.

HAMZA, Aljohara Mohmoud *et al.* Relation between macrophage inflammatory protein-1 and intercellular adhesion molecule-1 and computed tomography findings in critically-ill saudi covid-19 patients. **Journal of Infection and Public Health**, v. 15, n. 12, p. 1497–1502, dez. 2022.

HASOKSUZ, Mustafa *et al.* Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. **Virus Research**, v. 84, n. 1–2, p. 101–109, mar. 2002.

HASÖKSÜZ, Mustafa; KILIÇ, Selcuk; SARAÇ, Fahriye. Coronaviruses and SARS-COV-2. **TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES**, v. 50, n. SI-1, p. 549–556, 21 abr. 2020.

HENRY, Brandon Michael *et al.* Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 58, n. 7, p. 1021–1028, 25 jun. 2020.

HIRSCH, Jamie S. *et al.* Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19. **Kidney International**, v. 98, n. 1, p. 209–218, jul. 2020.

HOFFMANN, Markus *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.e8, abr. 2020.

HSU, Ren-Jun *et al.* The Role of Cytokines and Chemokines in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infections. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 7 abr. 2022.

HU, Ben *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141–154, 6 mar. 2021.

HU, Biying; HUANG, Shaoying; YIN, Lianghong. The cytokine storm and COVID-19. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 1, p. 250–256, 30 jan. 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, fev. 2020a.

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, fev. 2020b.

ISRAELOW, Benjamin *et al.* Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 12, 7 dez. 2020.

ITALIANO, Joseph E. *et al.* Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet  $\alpha$  granules and differentially released. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1227–1233, 1 fev. 2008.

IWASAKI, Akiko; PILLAI, Padmini S. Innate immunity to influenza virus infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 315–328, 25 maio 2014.

JAFARZADEH, Abdollah *et al.* Contribution of monocytes and macrophages to the local tissue inflammation and cytokine storm in COVID-19: Lessons from SARS and MERS, and potential therapeutic interventions. **Life Sciences**, v. 257, p. 118102, set. 2020.

JI, Wei *et al.* Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 433–440, 19 abr. 2020.

JIA, Fang *et al.* Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the mortality of hospitalized patients with severe and critical COVID-19 pneumonia. **Aging**, v. 13, n. 21, p. 23895–23912, 15 nov. 2021.

KAPLANSKI, Gilles. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 138–153, 16 jan. 2018.

KHANMOHAMMADI, Shaghayegh; REZAEI, Nima. Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 5, p. 2735–2739, 9 maio 2021.

KIRTIPAL, Nikhil; BHARADWAJ, Shiv; KANG, Sang Gu. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, p. 104502, nov. 2020.

KLEINEWIETFELD, Markus; HAFLER, David A. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 4, p. 305–312, nov. 2013.

KURIZKY, Patricia *et al.* Molecular and Cellular Biomarkers of COVID-19 Prognosis: Protocol for the Prospective Cohort TARGET Study. **JMIR Research Protocols**, v. 10, n. 3, p. e24211, 4 mar. 2021.

LAKKA KLEMENT, Giannoula *et al.* Platelets actively sequester angiogenesis regulators. **Blood**, v. 113, n. 12, p. 2835–2842, 19 mar. 2009.

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, 3 jul. 2020.

LEGRAND, Matthieu *et al.* Pathophysiology of COVID-19-associated acute kidney injury. **Nature Reviews Nephrology**, v. 17, n. 11, p. 751–764, 5 nov. 2021.

LI, Qun *et al.* Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 13, p. 1199–1207, 26 mar. 2020.

LIAO, Mingfeng *et al.* Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 6, p. 842–844, 12 jun. 2020.

LING, Lowell *et al.* Longitudinal Cytokine Profile in Patients With Mild to Critical COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 6 dez. 2021.

LIU, Mingli *et al.* CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, jul. 2011.

LIU, Shuwen *et al.* Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. **The Lancet**, v. 363, n. 9413, p. 938–947, mar. 2004.

LUCAS, Carolina *et al.* Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 463–469, 20 ago. 2020a.

LUCAS, Carolina *et al.* Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 463–469, 20 ago. 2020b.

LUCAS, Carolina *et al.* Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 463–469, 20 ago. 2020c.

MAIA, Renata *et al.* Diagnosis Methods for COVID-19: A Systematic Review. **Micromachines**, v. 13, n. 8, p. 1349, 19 ago. 2022.

MARGIOTTA, Riccardo Giuseppe *et al.* Investigating the relationship between the immune response and the severity of COVID-19: a large-cohort retrospective study. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 8 jan. 2025.

MEHTA, Puja *et al.* Therapeutic blockade of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in COVID-19-associated hyperinflammation: challenges and opportunities. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 8, p. 822–830, ago. 2020.

MELO, Ana Karla G. *et al.* Biomarkers of cytokine storm as red flags for severe and fatal COVID-19 cases: A living systematic review and meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 16, n. 6, p. e0253894, 29 jun. 2021.

MERAD, Miriam; MARTIN, Jerome C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 355–362, 17 jun. 2020.

MOJTABAHI, Helia; SAGHAZADEH, Amene; REZAEI, Nima. Interleukin-6 and severe COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **European Cytokine Network**, v. 31, n. 2, p. 44–49, jun. 2020.

MONTAZERSAHEB, Soheila *et al.* COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. **Virology Journal**, v. 19, n. 1, p. 92, 26 maio 2022.

MORASSI, Mauro *et al.* Stroke in patients with SARS-CoV-2 infection: case series. **Journal of Neurology**, v. 267, n. 8, p. 2185–2192, 20 ago. 2020.

MOUTCHIA, Jude *et al.* Clinical laboratory parameters associated with severe or critical novel coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 15, n. 10, p. e0239802, 1 out. 2020.

MU, Xiuying *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an immunotarget for sepsis and COVID-19. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 18, n. 8, p. 2057–2058, 19 ago. 2021.

NEIDLEMAN, Jason *et al.* Distinctive features of SARS-CoV-2-specific T cells predict recovery from severe COVID-19. , 28 jan. 2021.

NEUMAN, Benjamin W. *et al.* A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. **Journal of Structural Biology**, v. 174, n. 1, p. 11–22, abr. 2011.

NG, Wern Hann *et al.* Comorbidities in SARS-CoV-2 Patients: a Systematic Review and Meta-Analysis. **mBio**, v. 12, n. 1, 23 fev. 2021.

NGUYEN, Austin *et al.* Human Leukocyte Antigen Susceptibility Map for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. **Journal of Virology**, v. 94, n. 13, 16 jun. 2020.

OCHAN, RohanKumar *et al.* COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. **Le infezioni in medicina**, v. 29, n. 1, p. 20–36, 1 mar. 2021.

OLBEI, Marton *et al.* SARS-CoV-2 Causes a Different Cytokine Response Compared to Other Cytokine Storm-Causing Respiratory Viruses in Severely Ill Patients. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 1 mar. 2021.

OLEKSOWICZ, Leslie; DUTCHER, Janice P. A REVIEW OF THE NEW CYTOKINES. **American Journal of Therapeutics**, v. 1, n. 2, p. 107–115, ago. 1994.

ONG, Eugenia Ziying *et al.* A Dynamic Immune Response Shapes COVID-19 Progression. **Cell Host & Microbe**, v. 27, n. 6, p. 879- 882.e2, jun. 2020.

ORTEGA-PAZ, Luis *et al.* Coronavirus Disease 2019–Associated Thrombosis and Coagulopathy: Review of the Pathophysiological Characteristics and Implications for Antithrombotic Management. **Journal of the American Heart Association**, v. 10, n. 3, 2 fev. 2021.

OU, Xiuyuan *et al.* Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1620, 27 mar. 2020.

PACES, J. et al. COVID-19 and the Immune System. **Physiological Research**, p. 379–388, 30 jun. 2020.

PACHA, Omar; SALLMAN, Mary Alice; EVANS, Scott E. COVID-19: a case for inhibiting IL-17? **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 345–346, 1 jun. 2020.

PAN, Hongchao et al. Remdesivir and three other drugs for hospitalised patients with COVID-19: final results of the WHO Solidarity randomised trial and updated meta-analyses. **The Lancet**, v. 399, n. 10339, p. 1941–1953, maio 2022.

PANDA, Suchismita et al. Immuno-inflammatory predictors of disease severity in COVID-19: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v. 10, n. 3, p. 1102, 2021.

PATHINAYAKE, Prabuddha S.; AWATADE, Nikhil T.; WARK, Peter A. B. Type 2 Immunity and Its Impact on COVID-19 Infection in the Airways. **Viruses**, v. 15, n. 2, p. 402, 31 jan. 2023.

PECKHAM, Hannah et al. Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ITU admission. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 6317, 9 dez. 2020.

PETREY, Aaron C. et al. Cytokine release syndrome in COVID-19: Innate immune, vascular, and platelet pathogenic factors differ in severity of disease and sex. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 109, n. 1, p. 55–66, 1 jan. 2021.

PETRILLI, Christopher M. et al. Factors associated with hospital admission and critical illness among 5279 people with coronavirus disease 2019 in New York City: prospective cohort study. **BMJ**, p. m1966, 22 maio 2020.

PIMENTEL, Vitória et al. Guillain–Barré syndrome associated with COVID-19: A systematic review. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 28, p. 100578, mar. 2023.

PONS, Maria J. et al. Cytokine Profiles Associated With Worse Prognosis in a Hospitalized Peruvian COVID-19 Cohort. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 1 set. 2021.

POTERE, Nicola *et al.* NLRP3 inflammasome and interleukin-1 contributions to COVID-19-associated coagulopathy and immunothrombosis. **Cardiovascular Research**, v. 119, n. 11, p. 2046–2060, 5 set. 2023.

PRIMORAC, Dragan *et al.* Adaptive Immune Responses and Immunity to SARS-CoV-2. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 4 maio 2022.

QIN, Chuan *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, 28 jul. 2020.

RAMASAMY, Santhamani; SUBBIAN, Selvakumar. Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 3, 16 jun. 2021a.

RAMASAMY, Santhamani; SUBBIAN, Selvakumar. Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 4, 15 dez. 2021b.

RANJBAR, Mitra *et al.* Role of CCL2/CCR2 axis in the pathogenesis of COVID-19 and possible Treatments: All options on the Table. **International Immunopharmacology**, v. 113, p. 109325, dez. 2022.

ROJAS, José M. *et al.* Viral pathogen-induced mechanisms to antagonize mammalian interferon (IFN) signaling pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 4, p. 1423–1444, 21 fev. 2021.

SAHEBNASAGH, Adeleh *et al.* Anti-VEGF agents: As appealing targets in the setting of COVID-19 treatment in critically ill patients. **International Immunopharmacology**, v. 101, p. 108257, dez. 2021.

SASSON, Jennifer; MOREAU, G. Brett; PETRI, William A. The role of interleukin 13 and the type 2 immune pathway in COVID-19: A review. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 130, n. 6, p. 727–732, jun. 2023.

SATIŞ, Hasan *et al.* Prognostic value of interleukin-18 and its association with other inflammatory markers and disease severity in COVID-19. **Cytokine**, v. 137, p. 155302, jan. 2021.

Saúde MdS-SdVe. 52 Boletim Epidemiológico Especial - Doença pelo Coronavírus COVID-19 2021 04/03/2021. . [S.l.: S.n.].

SCHELLER, Jürgen; ROSE-JOHN, Stefan. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 195, n. 4, p. 173–183, 16 out. 2006.

SCHMIDT, Megan E.; VARGA, Steven M. The CD8 T Cell Response to Respiratory Virus Infections. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 9 abr. 2018.

SCHOEMAN, Dewald; FIELDING, Burtram C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. **Virology Journal**, v. 16, n. 1, p. 69, 27 dez. 2019.

SCHULTZE, Joachim L.; ASCHENBRENNER, Anna C. COVID-19 and the human innate immune system. **Cell**, v. 184, n. 7, p. 1671–1692, abr. 2021.

SEFIK, Esen *et al.* Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology. **Nature**, v. 606, n. 7914, p. 585–593, 16 jun. 2022.

SETTE, Alessandro; CROTTY, Shane. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. **Cell**, v. 184, n. 4, p. 861–880, fev. 2021.

SHAH, Adnan. Novel Coronavirus-Induced NLRP3 Inflammasome Activation: A Potential Drug Target in the Treatment of COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 19 maio 2020.

SHAH, Vibhuti Kumar *et al.* Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons From the Past. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 7 ago. 2020.

SINGH, Sanjiv; ANSHITA, D.; RAVICHANDIRAN, V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. **International Immunopharmacology**, v. 101, p. 107598, dez. 2021.

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

SU, Shuo *et al.* Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 490–502, jun. 2016a.

SU, Shuo *et al.* Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 490–502, jun. 2016b.

SUN, Xinjuan *et al.* Cytokine storm intervention in the early stages of COVID-19 pneumonia. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 53, p. 38–42, jun. 2020.

SWANSON, Karen V.; DENG, Meng; TING, Jenny P. Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 8, p. 477–489, 29 ago. 2019.

TAN, Steph H. *et al.* Saliva as a gold-standard sample for SARS-CoV-2 detection. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 9, n. 6, p. 562–564, jun. 2021.

TAVASOLIAN, Fataneh *et al.* HLA, Immune Response, and Susceptibility to COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 8 jan. 2021.

TAVERNA, Gianluigi *et al.* The kidney, COVID-19, and the chemokine network: an intriguing trio. **International Urology and Nephrology**, v. 53, n. 1, p. 97–104, 27 jan. 2021.

TAY, Matthew Zirui *et al.* The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363–374., 2020.

THEOFILOPOULOS, Argyrios N. *et al.* TYPE I INTERFERONS ( $\alpha/\beta$ ) IN IMMUNITY AND AUTOIMMUNITY. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 307–335, 1 abr. 2005.

TIAN, Sufang *et al.* Pulmonary Pathology of Early-Phase 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Pneumonia in Two Patients With Lung Cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 15, n. 5, p. 700–704, maio 2020.

TUFAN, Abdurrahman; AVANOĞLU GÜLER, Aslıhan; MATUCCI-CERINIC, Marco. COVID-19, immune system response, hyperinflammation and repurposing antirheumatic drugs. **TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES**, v. 50, n. SI-1, p. 620–632, 21 abr. 2020.

UDOMSINPRASERT, Wanvisa *et al.* Circulating Levels of Interleukin-6 and Interleukin-10, But Not Tumor Necrosis Factor-Alpha, as Potential Biomarkers of Severity and Mortality for COVID-19: Systematic Review with Meta-analysis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 41, n. 1, p. 11–22, 31 jan. 2021.

ULLAH, Waqas *et al.* COVID-19 Complicated by Acute Pulmonary Embolism and Right-Sided Heart Failure. **JACC: Case Reports**, v. 2, n. 9, p. 1379–1382, jul. 2020.

VADUGANATHAN, Muthiah *et al.* Renin–Angiotensin–Aldosterone System Inhibitors in Patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 17, p. 1653–1659, 23 abr. 2020.

VARGA, Zsuzsanna *et al.* Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. **The Lancet**, v. 395, n. 10234, p. 1417–1418, maio 2020.

VIJGEN, Leen *et al.* Identification of six new polymorphisms in the human coronavirus 229E receptor gene (aminopeptidase N/CD13). **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 217–222, jul. 2004.

WALLS, Alexandra C. *et al.* Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281- 292.e6, abr. 2020.

WAN, Suxin *et al.* Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP). , 12 fev. 2020a.

WAN, Yushun *et al.* Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. **Journal of Virology**, v. 94, n. 7, 17 mar. 2020b.

WANG, Dawei *et al.* Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, v. 323, n. 11, p. 1061, 17 mar. 2020a.

WANG, Jin *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**, v. 108, n. 1, p. 17–41, 1 jul. 2020b.

WANG, Kun *et al.* Differences of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Shedding Duration in Sputum and Nasopharyngeal Swab Specimens Among Adult Inpatients With Coronavirus Disease 2019. **Chest**, v. 158, n. 5, p. 1876–1884, nov. 2020c.

WESSELINGH, Robb; WESSELINGH, Steve L. An eye to the future: Acute and long-term neuro-ophthalmological and neurological complications of COVID-19. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, v. 51, n. 4, p. 370–379, 22 maio 2023.

WICHMANN, Dominic *et al.* Autopsy Findings and Venous Thromboembolism in Patients With COVID-19. **Annals of Internal Medicine**, v. 173, n. 4, p. 268–277, 18 ago. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it**. Disponível em: <[https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)>. Acesso em: 11 abr. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION DATA. **COVID-19 Cases, World**. Disponível em: <<https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?>>. Acesso em: 11 abr. 2025.

#### **World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard Data.**

WRAPP, Daniel *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**, v. 367, n. 6483, p. 1260–1263, 13 mar. 2020.

WU, Ping *et al.* Characteristics of Ocular Findings of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Hubei Province, China. **JAMA Ophthalmology**, v. 138, n. 5, p. 575, 1 maio 2020.

WU, Zunyou; MCGOOGAN, Jennifer M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. **JAMA**, v. 323, n. 13, p. 1239, 7 abr. 2020.

XIAO, Xiaodong *et al.* The SARS-CoV S glycoprotein: expression and functional characterization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, n. 4, p. 1159–1164, dez. 2003.

XU, Zhe *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 4, p. 420–422, abr. 2020.

YANG, Otto O. The immunopathogenesis of SARS-CoV-2 infection: Overview of lessons learned in the first 5 years. **The Journal of Immunology**, v. 214, n. 6, p. 1095–1104, 1 jun. 2025.

YANG, Yang *et al.* Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 146, n. 1, p. 119- 127.e4, jul. 2020.

YI, Ye *et al.* COVID-19: what has been learned and to be learned about the novel coronavirus disease. **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 10, p. 1753–1766, 2020.

YIN, Maureen *et al.* NLRP3, the inflammasome and COVID-19 infection. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 116, n. 7, p. 502–507, 28 jul. 2023.

ZENG, Fa-Min *et al.* SARS-CoV-2 spike spurs intestinal inflammation via VEGF production in enterocytes. **EMBO Molecular Medicine**, v. 14, n. 5, 9 maio 2022.

ZHANG, Fan *et al.* IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  drive a CXCL10+ CCL2+ macrophage phenotype expanded in severe COVID-19 lungs and inflammatory diseases with tissue inflammation. **Genome Medicine**, v. 13, n. 1, p. 64, 20 dez. 2021.

ZHANG, Haibo *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, 3 abr. 2020.

ZHAO, Hua *et al.* Guillain-Barré syndrome associated with SARS-CoV-2 infection: causality or coincidence? **The Lancet Neurology**, v. 19, n. 5, p. 383–384, maio 2020a.

ZHAO, Yan *et al.* Longitudinal COVID-19 profiling associates IL-1RA and IL-10 with disease severity and RANTES with mild disease. **JCI Insight**, v. 5, n. 13, 9 jul. 2020b.

ZHENG, Meijuan *et al.* Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 17, n. 5, p. 533–535, 2020a.

ZHENG, Meijuan *et al.* Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 17, n. 5, p. 533–535, 19 maio 2020b.

ZHOU, Fei *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, mar. 2020a.

ZHOU, Fei *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, mar. 2020b.

ZHOU, Peng *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 12 mar. 2020c.

ZHOU, Peng *et al.* Addendum: A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 588, n. 7836, p. E6–E6, 3 dez. 2020d.

ZHOU, Runhong *et al.* Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses. **Immunity**, v. 53, n. 4, p. 864- 877.e5, out. 2020e.

ZHU, Jinfang. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 14–24, set. 2015.

ZHU, Na *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020a.

ZHU, Na *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020b.

ZHU, Na *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020c.

ZOU, Xin *et al.* Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. **Frontiers of Medicine**, v. 14, n. 2, p. 185–192, 12 abr. 2020.

ZUO, Yu *et al.* Neutrophil extracellular traps in COVID-19. **JCI Insight**, 24 abr. 2020.

Tabela Suplementar 1 – Limite mínimo de detecção (LLOD) – Bio-Plex ProTM Human Cytokine  
27

	Mediador	LLOD (pg/mL)
<i>Quimiocinas</i>	CXCL8	0,5
	CCL11	0,9
	CCL3	1,2
	CCL4	0,7
	CCL2	1,0
	CCL5	1,0
	CXCL10	2,0
<i>Citocinas pró-inflamatórias</i>	IL-1 $\beta$	0,2
	IL-6	0,9
	TNF- $\alpha$	1,0
	IL-12	0,3
	IFN- $\gamma$	1,1
	IL-17	1,0
	IL-15	1,5
<i>Citocinas reguladoras</i>	IL-1Ra	5,0
	IL-4	0,2
	IL-5	0,7
	IL-9	0,9
	IL-10	1,0
	IL-13	0,3
	IL-2	0,8
<i>Fatores de crescimento</i>	IL-7	1,0
	FGF-basic	3,0
	PDGF	3,0
	VEGF	4,0
	G-CSF	1,0
	GM-CSF	0,3

Valores típicos informados nos catálogos técnicos da Bio-Rad (em pg/mL). Os limites podem variar conforme lote e condições do ensaio. Valores abaixo do limite mínimo de detecção (LLOD, Lower Limit of Detection) não devem ser interpretados como concentração real, mas sim como não detectável.