



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



NÍVIA NONATO SILVA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES IMUNOLÓGICOS INTERFERON TIPO
1 E RECEPTORES (IFNAR1 E IFNAR2), INTERLEUCINA 17A E RETROVÍRUS
ENDÓGENOS (HERVK-10 E HERVW-1) NO SANGUE PERIFÉRICO E
ASSOCIAÇÃO COM A GRAVIDADE NOS PACIENTES COM COVID-19**

Salvador

2023

2023

Avaliação da Expressão de Genes
Imunológicos Interferon Tipo 1 e Receptores
(IFNAR1 e IFNAR2), Interleucina 17 A e
Retrovírus Endógenos (HERVK-10 e
HERVW-1) no sangue periférico e
associação com a gravidade nos pacientes
com COVID-19.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
NÍVIA NONATO SILVA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

NÍVIA NONATO SILVA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES IMUNOLÓGICOS DO INTERFERON
TIPO 1 E RECEPTORES (IFNAR1 E IFNAR2), INTERLEUCINA 17A,
RETROVÍRUS ENDÓGENOS (HERVK-10 E HERVW-1) NO SANGUE PERIFÉRICO
E ASSOCIAÇÃO COM A GRAVIDADE NOS PACIENTES COM COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Vitor Fortuna
Coorientador: Prof^a. Dra. Silvia Lima Costa

Salvador

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586 Silva, Nívia Nonato

Avaliação da expressão de genes imunológicos do Interferon tipo 1 e receptores (IFNAR1 e IFNAR2), Interleucina 17A, retrovírus endógenos (HERVK-10 e HERVW-1) no sangue periférico e associação com a gravidade nos pacientes com Covid-19/Nívia Nonato Silva. – Salvador, 2023.

121 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Vitor Fortuna; Coorientadora: Prof^a. Dr^a Silvia Lima Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2023.

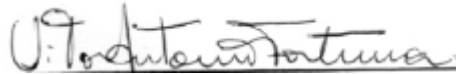
Inclui referências e anexos.

NÍVIA NONATO SILVA

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES IMUNOLÓGICOS INTERFERON TIPO 1 E RECEPTORES (IFNAR1 E IFNAR2), INTERLEUCINA 17A, RETROVÍRUS ENDÓGENOS (HERVK-10 E HERVW-1) NO SANGUE PERIFÉRICO E ASSOCIAÇÃO COM A GRAVIDADE NOS PACIENTES COM COVID-19

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIM), Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Salvador, 28 de Junho de 2023.



Prof. Dr. Vitor Fortuna (Orientador/UFBA)
(Presidente)



Prof (a). Dr(a) Elisângela Vitória Adorno
(Faculdade de Farmácia-UFBA)



Prof. Dr. Ryan dos Santos Costa
(Departamento de Biorregulação - UFBA)

“O Senhor é o meu pastor e nada me faltará”

Salmos 23:1

A Deus, que sem Ele, nada teria sentido.
In memoriam (todas as vítimas da doença COVID-19)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me sustentado até aqui.

Aos meus Orixás que fazem parte da minha ancestralidade e que possibilita conhecer a minha história, essência e força.

A minha mãe, Nilzete Nonato do Sacramento pelo alicerce criado, pelas oportunidades da criação do caminho que me fizeram chegar até aqui, pela presença e apoio inestimáveis.

A meu pai, Adilson Silva que com suas palavras de fé e consolo me incentivam a levantar com Deus e olhar em direção ao futuro.

A minha avó, Barbara Virgens do Sacramento pelo exemplo de força e superação nos momentos em que tudo parece um caos.

Ao meu Tio Nivaldo Sacramento, pelas palavras de afeto, pela amizade que parece ser de outras vidas, pelo carinho e sobretudo fé nos dias difíceis.

A Profa. Dr^a Maria de Fátima Dias Costa, dentre todos os “nãos” bastou apenas o seu sim para abrir as portas de uma nova caminhada me possibilitando o crescimento acadêmico e profissional! O meu muito obrigada!

A minha coorientadora Profa. Dr^a Silvia Costa Lima pela disponibilidade, incentivo, acolhimento por acreditado em mim e com isso ter me oportunizado a participar da vivência no mundo acadêmico.

Ao Prof. Dr. Roberto Meyer pela dedicação e empenho com primazia a frente do LabImuno possibilitando assim a realização das nossas pesquisas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Vitor Fortuna, um ser humano ímpar. Prof. Vitor, com o Sr. eu entendi o verdadeiro valor do que é ser um pesquisador. Não é apenas ler e escrever baseado em outros textos científicos, é saber montar o quebra-cabeças científico, ter o raciocínio crítico e amplo diante do objetivo a ser realizado. Muito obrigada por suas contribuições na minha formação no âmbito da pesquisa, pela confiança, direcionamentos e empenho ao longo desses três anos.

A Isadora Ribeiro e Sabrina Castro por terem sido a luz que me guiou para o mundo da Imunologia.

A Fabiane da Silva Reis Góes, “os bons ventos me levaram até você”. A gratidão que eu sinto por ter te conhecido é imensa, você me ensinou a olhar para dentro e que acima de tudo precisamos de fé. Obrigada pela paciência, pelo incentivo,

pela força, pelas broncas e por sempre me mostrar que eu posso dar o melhor de mim.

A Brysa Silveira, a voz mais doce e paciente no meu caminhar. As suas palavras de conforto me fizeram entender que há um propósito além do se viver, o viver em sua plenitude! Obrigada pelo acolhimento e afeto!

Ao meu quinteto, Carmélia Cardoso, Cíntia Lima, Maíra Fróes e Taiane Chiacchio nossos 10 anos de amizade e cada uma com sua peculiaridade que me ensina a ter mais resiliência, fé, alegria e ressignificar.

A Jussara Silveira, o tempo passa e o laço de nossa amizade persevera. Obrigada minha amiga pelas palavras de perseverança, apoio, fé, solidariedade e o carinho que sinto em suas palavras para mim.

A Maria das Neves, Roberto Castro e Aline Nascimento meu muito obrigada por me acolher como família, sempre com muito afeto, alegria e palavras de incentivo e apoio.

A Filipe Adeodato Garrido, “Que os desbravadores busquem novos mundos”. Muito obrigada pelo partilhar, o caminhar e por ter sido como uma prosa poética, um balé das vagas do mar e a força de sustentação para as calmarias.

A Vanessa Adeodato Garrido, “Eu pinto a minha própria realidade” disse certa vez Frida e essa frase não poderia melhor te representar para mim. Obrigada pelos momentos vividos e pelo aconchego do seu sorriso.

A Josemar Policarpo, pela amizade que já virou irmandade e por me ensinar a paciência e fé. Paciência para nos deixar abertos e sem exigência, como a praia – esperando por um presente do mar.

A Alan Cordeiro, pelo direcionamento, sensibilidade e força que me conduz para um caminho de luz, vida e segurança para o fortalecimento do meu eu.

A Iane Brito, que partindo da perspectiva feminina me ajudou a encontrar a cadência e fluidez diante das tempestades da vida.

A Álida Silveira, pela paciência e dedicação em compartilhar comigo os ensinamentos com relação ao vasto mundo da Estatística.

A Criatura e Arya, minhas doguinhas lindas e companheiras de estudos durante a madrugada.

Ao grupo de Terapia Celular, ao doutorando Tiago Ribeiro pela orientação nos experimentos e as ICs Beatriz dos Santos Costa, Caroline Lima Dias e Giselle Brito de Jesus por todo o suporte e proatividade para o desenvolvimento dos experimentos.

Aos professores do grupo COVID-19 Prof. Dr. Alex José Leite Torres, Prof. Dr. Ryan dos Santos Costa, Prof. Dr. José Tadeu Raynal, Profa. Dra. Soraya Castro Trindade e Profa. Dra. Silvana Beutinger Marchioro por todo com compartilhamento de conhecimento científico a minha trajetória acadêmica. Aos colegas de pesquisa, Gabriel Barroso, Dyjaene De Oliveira Barbosa, Andressa Marques e Taiane Gondim pelo apoio nos experimentos e conhecimento dividido.

A Gabriella Oliveira, Dr. Ricardo Gassman e Dr. Ricardo Figueiredo que contribuíram com esta pesquisa permitindo o acesso aos dados e amostras dos pacientes em nosso estudo.

Agradecimento especial ao Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LabImuno), laboratório em que desenvolvemos todos os nossos experimentos. Em particular agradecer a Profa. Dr^a. Songeli Menezes Freire, a Rogério Reis e Patrícia Mares de Miranda por todo o suporte técnico-científico e organizacional para o desenvolvimento das atividades na bancada. Agradeço imensamente ao Sr. Mário que nos ajudou em toda a questão do bom uso dos equipamentos, bem como a organização do laboratório.

À FAPESB e ao CNPQ pelo fomento financeiro para o desenvolvimento das atividades científicas ao longo da pandemia da COVID-19.

RESUMO

Introdução: A COVID-19 caracteriza-se pela hiperativação do sistema imunológico e liberação descontrolada de citocinas. Recentes estudos apontam que a sinalização prejudicada dos IFNA1 e seus receptores, IL17A, HERVs e IFNG pode estar associada à gravidade da COVID-19. **Objetivo:** Analisar a expressão dos genes IFNA1 e receptores IFNAR1/IFNAR2, IL17A e HERVs (HERVK-10 e HERVW-1) em leucócitos totais e níveis basais de IFN- γ no plasma de pacientes com COVID-19. **Métodos:** Estudo prospectivo, observacional e transversal com 117 pacientes recrutados (grave=58 e leve=59). Dados demográficos e clínicos foram coletados. Os leucócitos do sangue periférico foram isolados e o ensaio RT-qPCR foi realizado para análise da expressão gênica. Os níveis plasmáticos de IFN- γ foram mensurados pelo método ELISA. **Resultados:** Na amostra avaliada, observou-se prevalência do sexo masculino ($p < 0,05$), idosos ($p < 0,0001$), negros ($p < 0,0001$) e comorbidades pré-existentes ($p < 0,0001$). Os pacientes com COVID-19 grave apresentaram leucocitose, neutrofilia, contagem elevada de plaquetas e linfócitos reduzidos em comparação com os pacientes leves ($p < 0,0001$). Os índices SII, AISI e SII/Hb foram significativamente maiores em pacientes graves ($p < 0,0001$). Os níveis de expressão gênica de IFNA1, HERVW-1 e IL17A foram significativamente maiores em pacientes graves ($p < 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,001$, respectivamente). Entretanto, os níveis plasmáticos de IFN- γ não foram significativos. A análise ROC apontou que os índices SII e SII/Hb são bons marcadores prognósticos de gravidade da COVID-19, com AUC (0,98 e 0,99, $p < 0,0001$, respectivamente). **Conclusão:** Nossos resultados apontam que o segmento mais afetado pela COVID-19 compreende homens, idosos, negros e portadores de comorbidades, com maior expressão gênica de IFNA1, HERVW-1 e IL17A. Índices como SII e SII/Hb podem ser prognósticos promissores de gravidade para a COVID-19.

Palavras-chaves: COVID-19, IFNA1, IL17A, HERVW-1, SII e SII/Hb.

ABSTRACT

Introduction: COVID-19 is characterized by hyperactivation of the immune system and uncontrolled release of cytokines. Recent studies indicate that impaired signaling of IFNA1 and its receptors, IL17A, HERVs and IFN- γ may be associated with the severity of COVID-19. **Objective:** To analyze the expression of IFNA1 genes and IFNAR1/IFNAR2 receptors, IL17A and HERVs (HERVK-10 and HERVW-1) in total leukocytes and baseline levels of IFN- γ in the plasma of patients with COVID-19. **Methods:** Prospective, observational and cross-sectional study with 117 recruited patients (severe=58 and mild=59). Demographic and clinical data were collected. Peripheral blood leukocytes were isolated and RT-qPCR assay was performed for gene expression analysis. Plasma levels of IFN- γ were measured by the ELISA method. **Results:** Among the evaluated sample, there was a prevalence of males ($p < 0.05$), elderly ($p < 0.0001$), blacks ($p < 0.0001$) and pre-existing comorbidities ($p < 0.0001$). Patients with severe COVID-19 had leukocytosis, neutrophilia, and elevated platelet counts with reduced lymphocytes compared with mild patients ($p < 0.0001$). The SII, AISI and SII/Hb indexes were significantly higher in critically ill patients ($p < 0.0001$). IFNA1, HERVW-1 and IL17A gene expression levels were significantly higher in critically ill patients ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.001$, respectively). However, plasma levels of IFN- γ were not significant. ROC analysis showed that SII and SII/Hb indexes are good prognostic markers for the outcome of COVID-19, with AUC (0.98, 0.99, $p < 0.0001$, respectively). **Conclusion:** Our results indicate that the segment most affected by COVID-19 comprises men, the elderly, black people and those with comorbidities, with higher gene expression of IFNA1, HERVW-1 and IL17A. Indices such as SII and SII/Hb can be promising predictors of severity for COVID-19.

Keywords: COVID-19, IFNA1, IL17A, HERVW-1, SII e SII/Hb.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura do coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave.....	23
Figura 2. Tecidos humanos que expressam o receptor ECA2.....	24
Figura 3. Mecanismo de entrada viral do SARS-CoV-2.....	25
Figura 4. Sinalização da via interferon tipo I.....	39
Figura 5. Indução e sinalização do IFNG.....	42
Figura 6. Sinalização da IL17A e ligação às subunidades IL17RA e IL17RC.....	44
Figura 7. Coleta e transporte do sangue periférico.....	53
Figura 8. Isolamento do plasma.....	53
Figura 9. Isolamento de leucócitos no sangue periférico.....	54
Figura 10. Extração de RNA dos leucócitos totais com reagente TRIzol™	55
Figura 11. Curva de eficiência para o gene referência RPL19 e genes alvos HERVK-10 e HERVW-1.....	59
Figura 12. Curva de eficiência para o gene referência HPRT-1 e genes alvos IFNA1, IFNAR1, IFNAR2 e IL17A.....	60
Figura 13. Regressão linear das três diluições analisadas no experimento de padronização.....	61
Figura 14. Análise da expressão gênica por meio do RT-qPCR.....	62
Figura 15. Curva de amplificação para os genes alvo e referência.....	63
Figura 16. Curva de dissociação em duplicata do gene alvo IFNA1 e gene referência HPRT-1 e do Gene alvo HERVW-1 e gene referência RPL10.....	64
Figura 17. Comparação dos índices SII, AISI e SII/Hb entre pacientes com COVID-19....	74
Figura 18. Expressão relativa do IFNA1 e receptores IFNAR1 e IFNAR2, IL17A em relação ao gene de referência HPRT-1.....	76
Figura 19. Expressão relativa do retrovírus endógeno humano HERVW-1 e HERVK-10 em relação ao gene de referência RPL19.....	76
Figura 20. Curva ROC de NLR, PLR e genes IFNA1, IFNAR1, HERVW-1 e IL17A para prever a gravidade do COVID-19.....	78
Figura 21. Curva ROC de SII, AISI, SII_Hb como prognóstico da doença COVID-19.....	79
Figura 22 Comparação da secreção de IFN- γ em concentrações plasmáticas nos pacientes com COVID-19.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Sequência de nucleotídeos utilizados na PCR para a detecção da expressão gênica.....	57
Tabela 02. Valores do slope, r^2 e eficiência da curva para os genes do estudo.....	60
Tabela 03. Dados clínicos-epidemiológicos dos pacientes com COVID-19.....	67
Tabela 04. Marcadores laboratoriais de pacientes internados e ambulatoriais com COVID-19.....	70
Tabela 05. Relação neutrófilo-linfócito em pacientes com COVID-19.....	71
Tabela 06. Relação plaqueta-linfócito em pacientes com COVID-19.....	72
Tabela 07. Índice de imuno-inflamação sistêmica (SII) em pacientes com COVID-19.....	72
Tabela 08. Índice agregado de inflamação sistêmica (AISI) em pacientes com COVID-19.....	73
Tabela 09. Relação SII/Hb em pacientes com COVID-19.....	73
Tabela 10. Análise de NLR e PLR usada para prever a gravidade do COVID-19....	77
Tabela 11. Análise de HERVW-1, IL17A, IFNAR1 e IFNA1 para prever a gravidade do COVID-19.....	78
Tabela 12. Análise dos índices SII, AISI e SII/Hb como biomarcadores do COVID-19.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CoVs	Coronavírus
DCNT	Doença crônica não transmissível
DM	Diabetes Mellitus
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
G-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
IFN-Is	Interferons Tipo I
MERS	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
OMS	Organização Mundial de Saúde
SRC	Síndrome de liberação das citocinas
RPL	Relação Plaqueta- linfócito
RNL	Relação Neutrófilo - linfócito
SII	Índice de Infamação Sistêmica
AISI	Índice Agregado de Inflamação
SII/Hb	Índice de imuno-inflamação sistêmica e concentração de hemoglobina
IFN- γ	Interferon-gama
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
IFNAR1	Receptor Interferon Tipo 1
IFNAR2	Receptor Interfero Tipo 2
IL17A	Interleucina 17A
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TLR4	Via Toll-like Receptor 4
HERVW-1	Retrovírus Endógeno Humano W
HERVK-10	Retrovírus Endógeno Humano K
NGF	Fator de Crescimento Nervoso

NSPs	Proteínas não estruturais
PCR	Proteína C Reativa
LDH	Lactato desidrogenase
AST	Aspartato transaminase
ALT	Alanina transaminase
HLH	Linfocitose hemofagocítica secundária
pDCs	Células dendríticas plasmocitoides
RIG-I	Gene induzível por ácido retinóico
MDA5	Gene 5 associado à diferenciação de melanoma
APCs	Células apresentadoras de antígenos
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
IP-10	Proteína 10 induzida por interferon γ
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófagos -1 α
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
EDTA	Anticoagulante ácido etilendiamino tetra-acético
VGM	Volume corpuscular médio
CCR	Câncer colon reto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 O surgimento da pandemia da COVID-19.....	22
2.2 Estrutura genômica e características biológicas do SARS-CoV-2.....	22
2.3 Enzima conversora de angiotensina 2 como receptor do SARS-CoV-2	24
2.4 Aspectos Clínicos	25
2.5. Níveis de Gravidade	26
2.6. Fatores de Risco.....	27
2.7. Biomarcadores laboratoriais da COVID-19	29
2.7.1. Relação neutrófilo-linfócito (RNL) e relação plaqueta-linfócito (RPL)	31
2.7.2 Índices de Inflamação Sistêmica.....	32
2.8. Tempestade de Citocinas	33
2.9 Citocinas e Retrovírus Endógenos Humanos (HERVs).....	36
2.9.1 Interferon Tipo I (IFNA1) e Receptores IFNAR1 e IFNAR2	36
2.9.2 Interferon gama (IFN- γ).....	40
2.9.3 Interleucina 17 (IL17A).....	42
2.9.4. Retrovírus Endógenos Humanos (HERVK-10 e HERVW-1).....	45
3. JUSTIFICATIVA	47
3.1 Hipótese	48
4 OBJETIVOS	49
4.1 OBJETIVO GERAL	49
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
5. MATERIAIS E MÉTODOS	50
5.1 Considerações Éticas	50
5.2 Desenho do Estudo	50
5.3 Cenário do Estudo	50

5.4 Cálculo Amostral e Amostragem.....	51
5.5 Critérios de Inclusão	51
5.6 Critérios de Exclusão	51
5.7 Coleta de dados.....	52
5.8 Coleta de amostras biológicas	52
5.9 Obtenção do plasma sanguíneo por centrifugação	53
5.10 Isolamento dos leucócitos no sangue periférico	54
5.11 Extração de RNA com reagente TRIzol™	54
5.12 Análise quantitativa e qualitativa do RNA obtido	55
5.13 Preparo da biblioteca de cDNAs	56
5.14 PCR quantitativo em tempo real (RT- qPCR).....	57
5.14.1 <i>Primers utilizados no projeto</i>	57
5.14.2 <i>Padronização dos Primers</i>	58
5.14.2.1 <i>Características dos primers e padronização do RT- qPCR</i>	58
5.14.2.2 <i>Curva de eficiência de amplificação da Real time- PCR Quantitativa</i>	59
5.14.3 <i>Diluição e padronização das amostras de cDNA</i>	61
5.15 RT- qPCR em tempo real.....	63
5.15.1. <i>Análise da curva de Melting</i>	64
5.16 Ensaio de absorção imunoenzimático (ELISA)	64
5.17 Cálculo dos marcadores inflamatórios baseados em células sanguíneas.....	65
5.18 Análise de dados	66
6. RESULTADOS	67
6.1 Caracterização dos aspectos clínicos-epidemiológicos dos pacientes com COVID-19 ..	67
6.2. Análise do hemograma dos pacientes com COVID-19	68
6.2.1 <i>Análise dos resultados hematológicos</i>	68
6.3. <i>Análise do leucograma e plaquetograma dos pacientes com COVID-19</i>	69
6.4. Relação neutrófilo-linfócito (RNL) e relação plaqueta- linfócito (RPL) como prognóstico para a gravidade da COVID-19.....	70
6.5. Índice de imuno-inflamação sistêmica (SII), Índice agregado de inflamação sistêmica (AIS) e Índice de imuno-inflamação sistêmica e concentração de hemoglobina (SII/Hb).....	71
6.6. Comparação dos níveis de marcadores inflamatórios como prognóstico para a COVID-19	74
6.7 Análise da expressão gênica por meio do RT- qPCR	75
6.7.1 <i>Pacientes com COVID-19 grave produzem maiores níveis de IFNα1, IFNα1 e IL17A</i>	75

6.7.2 Avaliação dos Retrovírus Endógeno Humano HERVK-10 e HERVW-1 e sua relação com a progressão da COVID-19	76
6.8. AUC para RNL, RPL e genes IFNA1, IFNAR1, IL17A e HERVW-1 na previsão da gravidade em pacientes com COVID-19	77
6.9. AUC para SII, AISI e SII/Hb como biomarcadores prognósticos para pacientes com infecção por SARS-CoV-2	78
6.10. Resposta do Interferon gama (IFN- γ) como biomarcador de gravidade na infecção por COVID-19	80
7. DISCUSSÃO.....	81
8. CONCLUSÃO	92
9. REFERÊNCIAS	93
ANEXOS	114

1 INTRODUÇÃO

Ao final de dezembro de 2019, novos casos de pneumonia provocados por um β -coronavírus recém-identificado ocorreram na província de Wuhan (China). Em 11 de fevereiro de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) nomeou oficialmente essa doença como doença coronavírus 2019 (COVID-19) (GAO *et al.*, 2021). Segundo dados do painel COVID-19 da Universidade de Johns Hopkins datado em 10 de março de 2023 mais de 676.609.955 milhões de pessoas foram acometidas pela COVID-19 com 6.881.955 óbitos em escala mundial. De acordo com o painel Coronavírus do Brasil (2023) no Brasil já são cerca de 37.601.257 milhões de casos confirmados, sendo 702.907 óbitos confirmados. Com relação ao acompanhamento de casos na Bahia, o número total de casos confirmados abrange 1.801.969, sendo 31.617 óbitos (SESAB,2023).

A pandemia da doença de coronavírus 2019 (COVID-19) causada pelo coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) resultou em uma alta morbidade e mortalidade em todo o mundo (ZHANG *et al.*, 2022). Nesse contexto, diversos fatores de risco foram relacionados ao desenvolvimento e gravidade da COVID-19, dentre eles idade avançada, sexo masculino, comorbidades pré-existentes, como hipertensão arterial, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares, bem como disparidades étnicas (ZHANG *et al.*, 2023).

A progressão da doença coronavírus pode ser confirmada por alterações laboratoriais, como hemogramas e biomarcadores que podem ser utilizados para prever a gravidade da doença, hospitalização, internação em unidades de terapia intensiva (UTI) e mortalidade (BATTAGLINI *et al.*, 2022). Dentre esses parâmetros, destacam-se a relação neutrófilo-linfócito (RNL) e relação plaqueta-linfócito (RPL), bem como o índice de infamação sistêmica (SII), índice agregado de inflamação (AISI) e um novo índice denominado índice de imuno-inflamação sistêmica e concentração de hemoglobina (SII/Hb) (GHOBADI *et al.*, 2022; HERNANDEZ-AINSA *et al.*,2022) parâmetros hematológicos promissores na avaliação da gravidade e prognóstico da COVID-19 (ASPERGES *et al.*, 2023).

A gravidade da COVID-19 foi associada ao comprometimento da produção de IFNs tipo I (RAMASAMY; SUBBIAN, 2021). Os IFNs tipo I representam a primeira linha de defesa imunológica contra infecções virais devido ao recrutamento de várias células imunes (PALERMO *et al.*, 2021; DA SILVA *et al.*, 2021). Lee e Shin (2020) destacaram em seu estudo o papel do IFNA1 no desenvolvimento da COVID-19 grave, sugerindo que o IFNA1 apresenta papel importante na inflamação induzida por TNF e IL-1 na progressão da doença.

O interferon gama (IFN- γ) apresenta forte atividade antiviral e imunomoduladora, mas sua ação precisa ser regulada, pois a produção exacerbada de IFNG conduz à inflamação excessiva, contribuindo assim para a gravidade da COVID-19 (YAO *et al.*, 2020). Ainda no contexto da COVID-19, A IL17A foi associada como condutora no processo de doença na SDRA por meio de mecanismos dependentes e independentes dos neutrófilos que resulta na amplificação da resposta inflamatória devido à liberação das citocinas IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o recrutamento de neutrófilos para o cenário de lesão pulmonar (MAIONE *et al.*, 2021; ORLOV *et al.*, 2021).

Além disso, as sequências de retrovírus endógenos humanos (HERVs) podem ser ativadas por meio da proteína spike SARS-CoV-2 e do sistema complemento - particularmente C3b - que participa da transativação de HERVs (CHARVET *et al.*, 2023). A proteína imunopatogênica HERV-W via toll-like receptor 4 [TLR4] induz respostas pró-inflamatórias e é altamente expressa em linfócitos T CD3+ de pacientes com COVID-19 (CHARVET *et al.*, 2023). Alternativamente, o HERV-K além de comprometer o ciclo celular dos linfócitos, está relacionado à expressão do fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) e fator de crescimento nervoso (NGF) em mortes por COVID-19 (TEMEROZO *et al.*, 2022).

No presente estudo, buscou-se analisar a expressão dos genes IFNA1, receptores IFNAR1/IFNAR2, IL17A e HERVs (HERVK-10 e HERVW-1) em leucócitos totais e mensurar os níveis plasmáticos de IFN- γ em pacientes com COVID-19 para em conjunto com os fatores epidemiológicos, achados clínicos e laboratoriais em pacientes infectados com COVID-19 verificar a provável associação desses genes e parâmetros clínicos com a gravidade da doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O surgimento da pandemia da COVID-19

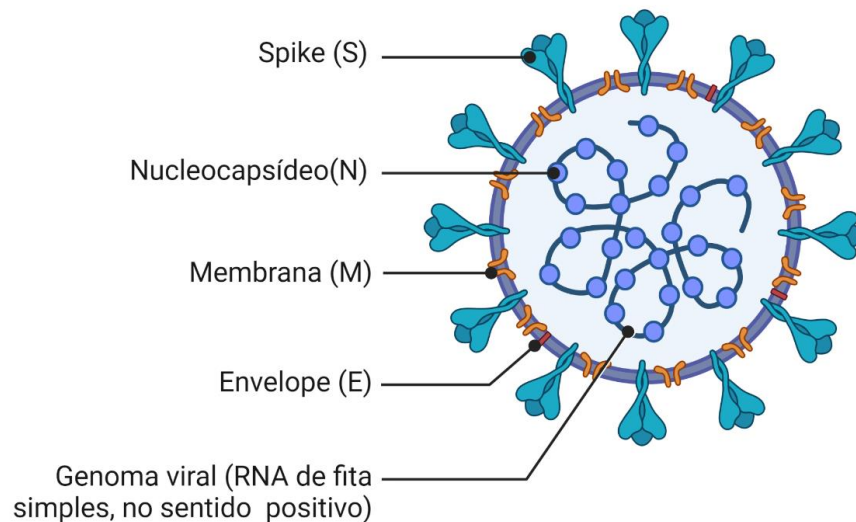
Em dezembro de 2019, o surto da doença do coronavírus 2019 (COVID-19) causada pelo coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2) foi relatado em Wuhan, província de Hubei, China (LI *et al.*, 2020). Inicialmente foram identificados, aproximadamente, 27 casos dos quais dentre eles, sete encontravam-se em estado grave (DENG PENG, 2020). A identificação etiológica do coronavírus foi divulgada em 9 de janeiro de 2020 (HU *et al.*, 2021). O agente etiológico foi identificado como o novo betacoronavírus - SARS-CoV-2 o qual compartilha 79% da sequência genômica com o SARS-CoV e 50% com o MERS-CoV (LU *et al.*, 2020). Em 30 de janeiro de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) comunicou o surto de SARS-CoV-2 como Emergência de Saúde Pública Internacional, sendo declarada em 11 de março de 2020 a pandemia global do novo coronavírus (COVID-19) (CUCINOTTA; VANELLI, 2020; WHO *et al.*, 2020).

2.2 Estrutura genômica e características biológicas do SARS-CoV-2

De acordo com Carlos e colaboradores (2020) os coronavírus (CoVs) são pertencentes à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae* que inclui duas subfamílias, classificadas como *Orthocoronavirinae* e *Letovirinae*. Semelhante a outros coronavírus, o genoma do SARS-CoV-2 consiste em um RNA de fita simples de sentido positivo [(+) ssRNA] com o comprimento inferior a 30 kb e grande similaridade de sequência (89-96,3%) com dois coronavírus presentes em morcegos: bat-SL-CoVZC45 e bat-SL-CoVZXC21 (CHAN *et al.*, 2020).

O SARS-CoV-2 apresenta proteínas não estruturais (NSPs) que são importantes para os processos de replicação e montagem do vírus. O SARS-CoV-2 apresenta quatro tipos de NSPs: a proteína transmembranar spike (S) que permite a ligação e entrada do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras por meio da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (MOHAMADIAN *et al.*, 2021); a proteína de membrana (M), uma das proteínas mais abundantes e parte integrante da membrana

viral proteína do nucleocapsídeo (N) que se liga ao RNA do vírus, sendo importante para formação do nucleocapsídeo, bem como a replicação do RNA viral (ASTUTI *et al.*, 2020) e o menor componente estrutural do SARS-CoV-2 a proteína de envelope (E) que está relacionada a montagem, liberação e patogênese viral (SCHOEMAN; FIELDING, 2019).

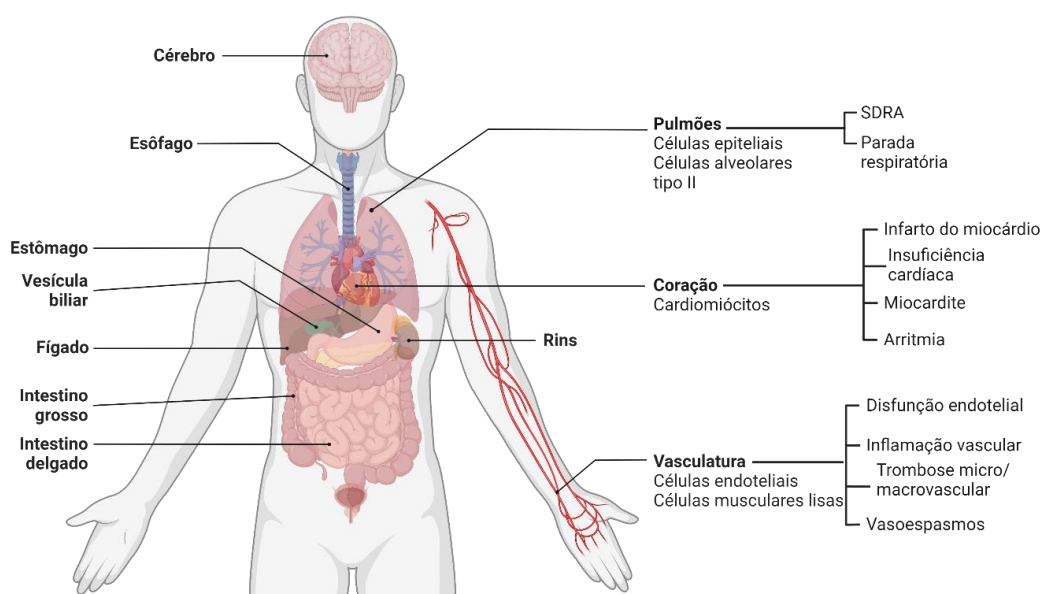


Criado com BioRender.com Fonte: (JACKSON *et al.*, 2022)

Figura 1. Estrutura do coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave.

2.3 Enzima conversora de angiotensina 2 como receptor do SARS-CoV-2

A enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) consiste em uma metalocarboxipeptidase transmembrana tipo I com importante função homeostática regulando o sistema renina – angiotensina (RAS) que está associado aos sistemas cardiovascular e imunológico (BIAN; LI, 2021). Estudos apontaram que a ECA2 é expressa não apenas em tecidos pulmonares, como também em órgãos extrapulmonares, a exemplo células endoteliais e do músculo liso arterial, células do miocárdio e células do esôfago (ZOU *et al.*, 2020), estômago e colangiócitos (QI *et al.*, 2020), neurônio e glia (KABBANI; OLDS, 2020), células epiteliais da língua, ovário e mama (XU *et al.*, 2020) e tecido adiposo (CHEN *et al.*, 2020).



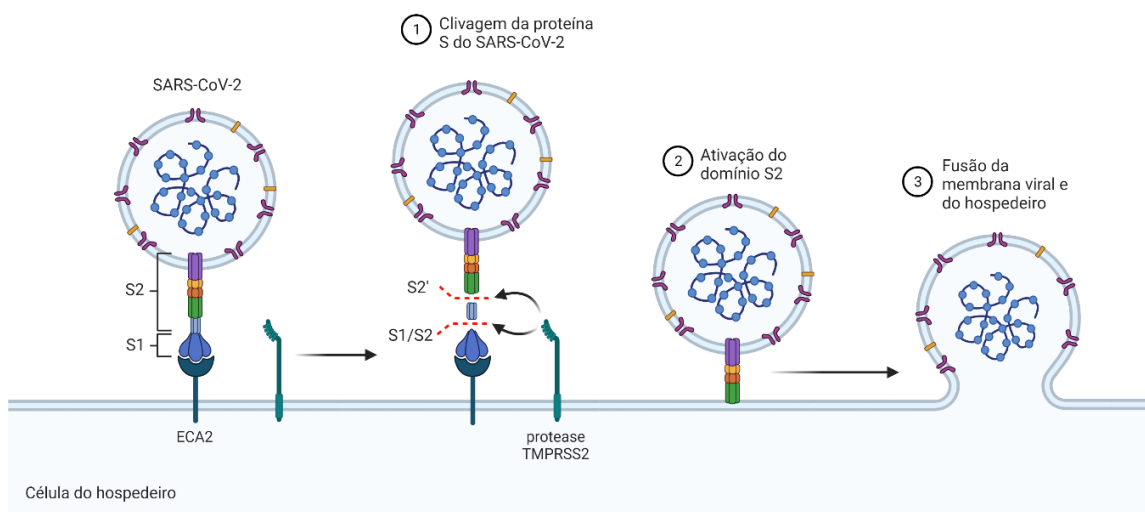
Criado com BioRender.com Fonte: (RYAN; CAPLICE,2020)

Figura 2. Tecidos humanos que expressam o receptor ECA2. (a). SDRA: Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo.

O contato inicial do SARS-CoV-2 com a célula hospedeira inicia-se por meio das interações entre a glicoproteína S e seu receptor enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2). A glicoproteína S é homotrimérica e divide-se em duas partes

funcionalmente distintas (S1 e S2) (HARTENIAN *et al.*, 2020). A subunidade S1 encontra-se presente na superfície celular e abrange o domínio de ligação ao receptor (RBD) que propicia o tropismo celular e a patogenicidade. O domínio S2 transmembrana - que apresenta regiões de repetição heptal e o peptídeo de fusão - favorece a fusão de membranas virais e celulares (LETKO; MARZI; MUNSTER, 2020).

Além da ECA2, a enzima protease serina transmembranar 2 (TMPRSS2) consiste em um dos genes humanos importantes para a infecção por SARS-CoV-2 devido a sua correlação com a entrada viral na célula (YAGHOUBI *et al.*, 2023). Após a ligação ao receptor ECA2, as proteínas do SARS-CoV-2 serão clivadas e ativadas pela TMPRSS2, presente na superfície celular, ocorrendo assim o processamento da proteína spike viral e exposição ao sítio de ligação da ECA2 do hospedeiro para o reconhecimento do aminoácido presente na subunidade S2, com posterior fusão na membrana (HOFFMANN *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2022; JACKSON *et al.*, 2022).



Criado com BioRender.com Fonte: (HARTENIAN *et al.*, 2020)

Figura 3. Mecanismo de entrada viral do SARS-CoV-2.

2.4 Aspectos Clínicos

As características clínicas relacionadas a COVID-19 são caracterizadas como pleomórficas e consideram indivíduos assintomáticos, pacientes com sintomas leves e graves com distintos estágios evolutivos (ZHOU *et al.*, 2020). Os sinais clínicos mais

comuns são febre, tosse, dor de garganta, dor de cabeça, fadiga, mialgia e falta de ar. É sabido que, ao término da primeira semana a doença pode evoluir para pneumonia, insuficiência respiratória e óbito (WIERSINGA *et al.* 2020).

De acordo com Heymann e Shindo (2020) os sintomas clínicos mais frequentes provenientes do SARS-CoV-2 são febre (80% dos casos), tosse (60% dos casos), fadiga (35% dos casos), produção de expectoração (30% dos casos) e falta de ar (15% dos casos). Existem registros de sintomas neurológicos, a exemplo, fadiga, tontura e alterações de consciência, bem como derrames isquêmicos, hemorrágicos e dores musculares (MAO *et al.*, 2020). A COVID-19 também foi associada à doença hipercoagulável que favorece ao risco de trombose venosa (DANZI *et al.*, 2020).

As manifestações clínicas da infecção por COVID-19 costumam surgir após 5-6 dias de incubação (SAMUDRALA *et al.* 2020). O tempo médio do começo dos sintomas a partir da incubação da COVID-19 é a partir de 5,1 dias, sendo que os infectados demonstram os sintomas por 11,5 dias. Logo após o período de incubação (4 a 14 dias), a maioria dos indivíduos progredem para sintomas classificados como leves e muito graves ou até mesmo o óbito (LAUER *et al.* 2020).

A maior parte dos indivíduos acometidos pela COVID-19 irá apresentar a doença na sua forma leve a moderada (55%). Entretanto, cerca de 30% dos pacientes podem desenvolver dispneia por volta do 5° dia após o início da doença, sendo importante a hospitalização entre o 7° e 8° dia (CHAN *et al.* 2020; WU *et al.* 2020). A deterioração respiratória acomete pacientes na forma mais grave e a hospitalização é imprescindível nesses casos devido ao quadro de hipoxemia e pneumonia bilateral (75%) (SHI *et al.* 2020).

2.5. Níveis de Gravidade

De acordo com as Diretrizes para Tratamento da COVID-19 (NIH, 2020), pacientes acometidos pela infecção em decorrência do SARS-CoV-2 apresentam diversas manifestações clínicas relacionadas a sintomas leves e o quadro clínico severo. Adultos com infecção por SARS-CoV-2 são divididos em quatro categorias, sendo elas:

a) **Infecção assintomática ou pré-assintomática:** indivíduos que apresenta teste positivo para SARS-CoV-2, contudo os sintomas não estão associados com a COVID-19.

b) **Doença leve:** presença de um dos vários sinais e sintomas da COVID-19, tal como, febre, tosse, fadiga, anosmia, hiposmia, dor-de-garganta, dores musculares, náuseas, vômitos e diarreia, entretanto não demonstram falta de ar, dispneia ou imagens anormais do tórax;

c) **Doença moderada:** evidências de doença respiratória inferior no decorrer da avaliação clínica ou imagem, bem como saturação de oxigênio (SpO₂) $\geq 94\%$;

d) **Doença grave:** indivíduos com saturação de oxigênio correspondente a SpO₂ $< 94\%$, pressão de oxigênio inspirado PaO₂ / FiO₂ < 300 mm Hg, frequência respiratória > 30 respirações/min ou infiltrados pulmonares $> 50\%$;

e) **Doença crítica:** caracterizado com insuficiência respiratória, choque séptico e disfunção múltipla de órgãos.

Avaliações preliminares em pacientes acometidos pela COVID-19 incluem radiografia de tórax, triagem por ultrassom e avaliação de possíveis alterações na tomografia computadorizada (TC), bem como na função pulmonar importantes para monitorar a progressão da doença. (HAN *et al.*, 2023). Ademais, os exames laboratoriais, a exemplo, hemograma completo, avaliação da creatinina (Cr), aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH), perfil lipídico e de ferro, procalcitonina sérica, proteína C reativa (PCR) e dímeros D podem ser benéficos para avaliar o prognóstico de pacientes com COVID-19 ao identificar possíveis lesões multiorgânicas (HARIYANTO *et al.*, 2021; SIAVOSHI *et al.*, 2023).

2.6. Fatores de Risco

Segundo Gilyazova e colaboradores (2023) a COVID-19 caracteriza-se pelo alto índice de morbimortalidade e que variam de fatores demográficos como idade avançada, sexo masculino e etnia, bem como à presença de doenças subjacentes como doenças cardiovasculares, hipertensão e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Fatores de risco como diabetes, dispneia, síndrome do desconforto

respiratório agudo (SDRA), histórico de tabagismo, albumina e dímero-D também são comumente correlacionados com a taxa de mortalidade por COVID-19 (DESSIE; ZEWOTIR, 2021; ZHANG *et al.*, 2023).

Devido a menor eficácia do sistema imunológico, os idosos tendem a ser o grupo populacional mais vulnerável e com as maiores chances de desenvolver doenças infecciosas (FLOOK *et al.*, 2021). Alterações imunológicas associadas ao envelhecimento podem promover a hiporreatividade e desregulação da imunidade, também chamado de imunossenescência, que vem sendo apontada como a principal causa para a patogênese da COVID-19 (SCHMITT *et al.*, 2023).

De acordo com Shepherd e colaboradores (2021) os hormônios sexuais alteram a expressão de genes relacionados às respostas imunológicas. As diferenças hormonais entre os homens e mulheres podem ser responsáveis pelas distintas respostas de sexo às infecções virais respiratórias, principalmente na COVID-19 (BRANDI, 2022). Em pacientes com COVID-19, os baixos níveis do andrógeno testosterona estão associados aos estados pró-inflamatórios, sintomas graves, síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e internação em UTI (RASTRELLI *et al.*, 2021; ZSICHLA; MÜLLER, 2023). A baixa produção de testosterona desregula a homeostase intracelular de Ca^{2+} o que favorece a infecção por SARS-CoV-2 e sua replicação viral e o aumento da atividade pró-inflamatória das células imunes inatas (MONTAÑO *et al.*, 2022).

A hipertensão pode estar fortemente associada ao risco de infecção por SARS-CoV-2 e ao desenvolvimento do pior prognóstico da COVID-19 (THAKUR *et al.*, 2021). A hipertensão arterial, como entidade multigênica, de etiologia múltipla fisiopatogenia multifatorial acarreta um estado pró-inflamatório, bem como a mitigação da reposta imune inata, o qual favorece o quadro de patogênese em pacientes com COVID-19, particularmente em pacientes críticos (AZEVEDO *et al.*, 2021).

A infecção por SARS-CoV-2 em pessoas com diabetes principia maiores condições para o estresse, liberação de hormônios hiperglicêmicos, tais como glicocorticoides e catecolaminas (WANG *et al.*, 2020), bem como alteração metabólica sistêmica severa, caracterizada por níveis aumentados de leptina e adiponectina inferior (FRANCISCO *et al.*, 2019). Geralmente indivíduos diabéticos apresentam

inflamação crônica de baixo grau, que pode propiciar as tempestades de citocinas e assim coadjuva para resultados graves da COVID-19, bem como o óbito (METHA *et al.*, 2020). Estudo publicado por Guo *et al.*, (2020) acerca dos parâmetros laboratoriais dos pacientes com COVID-19 apontou que a contagem absoluta de linfócitos em pacientes diabéticos é significativamente menor do que em pacientes não diabéticos.

Outro fator de risco considerado para a progressão da COVID-19 consiste no tabagismo (CUI *et al.*, 2022). Vários mecanismos foram indicados para caracterizar a relação entre o uso de tabaco e COVID-19 grave, dentre eles a depuração mucociliar prejudicada pela fumaça do tabaco, a qual diminui as respostas imunes inatas e adaptativas propiciando no aumento do risco para infecções pulmonares virais (QIU *et al.*, 2017). Em uma revisão sistemática acerca da associação entre o tabagismo e pacientes com COVID-19 observou-se que pacientes que sempre fumaram apresentaram maiores chances de hospitalização, desenvolvimento da forma grave da doença e maior risco de progressão e mortalidade por COVID-19 (GALLUS *et al.*, 2023).

2.7. Biomarcadores laboratoriais da COVID-19

Segundo Ponti e colaboradores(2020), existem padrões de anormalidades hematológicas, bioquímicas, inflamatórias que foram identificados em pacientes com a forma grave COVID-19 em comparação com a forma leve, sendo importante para modelos de estratificação de risco. Os biomarcadores hematológicos relacionados a estratificação para os pacientes com COVID-19 incluem: contagem de leucócitos, contagem de linfócitos e neutrófilos, relação neutrófilo-linfócito (NRL), contagem de plaquetas, contagem de eosinófilos e hemoglobina (GALLO MARIN *et al.*, 2021).

A infecção por SARS-CoV-2 apresenta impacto na homeostase da membrana estrutural dos glóbulos vermelhos (RBC). Pacientes com COVID-19 apresentam aumento de intermediários glicolíticos com oxidação e fragmentação de proteínas de membranas das hemácias resultando em alterações nos mecanismos relacionados as membranas dos glóbulos vermelhos e a afinidade com o oxigênio da hemoglobina (THOMAS *et al.*, 2020).

No decorrer da progressão da COVID-19, o número de neutrófilos circulantes aumentam e com isso a neutrofilia foi apontada como marcador de doença respiratória grave e mau prognóstico, correlacionada com o estado hiperinflamatório e tempestade de citocinas (PALLADINO, 2021; ZHANG *et al.*, 2020). O aumento da infiltração de neutrófilos imaturos e/ou disfuncionais colabora para as alterações das respostas imunes nos pulmões de pacientes graves pela COVID-19 (PALLADINO, 2021).

Diversos estudos apontam a eosinopenia em pacientes diagnósticos com COVID-19 (ZHANG *et al.*, 2020; LIAO *et al.*, 2020; DANWANG *et al.*, 2020). Resultados destes estudos apontam a associação da eosinopenia com a gravidade da doença (ROSENBERG;FOSTER,2021). O processo da fisiopatologia da eosinopenia ainda não é certo, sendo provavelmente multifatorial e associada à migração de eosinófilos para o local da inflamação, bloqueio da eosinofiloiose e apoptose dos eosinófilos em decorrência do IFN α 1 liberado na fase aguda da inflamação (RODRIGO-MUÑOZ *et al.*, 2021; PALLADINO, 2021).

A linfopenia consiste em uma das anormalidades hematológicas mais presentes em pacientes acometidos pela infecção por SARS-CoV-2, sendo observada em cerca de 85% dos casos graves (QIN *et al.*, 2020). A linfopenia pode ser causada pela fixação do SARS-CoV-2 aos linfócitos por meio dos receptores ECA2 e CD147 ou por meio das lesões imunes decorrentes dos mediadores inflamatórios (WATANABE *et al.*, 2010; PALLADINO, 2021). Em vista do que foi mencionado, sugere-se que a alta prevalência de linfopenia associada à COVID-19 pode ser usada como potencial biomarcador preditivo da gravidade da doença (KARIMI; NIAZKAR; RAD, 2021).

A contagem de plaquetas é um biomarcador acessível economicamente, mais simples e disponível e tem sido relacionado de forma independente à gravidade da COVID-19, bem como ao risco de mortalidade na unidade de terapia intensiva e com isso foi adotada como biomarcador para pacientes com COVID-19 (PONTI *et al.*, 2020). Na infecção por SARS-CoV-2, a presença de trombocitopenia se correlaciona com a gravidade clínica, sendo uma das manifestações clínicas mais comuns da COVID-19 relatada em 5 a 40% dos pacientes (TERPOS *et al.*, 2020; PALLADINO, 2021). Yang e colaboradores (2020) apontaram que a trombocitopenia foi o achado

mais comum entre os pacientes com COVID-19 estando relacionada ao aumento da mortalidade.

2.7.1. Relação neutrófilo-linfócito (RNL) e relação plaqueta-linfócito (RPL)

A replicação viral do SARS-CoV-2 resulta na síntese de citocinas e quimiocinas que ativam as respostas imunes resultando na tempestade de citocinas. Biomarcadores circulantes podem oferecer elementos acerca da inflamação e estado imunológico sendo úteis para o prognóstico de pacientes com COVID-19 (MAN *et al.*, 2021). A relação neutrófilo-linfócito (RNL) e relação plaqueta-linfócito (RPL) são indicadores da resposta inflamatória sistêmica (SENGUL *et al.*, 2017). O RNL e RPL têm sido investigados em numerosas doenças, a exemplo doenças respiratórias, gastrointestinais e cardiovasculares, sendo que valores mais elevados relacionam-se com as formas mais graves das doenças, com pior prognóstico (LIU *et al.*, 2020).

A relação neutrófilo-linfócito (RNL) é um marcador relativamente novo e importante, calculada como uma relação entre a contagem absoluta de neutrófilos (ANC) e a contagem absoluta de linfócitos (ALC), em que conjuga duas vias do sistema imunológico: resposta imune inata devido aos neutrófilos e imunidade adaptativa pelos linfócitos (SONG *et al.*, 2021; ASGHAR *et al.*, 2022). Estudos avaliaram que a RNL identifica o risco para mortalidade, progressão para a doença grave, risco de intubação, risco da doença grave em paciente intubados e internações em UTI (YANG *et al.*, 2020; MORADI *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2020).

Em uma metanálise conduzida por Lagunas-Rangel (2020) com 828 pacientes foi demonstrado que RNL aumenta significativamente em pacientes com a forma grave da COVID-19. Estudo retrospectivo avaliou indivíduos infectados por COVID-19 e encontrou um RNL elevado em cerca de 87,18% dos pacientes, sendo que o RNL foi o fator mais significativo para a incidência da doença grave (DJAHARUDDIN *et al.*, 2021). Shang e colaboradores (2020) observou que a RNL é um fator de risco independente para a COVID-19 grave e que em combinação com marcadores como PCR pode ser um preditor confiável da gravidade da COVID-19.

Como indicador de inflamação, a razão plaquetas-linfócitos (RPL) e

desempenha um papel crucial devido o recrutamento de neutrófilos e outras células para o local da lesão (QU *et al.*, 2020). Na COVID-19, a linfopenia é mais acentuada que a trombocitopenia principalmente em casos mais graves, o que pode ser um dos mecanismos para os altos níveis de RPL em casos graves da COVID-19 (LIPPI; PLEBANI; HENRY, 2020; SIMADIBRATA *et al.*, 2022).

Foi demonstrado que o nível elevado de RPL nos marcadores sanguíneos de 30 pacientes diagnosticados por COVID-19 prolongou o tempo de internação e desta forma foi associado ao prognóstico da doença (QU *et al.*, 2020). Em uma metanálise investigando a diferença nos níveis de RPL na admissão em adultos, Simadibrata e colaboradores (2022) demonstraram o alto valor de RPL elevado na admissão entre pacientes graves o que pode refletir a hiperativação da tempestade de citocinas.

2.7.2 Índices de Inflamação Sistêmica

Índices de inflamação sistêmica, incluindo o índice de imuno-inflamação sistêmica (SII), índice agregado de inflamação sistêmica (AISI) são índices inflamatórios que têm sido utilizados na previsão de gravidade de processos inflamatórios sistêmicos e nos pacientes com COVID-19, estavam associados a mortalidade (GHOBADI *et al.*, 2022). O novo marcador combinado de imuno-inflamação sistêmica e concentração de hemoglobina (SII/Hb) apresenta-se como um novo marcador analítico sanguíneo sendo um biomarcador útil para o prognóstico do câncer colorretal (CCR) ou processos inflamatórios (ROSSI *et al.*, 2017; KOSTAKIS *et al.*, 2018; HERNANDEZ-AINSA, 2022).

O índice de imuno-inflamação sistêmica (SII) consiste no número de linfócitos, neutrófilos e plaquetas sendo um indicador associado à inflamação, o qual indica o estado imunológico e inflamatório (HU *et al.*, 2014). Estudo de coorte retrospectivo com 326 pacientes infectados por SARS-CoV-2 indicou que o grupo com maior índice SII apresentou maiores chances de complicações graves, como síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, SDRA, eventos cardiovasculares, coagulação intravascular disseminada, infecção secundária, acidose e sepse (LI *et al.*, 2020). O

SII foi sugerido como marcador prognóstico no seguimento de pacientes com sepse por descrever a instabilidade na resposta inflamatória, além de ter sido significativamente alterado em pacientes com COVID-19 (LAGUNAS-ALVARADO *et al.*, 2017; USUL *et al.*, 2020).

Nesse contexto, o índice agregado de inflamação sistêmica (AISI) é baseado na contagem de linfócitos, neutrófilos, monócitos e plaquetas (XIE *et al.*, 2023). Em estudo multicêntrico conduzido por Hamad e colaboradores (2022) o índice AISI foi maior em pacientes com COVID-19 internados na unidade de terapia intensiva (UTI) sendo também considerado como preditor de gravidade. Os papéis distintos que os linfócitos, neutrófilos, plaquetas e monócitos apresentam na resposta imune, propicia para a capacidade do índice AISI identificar pacientes com COVID-19 com maior risco do desenvolvimento para a mortalidade (ERCAN *et al.*, 2023).

O novo marcador combinado de imuno-inflamação sistêmica e concentração de hemoglobina (SII/Hb) proposto por Hernandez-Ainsa e colaboradres (2022) avalia o processo inflamatório relacionado ao aumento da proliferação celular tumoral, angiogênese e inibição da apoptose e como a interação entre a inflamação sistêmica e resposta imune do hospedeiro reflete analiticamente nos níveis sanguíneos de plaquetas e leucócitos, principalmente neutrófilos e linfócitos (MCALLISTER; WEINBERG, 2014; GAERTNER; MASSBERG, 2019). Vale ressaltar que o índice SII/Hb é associado a concentração de hemoglobina, visto que a hemoglobina reflete o grau de anemia em pacientes no estado oncológico (HERNANDEZ-AINSA *et al.*, 2022).

2.8. Tempestade de Citocinas

Em 12 de março de 2020, a doença de coronavírus já atingia cerca de 125.048 pessoas em todo o mundo, com a mortalidade atingindo cerca de 3,7%. Nesse cenário era urgente o desenvolvimento de novas terapias, a exemplo antivirais e vacinas. Estudos apontavam que um subgrupo de pacientes acometidos pela COVID-19 grave poderiam desenvolver a síndrome da tempestade de citocinas e com isso foi recomendada a identificação do tratamento da hiperinflamação com o uso de terapias

já existentes como esteroides, imunoglobulina intravenosa, tocilizumabe e inibição de JAK com o intuito de reduzir a crescente mortalidade (METHA *et al.*, 2020).

Em 2020, Metha *et al.*, (2020) definiram o manejo atual da COVID-19 como de suporte sendo a insuficiência respiratória da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) a principal causa de mortalidade (RUAN *et al.*, 2020). Metha e colaboradores(2020) definiram a lipo-histiocitose hemofagocítica secundária (sHLH) como uma síndrome hiperinflamatória caracterizada por hipercitocinemia fulminante e falência múltipla de órgãos, além de estar associado ao aumento da interleucina IL-2, IL-7, fator estimulante de colônias de granulócitos, proteína quimioatraente de monócitos 1, proteína inflamatória de macrófagos 1- α e fator de necrose tumoral- α e associação à gravidade da doença COVID-19 (RAMOS-CASALS *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2020). Entretanto, o conceito acerca da tempestade de citocinas na COVID-19 no estudo conduzido por Metha e colaboradores (2020) foi criticado devido à ausência de informações claras sobre a definição e a citocinemia na SDRA carecendo assim de uma revisão mais ampla sobre o conceito de tempestade de citocinas (METHA; FAJGENBAUM, 2021).

A terminologia referente as alterações hiperinflamatórias tem sido objeto de muitos estudos (NIKIFOROW; BERLINER, 2020; NIGROVIC, 2021). Em revisão de literatura Metha e Fajgenbaum (2021) conceituam a tempestade de citocinas como um termo mais abrangente de diversos distúrbios hiperinflamatórios associados a desregulação imune por sintomas constitucionais, inflamação sistêmica e disfunção de múltiplos órgãos que podem resultar na falência múltipla de órgãos e morte. A etiopatogenia das tempestades de citocinas ainda não é totalmente elucidada, entretanto pode ocorrer resultado de distúrbios inflamatórios ou reconhecimento ineficaz com evasão imune, resposta efetora de forma exagerada e produção de citocinas (METHA; FAJGENBAUM, 2021). Na tempestade de citocinas tipos específicos de células patológicas incluem células T, neutrófilos, macrófagos e células NK e níveis aumentados de várias citocinas inflamatórias, a exemplo IL-1, IL-6, IL-18 e TNF- α (FAJGENBAUM; JUNE, 2020).

Achados laboratoriais na tempestade de citocinas são influenciados por causas subjacentes (FAJGENBAUM; JUNE, 2020). Marcadores como a proteína C-reativa

(PCR) encontra-se elevado e se correlaciona diretamente com a gravidade (LEE *et al.*, 2014). Muitos pacientes apresentam quadro de hipertrigliceridemia, anormalidades no hemograma, como leucocitose, leucopenia, anemia, alterações de biomarcadores como ferritina, níveis de dímero-D, fibrinogênio plasmático, colesterol HDL e LDL, hormônios da tireoide, creatinina, albumina e aspartato aminotransferase (AST) (BATTAGLINI *et al.*, 2022).

A SDRA é uma das principais causas da mortalidade na COVID-19, em pacientes com SDRA foram definidos dois fenótipos distintos: fenótipo hiperinflamatório (citocinas pró-inflamatórias, aumento da incidência de choque e maior mortalidade) e o fenótipo hipoinflamatório (SINHA *et al.*, 2020; REDDY *et al.*, 2020; CALFEE *et al.*, 2014). Em pacientes com SDRA por COVID-19, a mortalidade foi maior em pacientes com subfenótipo hiperinflamatório (63%) quando comparado ao subfenótipo hipoinflamatório (39%) (SINHA *et al.*, 2020). A mortalidade em ambos os grupos foi maior quando comparado aos resultados relacionados ao SDRA não COVID, o que sugere haver fatores adicionais relacionados a COVID-, além da tempestade de citocinas (METHA; FAJGENBAUM, 2021).

Condições coexistentes como hipertensão arterial, diabetes mellitus e obesidade estão relacionados aos casos mais graves da COVID-19, devido ao estado inflamatório crônico pré-existente para o possível desenvolvimento da disfunção orgânica a partir da resposta imune (FAJGENBAUM; JUNE, 2020). A variação genética também pode influenciar na gravidade da infecção por SARS-CoV-2, a regulação negativa do IFNA1 pode propiciar o aumento da vulnerabilidade a infecções virais e presença de altos títulos de anticorpos neutralizantes em pacientes com pneumonia grave por COVID-19 que neutralizam a capacidade dos IFNA1 bloquear a infecção por SARS-CoV in vitro (METHA; FAJGENBAUM, 2021; BASTARD *et al.*, 2020).

2.9 Citocinas e Retrovírus Endógenos Humanos (HERVs)

2.9.1 Interferon Tipo I (IFNA1) e Receptores IFNAR1 e IFNAR2

Os interferons tipo I (IFNs) constituem a principal linha de defesa contra os vírus e são cruciais para a resposta imune contra a infecção por SARS-CoV-2 (NAGAOKA *et al.*, 2022; ACHARYA; LIU; GACK, 2020). Do ponto de vista imunológico, os IFNs apresentam três tipos de funções: ativação do estado antiviral nas células infectadas e vizinhas, o que limita a disseminação do processo infeccioso; modulação das respostas imunes inatas, a exemplo apresentação de antígenos e funções das células NK e ativação do sistema imunológico adaptativo para o desenvolvimento de respostas das células T e B específicas (IVASHKIV; DONLIN, 2014).

As células dendríticas plasmocitoides (pDCs) são as principais produtoras de IFNA e além disso detectam os vírus por meio de TLR7 e TLR9, propiciando a secreção de IFN-I por meio da sinalização MyD88-IRF7 (CELLA *et al.*, 1999; KAWAI; AKIRA, 2011). De acordo com Venet e colaboradores, (2023) a comparação de respostas entre os pacientes com COVID-19 e os níveis de gravidade sugere que a resposta das pDC a células infectadas por SARS-CoV-2 se correlaciona de forma inversa com a resposta inflamatória exacerbada, nível basal de IFNA1 e IFNG e atividade inflamatória.

O início da resposta do IFNA tipo I é distinto a depender da gravidade da COVID-19 (RAMASAMY; SUBBIAN, 2021). Segundo Jamilloux e colaboradores, (2020) uma forte resposta do IFNA1 foi observada nos estágios iniciais da infecção com sintomas leves da COVID-19, ao tempo que em casos graves, o início tardio da resposta IFNA1 foi identificado. Foi relatado que a indução tardia das respostas relacionadas ao IFNA1 resultam no aumento da hiperinflamação, recrutamento de monócitos e macrófagos (LEE *et al.*, 2020).

O estudo de Hadjadj e colaboradores (2020) analisou que baixos níveis plasmáticos de IFNA1 precederam a deterioração clínica, transferência para a UTI e que diferentes padrões de IFNA1 circulante caracterizava cada grau da doença. Estudo de acompanhamento longitudinal incluindo 32 pacientes com COVID-19

demonstrou que o SARS-CoV-2 poderia desencadear respostas IFNA1 retardadas e quadro inflamatório persistente que estão relacionados ao pior prognóstico para pacientes com COVID-19 (GALANI *et al.*, 2021; ZHANG; ZHAO; ZHAO,2021).

Lee e colaboradores (2020) identificaram que a COVID-19 grave é acompanhada pelas respostas do IFNA1 e TNF/ IL-1 β sugerindo que a resposta IFNA1 pode contribuir o processo hiperinflamatório por potencializar a inflamação por TNF/IL-1 β na progressão grave da COVID-19. Entretanto, de acordo com Blanco-Melo e colaboradores (2020) baixos níveis de IFNA1 são produzidos em resposta à infecção por SARS- CoV-2, uma explicação para a baixa expressão do IFNA1 pode estar associada ao um pequeno subconjunto de células resistentes ao mecanismo antagonista do SARS-CoV-2, o qual produz quantidades suficientes de IFNA1 para a ativação de células imunes e a expressão dos genes estimulados por interferon (ISGs).

Park e Iwasaki (2020) apontam que níveis elevados de IFNs se correlacionam com a gravidade da COVID-19. Em uma coorte de pacientes com SARS, altos níveis de IFNA1 e ISGs relacionaram-se com a gravidade da doença (CAMERON *et al.*, 2007). Um estudo de Wei e colaboradores(2020) examinou que na coorte de pacientes com COVID-19, os níveis de IFNA1 e ISGs foram associados à carga viral e gravidade da COVID-19. Com isso, esses estudos revelam que infecções graves podem resultar em assinaturas de IFNA1 elevadas, mesmo com baixa redução na carga viral (PARK; IWASAKI, 2020).

Um estudo longitudinal acerca das falhas imunológicas na COVID-19 grave por Lucas e colaboradores(2020) relata que os níveis de IFNA1 foram mantidos em níveis mais elevados em pacientes com doença grave, mas que diminuíram em pacientes com doença moderada. Foi observado também que independentemente dos pacientes apresentarem doença moderada ou grave, a carga viral se correlacionou de forma significativa com os níveis de IFNA1 e IFNG.

Após o reconhecimento viral, o IFNA1 é ativado transcricionalmente por vias de sinalização compostas por sensores virais, proteínas adaptadoras, quinases e fatores de transcrição (ABLASSER; HORNUNG, 2013; SCHOGGINS, 2014). Os IFNs recém produzidos ligam-se aos receptores cognatos IFNAR para o início da sinalização pela

via JAK/STAT com a expressão dos genes estimulados por interferon (ISGs) (SCHOGGINS, 2014). A indução transcricional dos ISGs desempenha papel importante na infecção viral, devido o efeito inibitório em diferentes estágios da replicação viral, a exemplo fusão da membrana e expressão gênica viral (DA SILVA *et al.*, 2021).

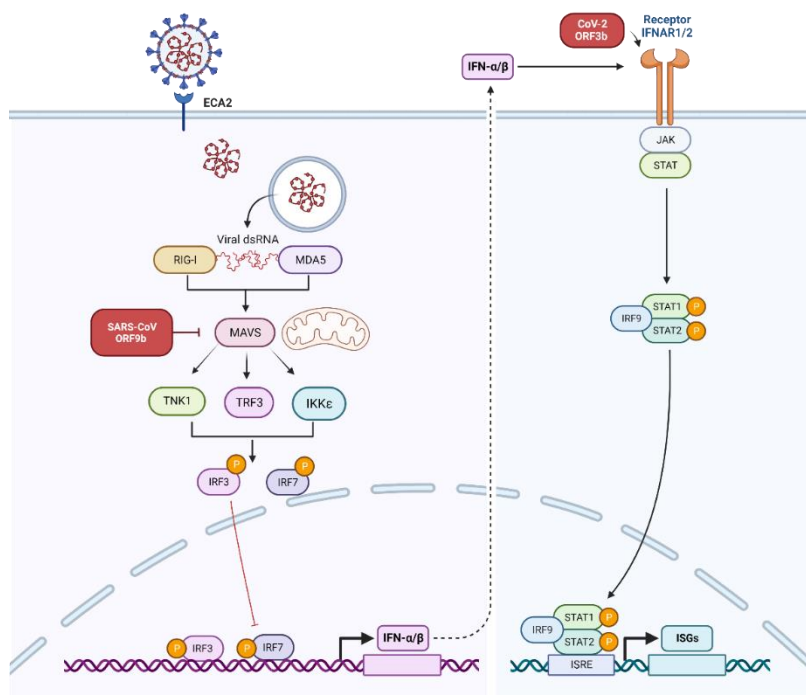
O RNA do coronavírus é detectado por sensores citosólicos, a exemplo gene induzível por ácido retinóico (RIG-I) e gene 5 associado à diferenciação de melanoma (MDA5) (ZALINGER *et al.* 2015; LI; LIU, ZHANG,2010). Após a ativação, tanto RIG-I e MDA5 interagem com a proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS) resultando no recrutamento do fator 3 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF3), quinase de ligação a TANK 1 (TNK1) e inibidor do fator nuclear κ B (I κ B) quinase- ϵ (IKK ϵ) para a fosforilação dos genes reguladores IRF3 e IRF7. A dimerização e translocação do IRF3 e IRF7 para o núcleo promove a expressão de IFN-1 que irá se ligar aos receptores de interferon alfa e beta (IFNAR) (SA RIBEIRO *et al.*, 2020).

Os interferons tipo I (IFNA1) são constituídos por duas subunidades transmembranares, IFNAR1 e IFNAR2. Os receptores IFNAR1 e IFNAR2 são constituídos por um domínio extracelular – responsável pela ligação ao IFNA1 -, uma hélice transmembrana e domínio intracelular não estruturado (ICD) importantes para a vinculação aos JAKs e STATs (THOMAS *et al.*, 2011; PIEHLER *et al.*, 2012). JAK1 está associado a IFNAR2 e TYK2 a IFNAR1. STAT1 e STAT2 se ligam ao ICD do IFNAR2 (PIEHLER *et al.*, 2012; ARIMOTO *et al.*, 2017). Após a fosforilação cruzada, os STATs se dissociam do receptor e formam homo e heterodímeros que são transportados para o núcleo, no qual atuam como fatores de transcrição para os genes (ISGs). O STAT1/ STAT2 formam com o IRF9 o fator de gene 3 estimulado por interferon (ISGF3) que se liga a um grupo distinto de genes alvo que abarcam os elementos de resposta estimulada por interferon (ISRE). Vale ressaltar que, a homodimerização STAT1 / STAT1 e STAT3 / STAT3 e a formação do complexo binário STAT2 / IRF9 são conduzidas pelo IFNA1 que resulta em amplas funções imunes inatas e adaptativas (SCHREIBER, 2020).

Os coronavírus revelam diversos mecanismos para sobrepujar as respostas do

IFN α/β em células infectadas, sendo que essa capacidade de bloqueio está associada a gravidade clínica da doença (DE WIT *et al.*, 2016). A capacidade dos coronavírus de evitar a imunidade inata no decorrer dos 10 primeiros dias da infecção em humanos foi relacionada a um decurso de inflamação generalizada e aumento da carga viral (SARIOL; PERLMAN, 2020).

Bastard e colaboradores (2020) relataram que além da resposta prejudicada do IFN-1 desencadeada pelo SARS-CoV-2, autoanticorpos neutralizantes contra IFNs tipo I precederam a infecção por SARS-CoV-2 estando relacionados a gravidade da doença. Em estudo conduzido por Zhang e colaboradores (2020) foi observado que cerca de 3,5% dos pacientes com pneumonia em decorrência da COVID-19 gravemente doentes apresentam mutações genéticas que estão envolvidas na deficiência autossômica recessiva AR IRF7 que altera a produção de IFN1 por células dendríticas plasmocitoides e deficiência de AR de IFNAR1 que prejudica a produção de IFN-I intrínseca de fibroblastos a SARS- CoV-2.



Criado com BioRender.com Fonte: Próprio autor

Figura 4. Sinalização da via interferon tipo I.

2.9.2 Interferon gama (IFN- γ)

O interferon gama (IFN- γ) consiste em uma citocina pleiotrópica que apresenta numerosas respostas biológicas, a exemplo proteção contra infecções virais e bacterianas e regulação das células efetoras relacionadas a imunidade inata e adaptativa (TODOROVIĆ-RAKOVIĆ; WHITFIELD, 2021). No decorrer da infecção, as células *natural killer* (NK) são as principais responsáveis pela produção de IFN- γ , assim como células especializadas do sistema imunológico (células T e linfócitos citotóxicos) e células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como monócitos/macrófagos e células dendríticas importantes para a autoativação celular (FRUCHT *et al.*, 2001; SCHRODER,2004). Enquanto a secreção do IFN- γ pelas células NK atuam na defesa inicial do hospedeiro, os linfócitos T contribuem para as respostas do IFN- γ na imunidade adaptativa (FRUCHT *et al.* 2001).

O receptor funcional de IFN- γ (IFNGR) é formado por duas cadeias de ligação IFNGR1 associadas a duas cadeias de IFNGR2 (SCHRODER *et al.* 2004). A cadeia IFNGR2 consiste no fator limitante para a capacidade da resposta do IFNG e o nível de expressão do IFNGR2 é regulado de acordo com o estado de diferenciação ou ativação celular. Populações de CD4⁺ e Th1 apresentam baixos níveis de expressão referentes a cadeia IFNGR2 na superfície celular o que resulta no bloqueio funcional de aspectos referentes a sinalização de IFN- γ (BACH; AGUET; SCHREIBER, 1997).

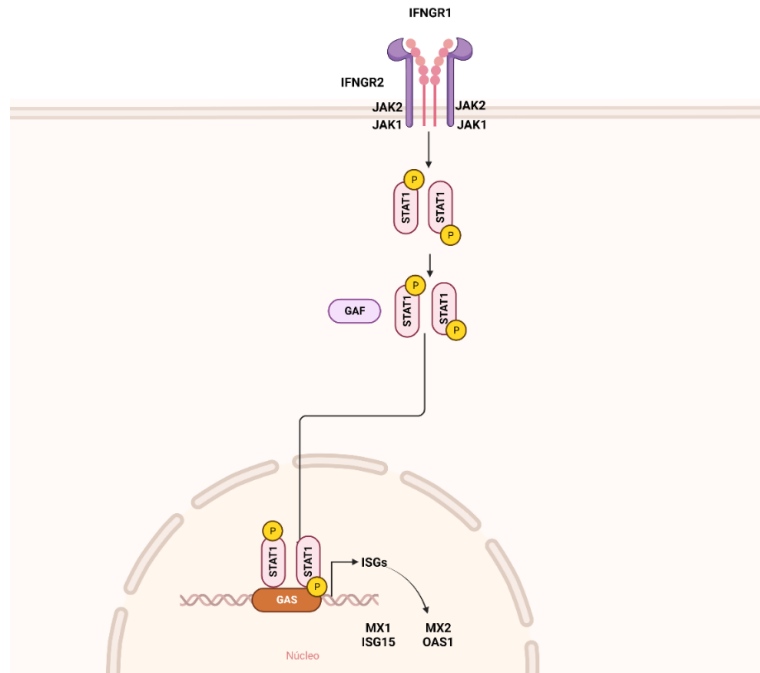
A ligação dos dímeros de IFN- γ ao complexo IFNGR1/2 leva à fosforilação das tirosinas quinases JAK1 e JAK2. A ligação aos receptores promove a transfosforilação e ativação de JAKs (ZHOU,2009). Os JAKs ativados se associam a STAT para induzir o fator ativado por gama (GAF), logo após ocorre a translocação do GAF para o núcleo para induzir os genes estimulados por IFN e sequência ativada por gama (GAF) resultando na expressão de genes antivirais, a exemplo Myxovirus 1 e 2 (MX1 e MX2), 2',5'- oligoadenilato sintetase 1 (OAS1) e gene 15 estimulado por interferon (ISG15) (BOEHM *et al.* 1997; SCHNEIDER; CHEVILLOTTE; RICE, 2014; GARCÍA-SASTRE ,2017).

MX1 codifica a proteína responsável por metabolizar o trifosfato de guanosina (GTP) que inibe a replicação viral no núcleo, enquanto o MX2 tem potente atividade

antiviral no citoplasma (VERHELST; HULPIAU; SAELENS, 2013). O ISG15 codifica a proteína semelhante à ubiquitina que interage com as proteínas virais e minimiza suas funções no decorrer da infecção (PERNG; LENSCHOW, 2018) e o OAS1 participa da resposta antiviral celular inata, pois sintetiza oligômeros que atuam na RNase L que deteriora o RNA viral prejudicando a sua replicação (SCHWARTZ *et al.*, 2020).

Gadotti e colaboradores (2020) em estudo retrospectivo demonstrou que altos níveis de IFN- γ estavam relacionados ao pior prognóstico, sendo que o IFN- γ foi maior nos estágios iniciais da doença. Em um estudo que se propôs a investigar os perfis das citocinas e sua correlação com a gravidade em amostras do sangue periférico de 40 pacientes confirmados com COVID-19, Liu e colaboradores (2020) demonstraram que pacientes com COVID-19 grave apresentaram concentrações séricas mais altas de IL-6, IL-10, IL-12 e IFN- γ do que nos casos leves sugerindo que a tempestade de citocinas pode estar associada à gravidade da doença. Segundo Villalba e colaboradores (2020) foi observado níveis mais altos de expressão com relação ao IFN- γ nas vias áreas superiores de pacientes acometidos pela COVID-19 devido a correlação com os níveis mais altos de ECA2 o que favorece para a suscetibilidade à infecção.

Chen e colaboradores (2020) observou que ocorre expressão reduzida de IFN- γ pelas células CD4⁺ T, CD8⁺ e NK, constatou ainda que o IFN- γ pelas células CD4⁺ T foi menor em pacientes graves quando comparado a pacientes moderados. Em um estudo observacional retrospectivo Imeneo e colaboradores (2022) relataram uma produção reduzida de IFN- γ por linfócitos em pacientes com COVID-19 na forma grave da doença. A redução da contagem de células T e a produção retardada de IFN- γ no sangue periférico podem refletir o recrutamento de células T ativadas no tecido pulmonar, bem como nos órgãos linfoides com hiperinflamação local e secreção de citocinas inflamatórias (DIPIAZZA; GRAHAM; RUCKWARDT, 2021).



Criado com BioRender.com Fonte: Próprio autor.

Figura 5. Indução e sinalização do IFNG.

2.9.3 Interleucina 17 (IL17A)

A IL17A é uma citocina pró-inflamatória que é secretada por linfócitos Th17 sob o estímulo do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), IL-23 e IL-6 derivados de fagócitos, ademais células imunes tais como células T gama/delta (T $\gamma\delta$), células T natural killer invariantes (iNKT), células linfoides inatas tipo 3 (ILC3), neutrófilos e macrófagos podem expressar IL17 a partir da estimulação por IL-1 β e IL-23 (KUWABARA *et al.*, 2017). As propriedades pró-inflamatórias da IL17A são importantes para mediar a inflamação e imunopatologia (VELDHOEN, 2017).

IL17A ativa diversas vias de sinalização que produzem numerosas citocinas, a exemplo IL-6, IL-1 β , TNF α , G-CSF, GM-CSF e TGF- β e quimiocinas (IL-8 e MCP1) estimuladas por células epiteliais, células endoteliais e macrófagos para a indução de mediadores inflamatórios que atraem células imunes para o local de ação da IL17A (RYZHAKOV *et al.*, 2011; QIN *et al.*, 2020). Quimiocinas como a G-CSF e IL-8 (CXCL8) ativam o recrutamento de células imunes, como neutrófilos para a área inflamada dos alvéolos propiciando a ativação desregulada de células imunes, o que resulta na tempestade de citocinas (QIN *et al.*, 2020).

Durante a sinalização, a IL17A se liga às subunidades IL17RA e IL17RC para a transdução da sinalização nas células alvo para com isso gerar moléculas efetoras (BREMBILLA; SENRA; BOEHNCKE, 2018). Os receptores se ligam ao Act1 para o recrutamento do TRAF6, logo após o recrutamento ocorre a ubiquitinação do TRAF6 que viabiliza uma cascata de interações moleculares promovendo a fosforilação e degradação proteossômica de I κ B o que permite a translocação nuclear do NF κ B e a ativação de citocinas inflamatórias (SHIBABAW, 2020; BREMBILLA; SENRA; BOEHNCKE, 2018). As respostas imunes desreguladas induzidas por meio da IL17A demonstraram causar a tempestade de citocinas durante a COVID-19, devido ao aumento da patologia pulmonar e diminuição da sobrevida (DIAO *et al.*, 2020).

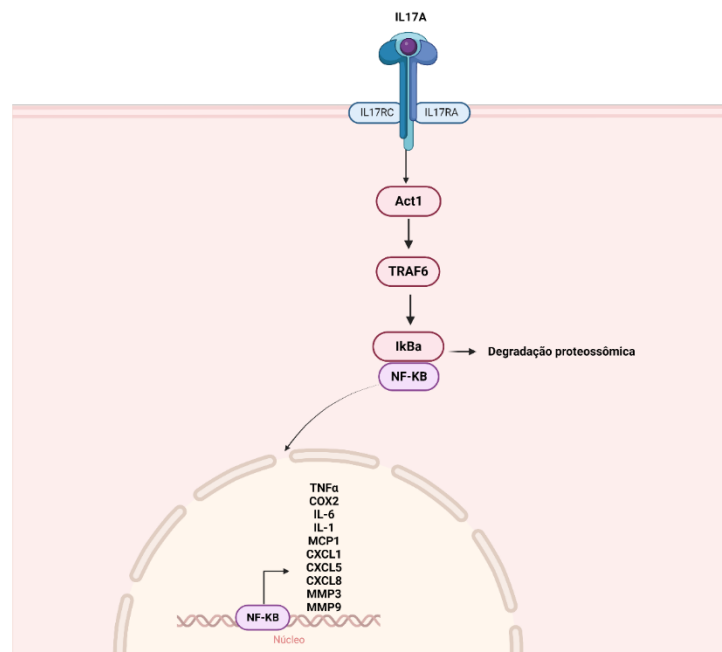
A SDRA consiste em um dos principais fatores de mortalidade associado ao SARS-CoV-2 (ORLOV *et al.*, 2020). A SDRA caracteriza-se por um quadro de edema pulmonar não cardiogênico resultante do dano endotelial e epitelial alveolar (LEW *et al.*, 2003). Neste cenário, a IL17A foi relacionada ao processo da doença na SDRA por meio de mecanismos inerentes aos neutrófilos. Durante a infecção, os neutrófilos são recrutados para as lesões pulmonares viabilizando dano tecidual por meio de oxidantes e proteases (SUTHERLAND *et al.*, 2014). Mikacenic e colaboradores (2016) observaram que os níveis circulantes e alveolares de IL17A estavam correlacionados ao aumento de neutrófilos alveolares, permeabilidade alveolar e disfunção orgânica em pacientes com SDRA.

Salinas e colaboradores (2020) revelaram que a IL17A apresenta quadros distintos entre casos leves e graves se correlacionando de forma positiva com o aumento do escore de gravidade da lesão pulmonar. Ademais, a IL17A promove um papel no recrutamento precoce de neutrófilos para os pulmões, caracterizando um efeito deletério associado a um mau prognóstico em casos graves da COVID-19 (WU *et al.*, 2020).

Consoante Parackova e colaboradores (2020), tanto os linfócitos Th17 quanto os neutrófilos foram relacionados aos danos do sistema imune concernente a COVID-19. A gravidade clínica da doença demonstrou relação com níveis séricos de exacerbados de IL17A envolvidas na manutenção de células Th17 observadas em infecções por outros coronavírus, tal como MERS-CoV e SARS-CoV (XU *et al.*, 2020;

AHALLAWI *et al.*, 2018).

De acordo com Goel e colaboradores (2021) a gravidade da COVID-19 demonstrou se relacionar de forma positiva com os níveis de IL-1 β , IL-6, TNF e a citocina pró-inflamatória IL17A. Ao avaliar os níveis de proteína da IL17A, TNF α , IL-1 β na saliva dos pacientes com COVID-19 em distintas gravidades Sharif-Askariv e colaboradores (2022) observaram que o nível de IL17A consiste em um potencial biomarcador para a gravidade da COVID-19, bem como piores resultados de sobrevivência. Em um estudo de caso-controle que investigou os níveis séricos da IL17A no sangue periférico de pacientes com COVID-19, Elsheshtawy e colaboradores (2023) relataram que o nível sérico das IL17A foi significativamente maior no grupo grave em comparação ao grupo controle, sendo fortemente correlacionado com a presença de febre e aumento da necessidade de oxigênio, bem como com a contagem absoluta de linfócitos e com isso considerado como um biomarcador de gravidade em pacientes com COVID-19.



Criado com BioRender.com Fonte: Próprio autor.

Figura 6. Sinalização da IL17A e ligação às subunidades IL17RA e IL17RC.

2.9.4. Retrovírus Endógenos Humanos (HERVK-10 e HERVW-1)

HERVs consistem em elementos genéticos oriundos da infecção ancestral de células germinativas mediada por retrovírus exógenos que integram cerca de 8% do genoma humano (FRANK; FESCHOTTE, 2017). A ativação de HERVs foi determinada por sua participação em patologias como, câncer, esclerose múltipla, diabetes tipo 1 e artrite reumatoide (MATTEUCCI *et al.*, 2018; LEVET *et al.*, 2017) que representam condições presentes em pacientes que desenvolveram a forma grave da COVID-19.

O grupo HERVK são os retrovírus mais recentes na linhagem germinativa humana sendo também a classe mais biologicamente ativa (BANNERT; KURTH, 2004). Dentre da estrutura do HERVK a proteína env é importante para o reconhecimento do receptor e fusão da membrana (HOHN; HANKE; BANNERT *et al.* 2013). Estudos apontaram imunomodulação em relação ao HERVK env na COVID-19, bem como outras doenças como câncer de ovário, câncer de próstata, artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico associados aos desfechos clínicos negativos (TEMEROZO *et al.*, 2022; XUE; SECHI; KELVIN, 2020; GRANDI; TRAMONTANO, 2018). Além disso, a expressão da proteína envelope (env) do HERV estimula a imunidade inata e adaptativa em virtude da semelhança com a proteína viral exógena (TRELA; NELSON; RYLANCE, 2016).

Em estudo conduzido por Guo e colaboradores (2022) foi observado que por meio da infecção do trato respiratório superior ocorreu a ativação do SARS-CoV-2 e expressões significativamente elevadas de gag, env e pol referente ao gene do HERVK foram identificados em pacientes com COVID-19 moderados e graves. Ainda nesse contexto o estudo de Temerozo *et al.* (2021) apontou que foram encontradas sequências nos aspirados traqueais (AT) em pacientes com COVID-19. Além disto, o HERVK env estava 5 vezes mais presente no aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 sob ventilação mecânica quando comparados com amostras dos aspirados traqueais dos pacientes com sintomas leves. O HERVK foi associado aos indutores de G-CSF em células imunes (MOROZOV *et al.*, 2013) e NGF em neurônios (BHAT *et al.*, 2014). O papel dos HERVs na etiopatogênese da COVID-19

ainda está sob investigação.

Recentemente, outro retrovírus endógeno humano W (HERVW-1) foi relacionado à gravidade da patologia por COVID-19. Estudo piloto conduzido por Balestrieri *et al.*, (2021) analisou o envolvimento do HERV-W ENV como um fator contribuinte para a imunopatologia da COVID-19. O estudo evidenciou a alta expressão da proteína HERVW env nas células sanguíneas de pacientes acometidos pela COVID-19. Foi realizada a análise de leucócitos na admissão hospitalar revelando níveis elevados de mRNA e de proteína de HERVW env em pacientes COVID-19 em comparação com os doadores saudáveis.

Vale ressaltar que, detectou-se associação significativa dos linfócitos com a proteína HERV-W ENV, bem como a expressão de vários mediadores pró-inflamatórios envolvidos na COVID-19 e tempestade de citocinas. Han *et al.*, (2020) apontam que em pacientes com COVID-19, os níveis de mRNA do HERVW ENV se correlacionam consideravelmente com os níveis de interleucina 6 (IL-6), tal como a IL-17, TNF- α e quimiocinas, como CXCL6 e MCP1, presentes na inflamação das vias áreas e encontrados em níveis séricos elevados nos pacientes (HUANG *et al.*, 2020).

3 JUSTIFICATIVA

A pandemia da doença de coronavírus 2019 (COVID-19) caracteriza-se como uma doença infecciosa causada pela nova cepa do coronavírus humano, a síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2) e resultou em alta morbidade e mortalidade em todo mundo (ZHANG *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2023). Os padrões clínicos da COVID-19 podem variar de casos assintomáticos a pacientes gravemente enfermos (DONG *et al.*, 2020). Alterações radiológicas nos pulmões, tosse seca e febre são as manifestações clínicas mais comuns em pacientes com COVID-19, além desses sintomas a pneumonia viral grave com insuficiência respiratória e doenças subjacentes são as principais causas de morte em pacientes graves (ZHANG *et al.*, 2021). Idade, sexo masculino, raça/cor, comorbidades pré-existentes, linfopenia, neutrofilia foram relatados como fatores de risco associados à gravidade em pacientes com COVID-19 (RODRIGUEZ-NAVA *et al.*, 2022).

Uma das características mais relevantes da COVID-19 consiste na síndrome da tempestade de citocinas em que a insuficiência respiratória está relacionada à expressão significativa de citocinas pró-inflamatórias, a exemplo IL-2, IL-27, IL-10, fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), proteína 10 induzida por interferon γ (IP-10), proteína inflamatória de macrófagos -1α (MIP-1 α) e fator de necrose tumoral α (TNF α) que leva ao recrutamento de células inflamatórias e danos teciduais ao pulmão (HUANG *et al.*, 2020; MUDD *et al.*, 2020).

Diante disso, para entendermos a modulação da resposta imune sistêmica em pacientes com COVID-19 realizamos uma investigação dos parâmetros hematológicos, bem como análise comparativa das respostas inflamatórias em um estudo transversal com pacientes graves e leves acometidos pela COVID-19, para isso avaliamos genes inflamatórios como IFNA1 e seus receptores IFNAR1 e IFNAR2, IFN- γ e IL17A e retrovírus endógenos humanos HERVK-10 e HERVW-1.

3.1 Hipótese

A hipótese do estudo é que a expressão gênica de citocinas inflamatórias IL17A, IFNA1 e seus receptores (IFNAR1 e IFNAR2), retrovírus endógenos humanos (HERVK-10 e HERVW-1), interferon – gama (IFN- γ) e biomarcadores laboratoriais estão aumentados em pacientes que desenvolvem a forma grave da COVID-19.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a expressão gênica de citocinas inflamatórias, de retrovírus endógenos humanos e biomarcadores hematológicos em pacientes com COVID-19 associando ao desfecho clínico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o perfil clínico-epidemiológico dos casos (leves e graves) com diagnóstico para COVID-19 e identificar fatores associados à gravidade.
- Analisar a expressão dos genes IFNA1 e seus receptores IFNAR1 e IFNAR2 bem como IL17A nas células do sangue periférico de pacientes com diagnóstico de COVID-19.
- Avaliar a expressão dos genes HERVW-1 e HERVK-10 nas células do sangue periférico de pacientes com infecção por SARS-CoV-2.
- Comparar a produção de Interferon-gama (IFN- γ) no plasma de pacientes diagnósticos a forma leve e grave da COVID-19.
- Avaliar o poder preditivo das razão neutrófilo-linfócitos (RNL), razão plaqueta-linfócitos (RPL) e índices de inflamação sistêmica (SII, AISI e SII/Hb) para o prognóstico associado a gravidade da COVID-19.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Considerações Éticas

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos/Instituto de Ciências da Saúde (ICS) (CAAE 30764720.1.3004.5662, Parecer nº: 4.040.329) pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) (Processo 30764720.1. 0000.0053 Parecer nº: 4.318.395) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (Processo 30764720.1. 0000.0053 Parecer nº: 4.014.165). Os termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foram obtidos de todos os participantes elegíveis.

5.2 Desenho do Estudo

O presente estudo é do tipo transversal que faz parte de um projeto maior intitulado “Estudo da Assinatura Molecular para a Determinação de Gravidade da Doença do Coronavírus 2019 (COVID-19)”.

5.3 Cenário da população de estudo

Este estudo foi realizado no estado da Bahia (Brasil), nos municípios de Salvador e Feira de Santana entre o período de junho a dezembro de 2020, anterior ao período de vacinação nacional. A população do estudo consistiu em 117 pacientes classificados como leves (n=59) e graves (n=58), com diagnóstico associados a COVID-19 e recrutados por meio de visitas domiciliares ou internações na Unidade de Terapia Intensiva do Instituto Couto Maia, Hospital Geral Clériston de Andrade e Hospital EMEC levando em consideração o período de infecção entre sete a catorze dias. Para a realização do estudo, os pacientes foram pareados de acordo com o sexo e idade (\pm 10 anos).

O diagnóstico de COVID-19 foi pela detecção do agente etiológico SARS-CoV-2 por meio do teste de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR). Os testes de RT-PCR para os pacientes internados no Instituto Couto Maia foram realizados pelo Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN). Enquanto que, os pacientes do grupo leve realizaram os exames para o diagnóstico da COVID-19

em laboratórios de sua preferência. Os pacientes foram classificados nos seguintes grupos:

a) **grupo grave:** diagnosticados com a forma grave da doença, tal como infecção por SARS-CoV-2 cursando com saturação de pulso de oxigênio inferior a 94%, frequência respiratória persistentemente acima de 24 incursões por minuto ou indicação internação hospitalar;

b) **grupo leve:** pacientes diagnosticados com a forma leve da doença que foi considerada quando apresentaram infecção por SARS-CoV-2 na ausência dos fatores de risco referenciados.

5.4 Cálculo Amostral e Amostragem

Para o cálculo do tamanho amostral, considerou-se uma exposição (aumento na expressão gênica de marcadores de resposta inflamatória) de 50% no grupo controle (proporção 1, pacientes leves) e de 75% no grupo caso (proporção 2, pacientes graves), utilizando-se o site Cálculo amostra da UNESP – Bauru (http://calculoamostral.bauru.usp.br/calculoamostral/ta_diferenca_proporcao.php). Assumiu-se erro alfa (α nível de significância) de 5% e erro beta (β poder da amostra) de 20%, numa proporção de 1:1 foram calculados uma amostra de 58 pacientes em cada grupo.

Os grupos foram divididos em grupo controle e grupo caso, os quais foram pareados de acordo com o sexo e idade (levando-se em consideração um intervalo de 10 anos). O processo de amostragem foi conduzido por conveniência.

5.5 Critérios de Inclusão

Foram incluídos neste estudo os pacientes com idade igual ou maior a 18 anos de idade e com diagnóstico laboratorial de infecção ativa por SARS-CoV-2 durante avaliação ambulatorial, hospitalização ou visita domiciliar.

5.6 Critérios de Exclusão

Para os critérios de exclusão foram utilizadas as seguintes características: gestantes, doenças autoimunes em atividade e neoplasia maligna em tratamento.

5.7 Coleta de dados

A busca documental para este estudo foi realizada por meio do sistema eletrônico SMPEP e Laboratório LACEN para pacientes graves. Vale ressaltar que, tanto para os pacientes do grupo grave como do grupo leve foram investigados dados epidemiológicos, a exemplo: sexo e idade; sintomas e presença de comorbidades, no decorrer da infecção. Foram analisadas as seguintes comorbidades: diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, doença cardiovascular, doença renal e obesidade. Com relação aos sintomas foram considerados: tosse seca, tosse produtiva, dispneia, febre, fadiga/mialgia.

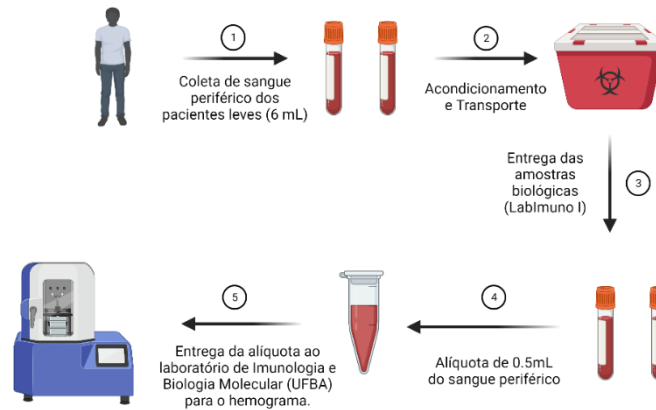
Os dados laboratoriais referentes ao hemograma e leucograma também foram inseridos na coleta de dados.

A coleta de dados relacionados ao perfil clínico-epidemiológico dos pacientes leves foi aplicada por meio do questionário semiestruturado (Anexo 1) sob forma de entrevista individual por um dos membros da equipe diante do acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2)

5.8 Coleta de amostras biológicas

5.8.1 Coleta e transporte do sangue periférico

Após assinatura do TCLE e entrevistas com os pacientes do grupo leve foram coletadas cerca de 6 mL de amostras do sangue periférico em dois tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Com relação ao grupo grave as amostras do sangue periférico eram coletas pela equipe hospitalar. Os tubos contendo as amostras foram acondicionados em caixas térmicas refrigeradas, vedadas e fixadas para a sua estabilização, protegidas do sol e da umidade. Cerca de 0,5 mL de sangue periférico dos pacientes controle foram entregues para o Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da Universidade Federal da Bahia para a realização do hemograma (Figura 07).



Criado com BioRender.com Fonte: Próprio Autor

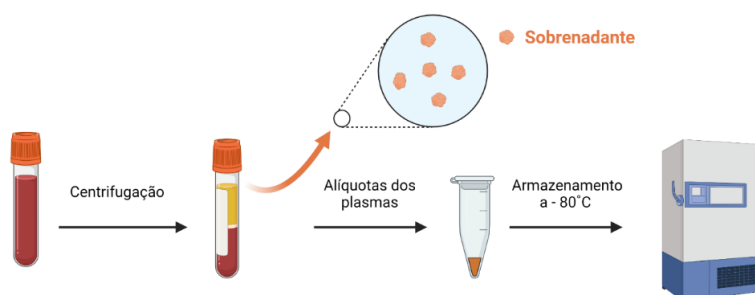
Figura 07. Coleta e transporte do sangue periférico

5.8.2 Hemograma

Os hemogramas dos pacientes classificados como graves e leves foram realizados no Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) e no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da Universidade Federal da Bahia (LABIMUNO). As leituras das amostras de sangue foram feitas no analisador automático mirandray – modelo BC – 6200 Vytra.

5.9 Obtenção do plasma sanguíneo por centrifugação

O plasma foi obtido por centrifugação de 2,5mL de sangue total, colhido em anticoagulante EDTA por centrifugação a 2.500 rpm, por \approx 10 minutos, a 4°C. Foram feitas alíquotas dos plasmas em tubos de 1,5 mL, sendo armazenadas a - 80°C, para a posterior dosagem de citocinas.

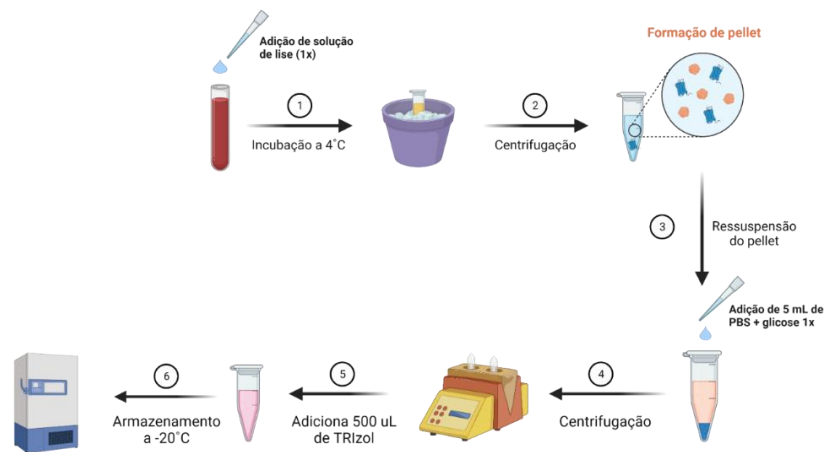


Criado com BioRender.com Fonte: Próprio Autor

Figura 08. Isolamento do plasma

5.10 Isolamento dos leucócitos no sangue periférico

Para este procedimento foi acrescentado 10mL de solução de lise 1x a cada tubo falcon com 1 mL de sangue periférico. Logo após, ocorreu a homogeneização no vórtex e incubação a 4°C para ocorrer a lise (\approx 10 minutos). Após a centrifugação por 10 minutos 2200rpm ou 800g foi observado a formação de pellet contendo leucócitos totais na lateral do fundo do tubo. Após a aspiração do sobrenadante, o pellet foi ressuscitado com 5ml de PBS +glicose 1x, homogeneizado no vórtex para o pellet se desprender e depois a centrifugação por 10 minutos a 2200rpm ou 800g. Após a formação do pellet e ressuspensão do sobrenadante, foi adicionado cerca de 500uL de Trizol, sendo jateado nas paredes do tudo Falcon. Por fim, o conteúdo foi transferido para eppendorfs e armazenados a -20°C até o momento da extração (Figura 09).



Criado com BioRender.com Fonte: Própia Autora

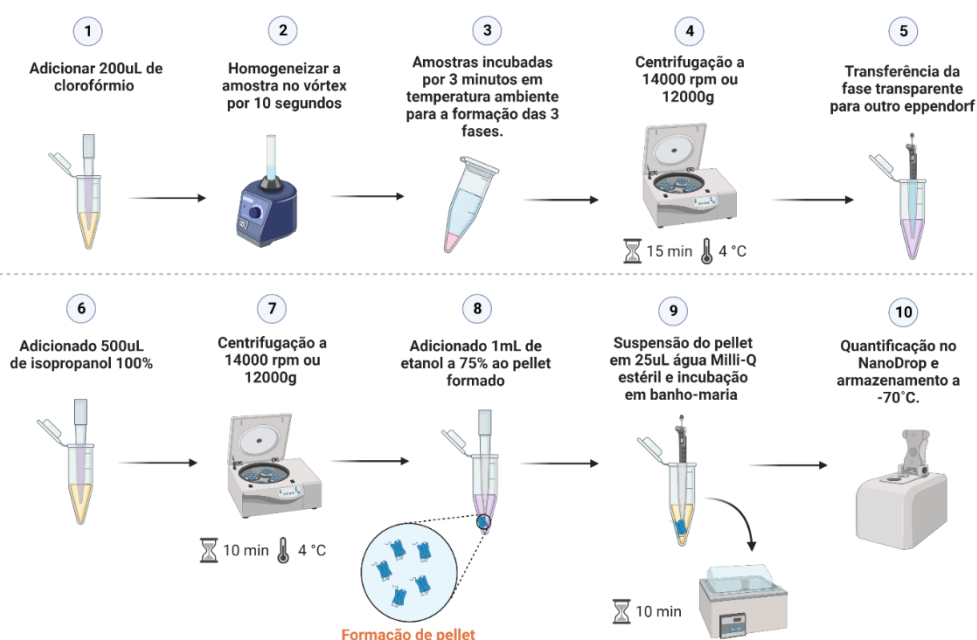
Figura 09. Isolamento de leucócitos no sangue periférico

5.11 Extração de RNA com reagente TRIzol™

Para a extração de RNA em TRIzol™ foram adicionados 200uL de clorofórmio em cada amostra. Logo após, a amostra foi homogeneizada no vórtex por 10 segundos para a obtenção de uma solução leitosa. Para a formação das três fases de solução as amostras foram incubadas na bancada por 3 minutos e logo depois centrifugadas a 14000 rpm ou 12000 g a 4°C por 15 minutos. A fase transparente foi transferida para um novo tubo de eppendorf. Foram adicionados 500uL de isopropanol 100% em cada amostra, após a homogeneização por inversão e amostras em temperatura ambiente

por 10 minutos foi realizado a centrifugação a 14000rpm ou 12000g a 4°C por 10 minutos.

Posteriormente, foi adicionado 1mL de etanol a 75% ao pellet formado. Para retirar o excesso de etanol a 75% os microtubos forma invertidos e deixados para secar por 10 minutos dentro do fluxo laminar. Seguidamente ocorreu a suspensão do pellet em 25uL de água Milli-Q estéril e incubação em banho-maria por 10 minutos. Por fim, o RNA foi quantificado no NanoDrop e logo após foi armazenado a -70°C (Figura 10).



Criado com BioRender.com Fonte: Própria autora

Figura 10. Extração de RNA dos leucócitos totais com reagente TRIzol™

5.12 Análise quantitativa e qualitativa do RNA obtido

A concentração do RNA obtido foi estabelecida por meio da análise da densidade óptica das amostras em espectrofotômetro - NanoDrop nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. O grau de pureza das amostras foi avaliado pela determinação razão de absorbância A_{260nm}/A_{280nm} . O protocolo utilizado para a extração produziu RNA com proporções A_{260nm}/A_{280nm} próximas a 2,0, sendo um indicativo da pureza do RNA.

Para análise da qualidade do RNA, utilizou-se a eletroforese em gel de agarose 1%. Com auxílio de uma espátula foi adicionado 1g de agarose (Sigma – Aldrich®) no frasco reagente graduado Schott e logo em seguida acrescentado 100 mL do tampão Tris-Ácido-Bórico-EDTA 1X e levados ao microondas por 1 minuto e quarenta segundos. Após a diluição, foi adicionado o líquido em cubas verticais de eletroforese (BioRad) e colocado no pente para a marcação dos poços. Posteriormente, foi acrescentado 5 µL de brometo de etídio no líquido e aguardado 30 minutos para a total solidificação do gel em agarose.

A amostra foi diluída com um intercalante de RNA SYBR Green na proporção de 1:4 (1µL de RNA com 100ng para 4µL do tampão de amostra). Em seguida, utilizamos 5µL do tampão de amostra para o controle negativo da corrida de eletroforese. Os géis foram submetidos à corrente de voltagem constante de 150V, 400mA por 25 minutos. As imagens dos géis contendo as moléculas de RNAs foram obtidas através de em um fotodocumentador (BioRad).

5.13 Preparo da biblioteca de cDNAs

A construção da biblioteca de cDNA foi feita a partir do mRNA extraído dos leucócitos totais com o uso do Kit SuperScript® IV Reverse Transcriptase (RT) (Invitrogen™) (Lotes: 00719351 e 2319760) de acordo com as orientações do fabricante. Para isto, usamos 3µL de RNA total de cada amostra com concentração máxima de 100ng/µL (BIOSYSTEMS,2008; BUSTIN et al. 2009). Logo em seguida, com o tubo acondicionado em gelo foram adicionados: 4µL do master mix de reação (SuperScript Villo), 3µL do RNA total e 13µL de água RNase-Free totalizando assim 20µL de reação. Logo depois, a reação foi homogeneizada e preservada a temperatura de 25°C por 10 minutos, de seguida a essa etapa a reação foi homogeneizada por mais uma vez. Posteriormente, o tubo contendo a reação foi incubado a 42°C por 60 minutos. A reação foi concluída na etapa de inativação a 85°C por 5 minutos de acordo com as orientações do fabricante. Para a síntese do cDNA utilizamos o termociclador BioRad (modelo T100).

5.14 PCR quantitativo em tempo real (RT- qPCR)

5.14.1 Primers utilizados no projeto

As sequências de primers utilizados no estudo para os genes HERVK-10 (GAG), HERVW-1 (ENV), IFNA1, IFNAR1, IFNAR2 e IL17A e para os genes de referência PSMB2, HPRT-1 e RPL19 foram desenhados tendo como bases as sequências depositadas no Gene Expression Omnibus (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) usando o Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Tabela 01).

Os primers foram diluídos de acordo com as concentrações recomendadas pelo fabricante (Exntend®). Para manter o banco de primers isento de contaminações foi preparado um banco de trabalho cuja a concentração correspondia a 400nM. Por fim, os primers foram acondicionados a -20°C até o momento uso.

Tabela 01: Sequência de nucleotídeos utilizados na PCR para a detecção da expressão gênica

Gene	Sequência de iniciadores (5'3')	Referências
HERVK-10 (GAG)	FW: GCCTTCACATATTCTGTAATT	Bhetariya; Kriesel; Fischer (2017)
	REV: GCAAGGTTGCAAGATGCAGCTC	Temerozo et al. (2022)
HERVW-1 (ENV)	FW: GTATGTCTGATGGGGGTGGAG	Balestrieri et al. (2021)
	REV: CTAGTCCTTTGTAGGGGCTAGAG	
IFNA1	FW: GCCTCGCCCTTTGCTTTACT REV: GCCTCGCCCTTTGCTTTACT	Li et al. (2021)
IFNAR1	FW: AACAGGAGCGATGAGTCTGTC REV: TGCGAAATGGTGTAATGAGTCA	Li et al. (2021)
IFNAR2	FW: GCGAGAGCTGCAAAGATGTAA REV: TCCCATGATAAGATGGACCG	Pauro-Castineira et al., (2021) Li et al. (2021)
IL17A	FW: CGGACTGTGATGGTCAACCTGA REV: GCACTTTGCCTCCCAGATCACA	Deng et al. (2018) Balestrieri et al. (2021)

Genes Normalizadores

PSMB2	FW: ATCCTCGACCGATACTACACAC REV: GAACACTGAAGGTTGGCAGAT	Wu et al. (2018)	
HPRT1	FW: ACCAGTCAACAGGGGACATAA REV: CTTTCGTGGGGTCCTTTTCACC	(Groger et al., 2020)	
RPL19	FW: ATGTATCACAGCCTCGTACCTG REV: TTCTTGGTCTCTTCCTCCTTG	(Bhetariya; Fischer, 2017)	Kriesel;

Fonte: Próprio autor.

5.14.2 Padronização dos Primers

5.14.2.1 Características dos primers e padronização do RT- qPCR

A curva de eficiência para cada primer foi determinada de acordo com as instruções do MIQE guidelines (BUSTIN *et al.*, 2009). A princípio, foram determinadas quatro concentrações para a diluição dos primers Forward – Reverse (200nM, 400nM, 600nM e 800nM) para os seguintes genes: HERVK-10, HERVW-1, IFNA1, IFNAR1, IFNAR2 e IL17A e genes referência RPL19, HPRT-1 e PSMB2. O pool contendo quatro amostras de cDNA com diluição de 1:150 e concentração de 100ng/μL foi usado para elaborar a curva padrão, para com isso avaliar a eficiência referente à amplificação da reação do ensaio de RT- qPCR.

As amostras foram realizadas em triplicatas e com controles negativos em duplicata para gene. Em seguida, colocamos 6μL do master mix SYBR Green para a amplificação dos primers, 3μL dos primers diluídos para as quatro concentrações (200nM, 400nM, 600nM e 800nM) e 3μL do pool de cDNA das amostras conforme as orientações do fabricante (Applied Biosystems). Na padronização do RT- qPCR em tempo real utilizou-se o equipamento QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com os seguintes ciclos de amplificação: 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 1 minuto a 60°C para anelamento dos primers e extensão. Posteriormente ao final de corrida das amplificações realizou-se o estágio adicional relativo à curva de dissociação (Melt curve) com o intuito de verificar a especificidade das reações.

5.14.2.2 Curva de eficiência de amplificação da Real time- PCR Quantitativa

Para o cálculo da eficiência de amplificação da reação, conforme equação: $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ utilizamos o parâmetro paralelismo entre as curvas dos genes alvo e endógeno (slope) de uma curva padrão. Em seguida, obtivemos a curva padrão pelo gráfico de regressão linear (Figuras 11 e 12), a partir dos ciclos de amplificação Ct (cycle threshold) sobre o log das diluições dos primers. O coeficiente angular da curva padrão de -3,32 aponta uma reação com 100% de eficiência ou com porcentagem da eficiência em torno de 94% a 110% (BUSTIN et al., 2009). Segundo Livak e Schmittgen (2001) são consideradas reações eficientes, as que apresentem eficiências de amplificação do gene alvo e gene endógeno muito próximas (tolerância de $\pm 10\%$ de variação). Os valores correspondentes ao slope, r^2 e porcentagem da eficiência foram demonstrados na Tabela 02.

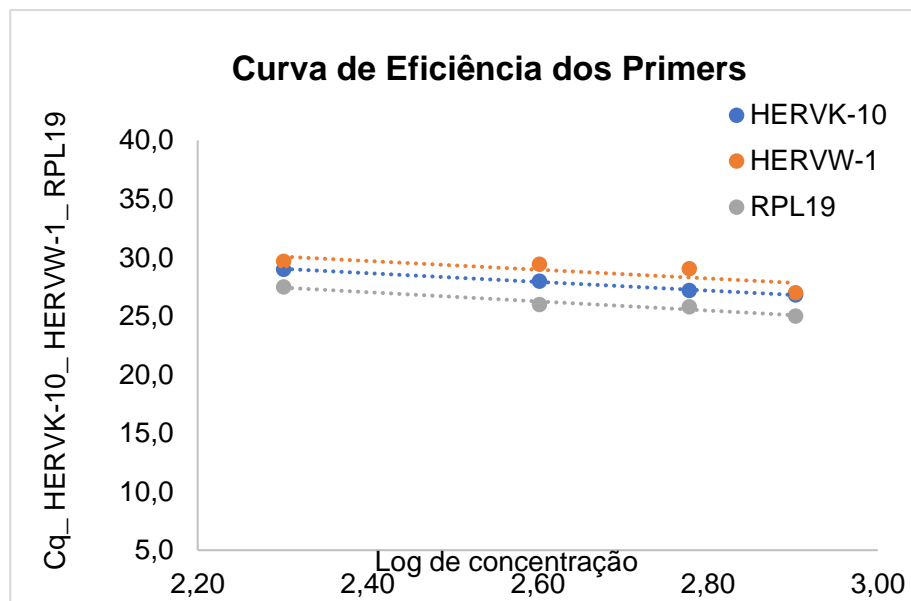


Figura 11. Curva de eficiência para o gene referência RPL19 e genes alvos HERVK-10 e HERVW-1.

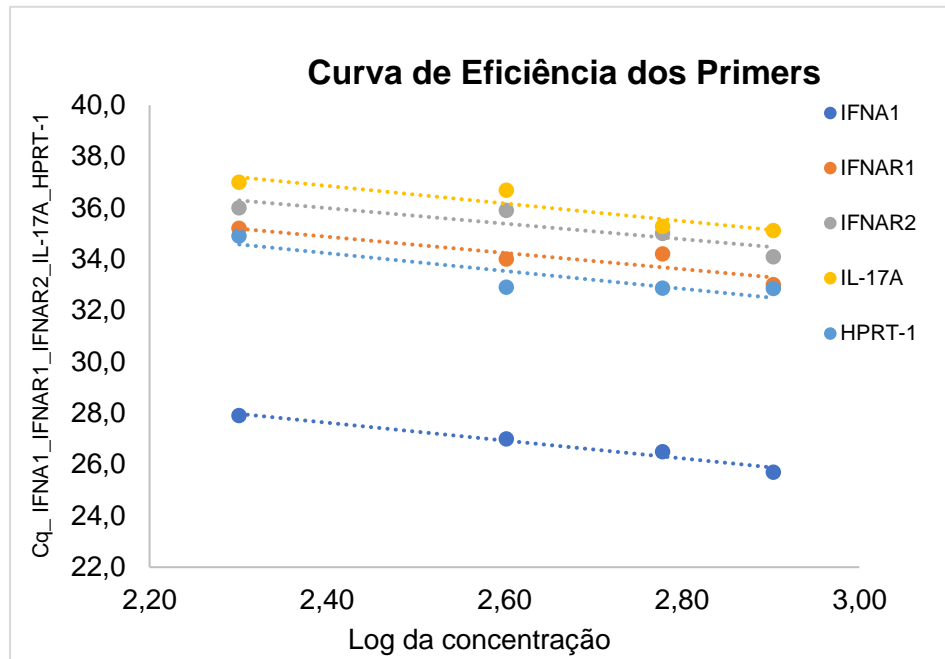


Figura 12. Curva de eficiência para o gene referência HPRT-1 e genes alvos IFNA1, IFNAR1, IFNAR2 e IL17A.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 02. Valores do slope, r^2 e eficiência da curva para os genes do estudo

Genes	Slope	R ²	Eficiência da Curva
HERVK-10	-3,71	0,99	86%
HERVW-1	-3,72	0,63	85%
IFNA1	-3,47	0,96	94%
IFNAR1	-3,15	0,83	108%
IFNAR2	-3,02	0,78	114%
IL17A	-3,45	0,79	96%
RPL19	-3,91	0,96	80%
HPRT-1	-3,45	0,76	95%

Fonte: Próprio autor.

5.14.3 Diluição e padronização das amostras de cDNA

As amostras utilizadas no estudo foram diluídas em três concentrações com o intuito de identificar contaminantes ou inibidores decorrentes do processo de extração. Inicialmente, adicionamos água livre de RNase e as amostras de cDNA em três tubos estéreis, e com isso realizamos as diluições das amostras em 1:30, 1:150 e 1:300.

Posteriormente, realizamos o experimento de RT-qPCR com os primers na concentração de 400nM e logo após analisamos os resultados de expressão gênica por meio de gráficos de regressão linear de acordo com as orientações do manual Biosystems (2008). Em seguida, procedemos com oito experimentos, dentre eles: 4 amostras do grupo grave e 4 amostras do grupo leve. A partir dos experimentos podemos concluir que as diluições de 1:300 apresentaram bastante diluição, enquanto que as diluições de 1:150 continham inibidores para as reações de RT-qPCR e oscilação concernente ao gene de referência RPL19 e HPRT-1. Portanto, para os experimentos utilizamos a diluição 1:30 (Figura 13).

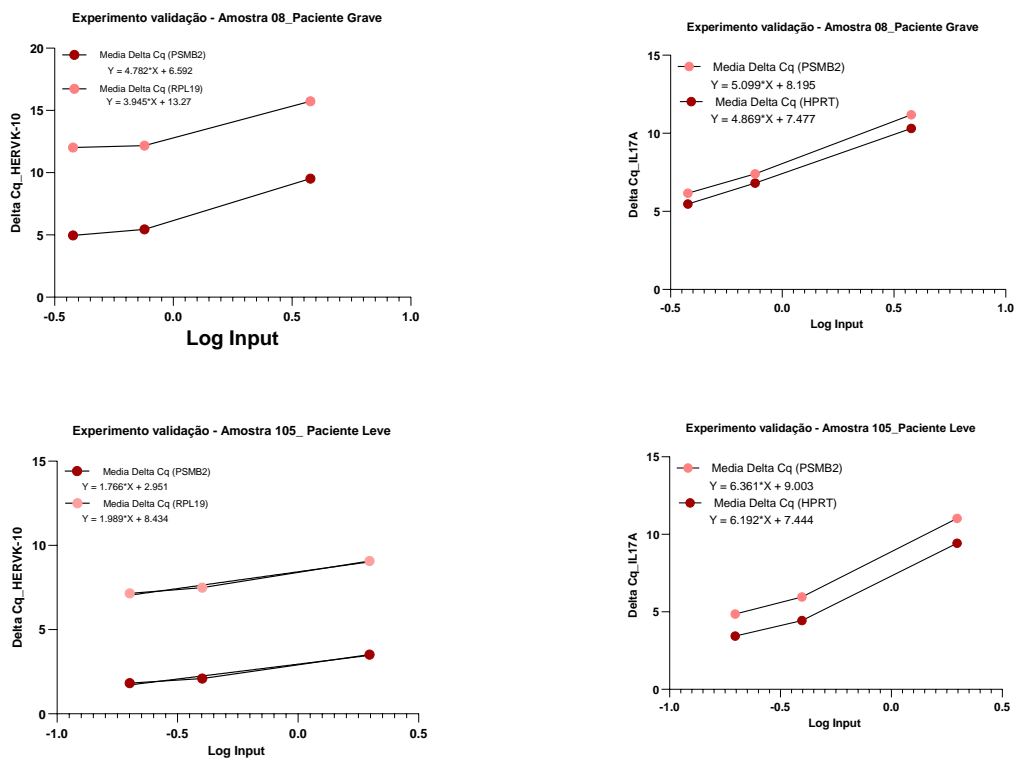


Figura 13. Regressão linear das três diluições analisadas no experimento de padronização.

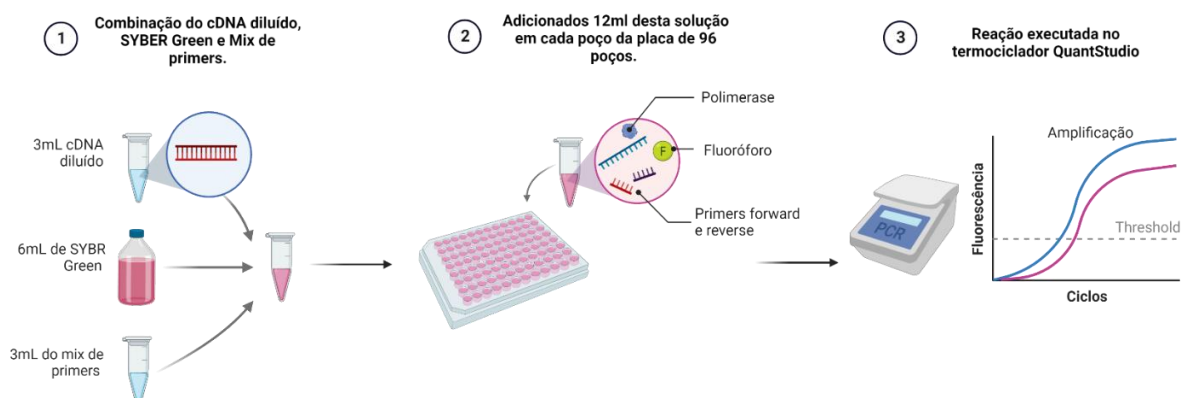
Fonte: Próprio autor.

5.15 RT- – PCR quantitativo em tempo real

Os ensaios de RT- qPCR foram executados de acordo com as instruções presentes no MIQE guidelines (BUSTIN *et al.* 2009). A princípio, selecionamos 20 pacientes com o desfecho grave e 20 pacientes com o desfecho leve, sendo todas as amostras em replicatas técnicas. Após o pareamento das amostras por sexo e idade foram realizadas as extrações do RNA.

Em seguida, foram adicionados 6µL do master mix SYBR Green, 3 µ L do mix de primers e 3 µ L do cDNA de cada amostra conforme as recomendações do fabricante (Applied Biosystems). A seguir, reação foi executada no termociclador QuantStudio™ 5 Real-Time (AppliedBiosystems™) tendo como etapa inicial o ciclo de 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C e seguido de 40 ciclos nas seguintes condições: 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C para anelamento dos primers e extensão (Figura 08). Com o final dos ciclos das amplificações realizou-se o estágio adicional referente à curva de dissociação (Melt curve) com o intuito de verificar a especificidade das reações. Todas as reações de RT- qPCR foram realizadas em duplicatas biológicas.

Seguidamente à amplificação das amostras, os cálculos da expressão diferencial foram realizados por um programa específico de análise de dados. Os genes com valores de ciclo *threshold* (Ct) acima de 35 foram considerados não expressos. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método de $2^{-\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) (Figura 14).



Criado com BioRender.com Fonte: Própria autora

Figura 14. Análise da expressão gênica por meio do RT-qPCR

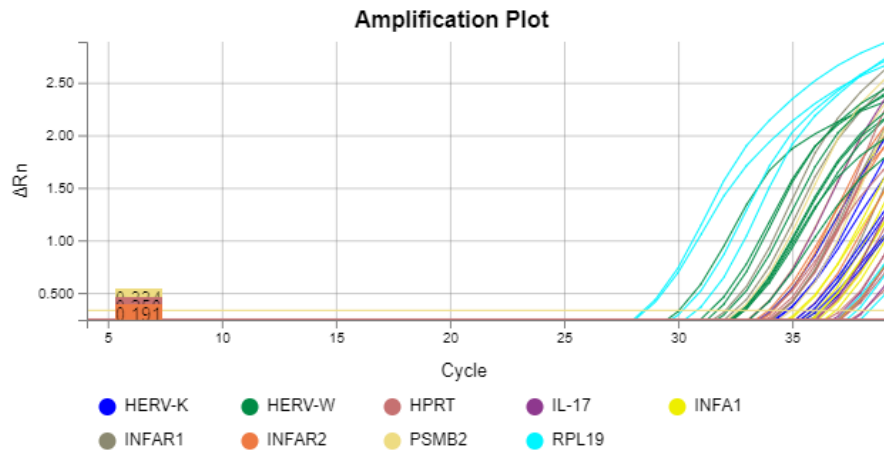
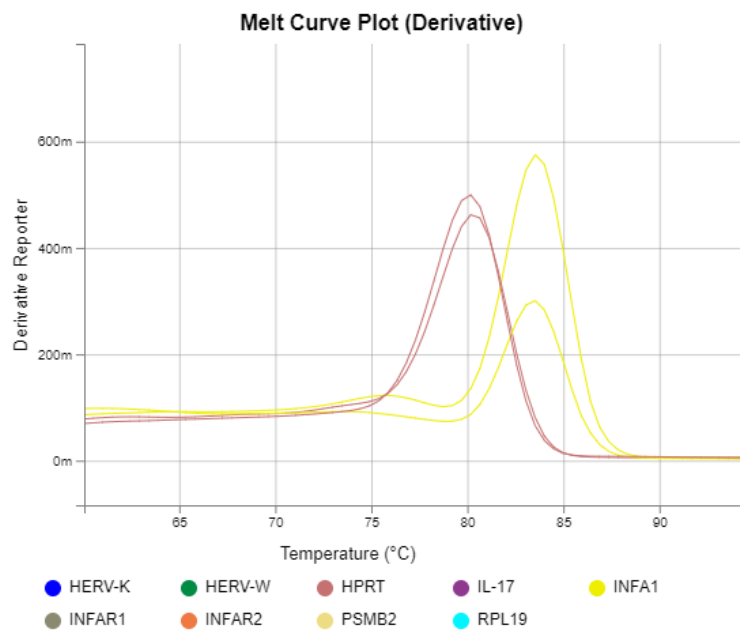


Figura 15. Curva de amplificação para os genes alvo e referência.

5.15.1. Análise da curva de Melting

Analizamos a curva de Melting logo após a amplificação dos genes alvos com o intuito de verificar o desanelamento dos primers em uma temperatura ótima específica permitindo assim avaliar se contaminantes foram amplificados juntos ao primer alvo (BIOSYSTEMS,2008) (Figura 16A e 16B).

A



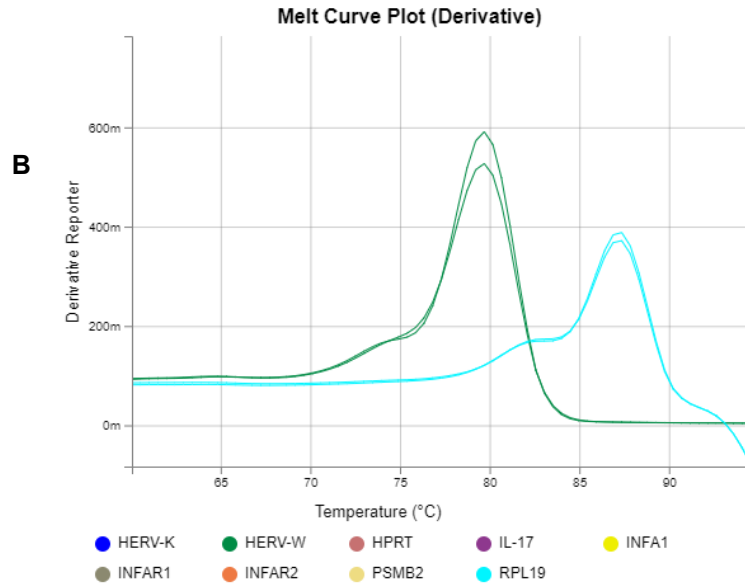


Figura 16. Curva de dissociação em duplicata: (a) Gene alvo IFNA1 e gene referência HPRT-1 (b) Gene alvo HERVW-1 e gene referência RPL10.

5.16 Ensaio de absorção imunoenzimático (ELISA)

Para o ensaio de absorção imunoenzimático (ELISA) usamos o Kit Human IFN gamma Uncoated ELISA de acordo com as orientações do fabricante (Invitrogen™). O princípio do método consistia no ELISA sanduíche.

As placas de microtitulação de poliestireno de fundo plano, não estéreis, de 96 cavidades (Coat Corning™ Costar™) foram sensibilizadas com 100 µL do anticorpo de captura diluído em tampão de revestimento sendo incubada a 4°C por overnight em câmara úmida. Após essa etapa de incubação, a solução de sensibilização foi descartada e a placa lavada 3 vezes – adicionando em cada poço 300µL- de tampão de lavagem (PBS Tween). Em seguida, realizou-se o bloqueio da placa com a adição de 200µL de diluente ELISA/ELISPOT (1x) por poço e foi incubado a temperatura ambiente por 1 hora.

Após a incubação, a solução bloqueio foi descartada e a placa foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem PBS Tween. A seguir foi adicionado 100µL de amostra por poço e 100µL do diluente ELISA/ELISPOT (1x) no poço correspondente ao branco e foi realizado as diluições seriadas do padrão diretamente na placa. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 2 horas. Após o tempo de incubação, as

amostras foram descartadas e lavadas 5 vezes com tampão de lavagem (PBS Tween). Seguidamente foi adicionado 100µL do anticorpo de detecção diluído por poço e incubado por 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente ao tempo de incubação, descartou-se o conjugado e a placa lavada por 5 vezes com PBS Tween. Em seguida, foram acrescentados 100µL de HRP- avidina diluída por poço e incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. As placas foram lavadas 7 vezes com tampão de lavagem PBS Tween e novamente incubadas com 100µL de TMB (1x) e incubadas em local escuro por 15 minutos.

A reação enzimática foi interrompida acrescentando-se 50µL de solução de parada e a intensidade da coloração foi quantificada em leitor de placas... com comprimento de onda de 450nm. Em cada teste foi feito um “branco” da reação, este constitui-se da reação sem a presença da amostra para observar a reatividade de fundo (back-ground) da reação.

5.17. Cálculo dos marcadores inflamatórios baseados em células sanguíneas

As proporções das células inflamatórias em nosso estudo foram calculadas de acordo com as fórmulas abaixo:

5.17.1. Índice agregado de inflamação sistêmica (AISI):

Para o cálculo do AISI foram utilizadas as contagens das seguintes células:

$$\text{AISI: } \frac{\text{neutrófilos X monócitos X plaquetas}}{\text{linfócitos}}$$

5.17.2. Índice de imuno-inflamação sistêmica (SII)

O cálculo das células periféricas relacionadas à inflamação medidas em exames de sangue foram calculadas da seguinte forma:

SII: contagem de plaquetas X contagem de neutrófilos
contagem de linfócitos

5.17.3. Índice combinado de SII e concentração de hemoglobina (SII/Hb)

Para o cálculo do índice SII/Hb foram consideradas as contagens das seguintes células:

SII/Hb: neutrófilos X plaquetas
linfócitos X hemoglobina

5.18 Análise de dados

A normalidade dos dados foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk. As comparações foram realizadas com o teste t de Student para distribuições paramétricas, o teste Mann-Whitney U e o Teste Qui-quadrado de Pearson foram usados para dados com distribuição não paramétrica. Para predizer os desfechos clínicos, avaliamos as características operacionais do receptor (curva ROC), com cálculo da área sobre a curva (AUC) e intervalo de confiança (IC 95%). Os dados foram tabulados em Excel e analisados nos seguintes softwares: GraphPad Software v.8 (GraphPad Prism) e Statistical Package for the Social Science for Windows (SPSS V.25). Os resultados serão considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização dos aspectos clínicos-epidemiológicos dos pacientes com COVID-19

As características clínicas e epidemiológicas da amostra estudada são apresentadas abaixo na Tabela 03. Trata-se de um estudo com 117 pacientes de ambos os sexos e positivos para SARS-CoV-2, sendo 59 pacientes categorizados no grupo leve e 58 pacientes no grupo grave. Como primeira variável, os resultados relacionados a idade indicaram que a mediana para o grupo leve correspondeu a 39 (29-54) anos, enquanto a mediana para o grupo grave foi de 62 (50-74,5) anos.

Tabela 03. Dados clínicos-epidemiológicos dos pacientes com COVID-19

Variáveis	Todos os pacientes (n=117)	Grupo grave (n=58)	Grupo leve (n=59)	Valor de p ^{a b}	Odds ratio	IC 95%
Idade (anos)^a	51 (36-68)	62 (50-74,5)	39 (29-54)	0,0001		
Sexo (%)^b					2,77	1,2-5,9
Masculino	62 (53%)	38 (65,5%)	24 (40,7%)			
Feminino	55 (47%)	20 (34,5%)	35 (59,3%)	0,007		
Sintomas (%)^b						
Tosse seca	73 (62,4%)	38 (65,5%)	35 (59,3%)	0,489	1,3	0,6 - 2,7
Tosse produtiva	9 (7,7%)	4 (6,9%)	5 (8,5%)	0,749	0,8	0,2 - 2,8
Dispneia	52 (44,4%)	39 (67,2%)	13 (22%)	0,0001	7,2	3,2 - 15,5
Febre	58 (49,6%)	37 (63,8%)	21 (35,6%)	0,002	3,1	1,4 - 6,9
Fadiga/Mialgia	60 (51,3%)	17 (29,3%)	43 (72,9%)	0,0001	0,1	0,0 - 0,3
Comorbidades (%)^b						
Hipertensão Arterial	35 (29,9%)	23 (39,7%)	12 (20,3%)	0,023	2,5	1,1 - 5,6
Diabetes Mellitus	30 (25,6%)	27 (46,6%)	3 (5,1%)	0,0001	16,2	4,8 - 53,0
Doença Cardiovascular	29 (24,8%)	27 (46,6%)	2 (3,4%)	0,0001	24,8	5,8 - 108,9
Doença Renal	11 (9,4%)	9 (15,5%)	2 (3,4%)	0,025	5,2	1,2 - 24,7
Obesidade	28 (24%)	15 (25,8%)	13 (22%)	0,568	1,2	0,5- 3,0
COPD	14 (23,2%)	8 (12,1%)	6(10,2%)	0,561	1,4	0,2 - 2,3

Nota: A variável contínua foi apresentada em mediana e intervalo interquartil com a aplicação do Teste U de Mann-Whitney. Variáveis categóricas foram apresentadas em números absolutos (percentuais) com a aplicação do teste Qui-Quadrado de Pearson. Nível de significância é $p < 0,05$. **Legenda:** DPOC: Doença Pulmonar Crônica Obstrutiva. Fonte: Próprio autor.

A amostra estudada demonstrou predominância de participantes do sexo feminino (59,3%) no grupo leve, enquanto no grupo grave, cerca de 65,5% dos pacientes eram do sexo masculino. Ao avaliar a medida de associação Odds Ratio foi possível verificar que pertencer ao sexo masculino aumentou em 2,77 vezes a chance da COVID-19 ser grave.

Acerca dos principais sintomas primários relatados no grupo leve observamos que 59,3% dos pacientes apresentaram tosse seca, (8,5%) tosse produtiva, dispneia (22%), febre (35,6%) e (72,9%) fadiga/mialgia. Em nossa análise, com relação aos pacientes com COVID-19 grave verificou-se que 65,5% demonstraram tosse seca, (6,9%) tosse produtiva, (67,2%) dispneia, (63,8%) febre e (29,3%) fadiga e mialgia. Esses resultados indicam que sintomas, a exemplo tosse seca, dispneia, febre e fadiga/mialgia foram mais prevalentes na amostra estudada.

Nesta casuística, em relação as comorbidades foi possível identificar que a hipertensão arterial (39,7%), diabetes mellitus (46,6%) e doenças cardiovasculares (46,6%) foram mais frequentes em pacientes graves quando comparados aos pacientes leves ($p < 0,05$). Não houve significância entre o percentual da obesidade ($p = 0,568$) e da doença pulmonar obstrutiva crônica ($p = 0,561$).

6.2. Análise dos dados hematológicos dos pacientes com COVID-19

6.2.1 Análise do eritrograma

Os dados do eritrograma dos pacientes graves e leves estão demonstrados na tabela 04. Foi possível observar que a contagem de hemácias ($3,08 \pm 0,98$ vs $5,65 \pm 1,14$, $p < 0,0001$) e o valor de hemoglobina (12,5 [IQR: 9,0 – 14,2] vs 16,4 [IQR: 14,2 – 18,5], $p < 0,0001$) em pacientes com curso mais grave da COVID-19 apresentavam-se significativamente menores, quando comparadas aos pacientes leves.

A análise dos resultados do hematócrito (Tabela 04) indicou um menor valor percentual de hematócrito nos pacientes graves quando comparamos aos pacientes com a forma leve da doença (35,6 [IQR: 27,9 – 39,1] vs 55,2 [IQR: 46,7 – 61,3]; $p < 0,0001$).

Os pacientes com COVID-19 grave também apresentaram níveis mais elevados do volume globular médio (VGM) ($87,1 \pm 7,0$ vs $96 \pm 6,9$, $p < 0,0001$) e concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) ($34,1$ [IQR: $32,8 - 35,5$] vs 30 [IQR: $29,4 - 30,6$]; $p < 0,0001$). Conforme mostrado na Tabela 04, não observamos diferença significativa com relação a hemoglobina corpuscular média (HCM) ($29,5 \pm 2,34$ vs $29,3 \pm 1,42$, $p = 0,578$) e a amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW) ($14,8$ [IQR: $13,3 - 15,8$] vs 14 [IQR: $13,2 - 14,4$], $p = 0,53$).

6.3. Análise do leucograma e plaquetograma dos pacientes com COVID-19

Os dados da tabela 04 demonstraram o aumento significativo na contagem de leucócitos totais ($13080,0$ [IQR: $9360,0 - 18520,0$] vs $6760,0$ [IQR: $5382,5 - 7850,0$]; $p < 0,0001$) e neutrófilos ($11588,8$ [IQR: $6888,0 - 16702,5$] vs $3670,0$ ($2527,5 - 4460,0$); $p < 0,0001$) comparando os pacientes do grupo grave ao grupo leve. A contagem de eosinófilos foi significativamente menor nos pacientes acometidos pelos sintomas graves em comparação com os pacientes leves ($0,00$ [IQR: $0,0 - 52$] vs 150 [IQR: $62,5 - 167,5$]; $p < 0,0001$). Não houve significância na contagem dos basófilos ($13,5$ [IQR: $0,00 - 33,4$] vs 20 [IQR: $10 - 30$]; $p = 0,157$).

A contagem dos linfócitos foi consideravelmente menor em pacientes graves quando comparados com pacientes com sintomas leves ($966,28$ [IQR: $611,0 - 1488,2$] vs 2145 [IQR: $1832,5 - 2787,5$]; $p < 0,0001$) (Tabela 04). Não observamos significância na contagem dos monócitos entre os grupos graves e leves acometidos pela COVID-19 (526 [IQR: $290,7 - 1065$] vs 475 [IQR: $342,5 - 665$]; $p = 0,661$).

Em relação as plaquetas os resultados apontaram que a contagem de plaquetas foi significativamente maior em pacientes com sintomas graves do que naqueles com sintomas leves por COVID-19 ($316,5 \pm 112,3$ vs $229,2 \pm 51,1$, $p < 0,0001$) (Tabela 04).

Tabela 04. Marcadores laboratoriais de pacientes internados e ambulatoriais com COVID-19

Variáveis	Grupo grave (n= 39)	Grupo Leve (n= 28)	Valor de p
Hemácias (10 ⁶) ^a	3,08 ± 0,98	5,65 ± 1,14	<0,0001
Hemoglobina (g/dL) ^b	12,5 (9,0 – 14,2)	16,4 (14,2 – 18,5)	<0,0001
Hematócrito (%) ^b	35,6 (27,9 – 39,1)	55,2 (46,7 – 61,3)	<0,0001
VGM (fL) ^a	87,1 ± 7,06	96 ± 6,9	<0,0001
HGM (pg) ^a	29,5 ± 2,34	29,3 ± 1,42	p = 0,578
CHCM (g/dL) ^b	34,1 (32,8 – 35,5)	30 (29,4 – 30,6)	<0,0001
RDW (%) ^b	14,8 (13,3 – 15,8)	14 (13,2 – 14,4)	p = 0,53
Leucócitos Totais 10 ³ /μL ^b	13080,0 (9360,0 – 18520,0)	6760,0 (5382,5 – 7850,0)	<0,0001
Neutrófilos 10 ³ /μL ^b	11588,8 (6888,0 – 16702,5)	3670,0 (2527,5 – 4460,0)	<0,0001
Eosinófilos 10 ³ /μL ^b	0,00 (0,0 - 52)	150 (62,5 – 167,5)	<0,0001
Basófilos 10 ³ /μL ^b	13,5 (0,00 – 33,4)	20 (10 - 30)	p = 0,157
Linfócitos 10 ³ /μL ^b	966,28 (611,0 – 1488,2)	2145 (1832,5 – 2787,5)	<0,0001
Monócitos 10 ³ /μL ^b	526 (290,7 - 1065)	475 (342,5 - 665)	p = 0,661
Plaquetas 10 ³ /μL ^b	316,5 ± 112,3	229,2 ± 51,1	<0,0001

(a) Variáveis de distribuição paramétrica, teste t de Student. (b) Variáveis não paramétricas, teste U de Mann-Whitney (b). O nível de significância é p<0,05. VGM: Volume Corpuscular Médio. HGM: Hemoglobina corpuscular média. CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular. RDW: Razão Média de Distribuição de Eritrócitos.

6.4. Relação neutrófilo-linfócito (RNL) e relação plaqueta- linfócito (RPL) como prognóstico para a gravidade da COVID-19

Diante destes resultados, calculamos a relação neutrófilo-linfócito (RNL) e a relação plaqueta-linfócito (RPL) e testamos a provável associação com a gravidade em pacientes acometidos pela COVID-19. A partir dos dados, pode-se observar que a RNL dos pacientes graves foi significativamente maior do que a RNL dos pacientes com a forma leve da doença (10 [IQR: 6,50 -20,5], vs 1,59 [IQR:1,22 -2,32], p<0,0001). Além disso, observamos que cerca de 87,2% pacientes do grupo grave apresentaram RNL ≥ 5 já no primeiro dia de internação (p <0,001) (Tabela 05).

Na Tabela 06, verificamos que o valor referente ao RPL foi significativamente maior em pacientes graves quando comparados aos pacientes leves (0,29 [IQR: 0,21-0,52] vs 0,10 (0,07- 0,13), $p < 0,0001$). Ademais, o RPL nos revelou que cerca de 76,9% dos pacientes com a forma grave da doença demonstraram $RPL \geq 0,20$ em tratamento na unidade de terapia intensiva ($p < 0,001$).

Tabela 05. Relação neutrófilo-linfócito em pacientes com COVID-19

	Todos os pacientes (N= 67)	Grupo grave (N=39)	Grupo leve (N=28)	Valor de p
RNL	4,36 (1,77 -12,4)	10 (6,50 -20,5)	1,59 (1,22 -2,32)	p <0,001
≥ 5	34 (50,7%)	34 (87,2%)	0 (0,0%)	p <0,001
<5	33 (49,3%)	5 (12,8%)	28 (100%)	

(a) Os dados são apresentados como mediana e intervalos interquartis, n (%), onde N corresponde ao número total de pacientes com dados disponíveis. (b) Os valores de p comparando pacientes graves a pacientes leves foram do teste Qui-quadrado, teste exato de Fisher ou teste U de Mann-Whitney. O nível de significância é $p < 0,05$. RNL: razão neutrófilo-linfócito.

Tabela 06. Relação plaqueta-linfócito em pacientes com COVID-19

	Todos os pacientes (N= 67)	Grupo grave (N=39)	Grupo leve (N=28)	Valor de p
RPL	0,18 (0,10 -0,33)	0,29 (0,21 -0,52)	0,10 (0,07- 0,13)	p <0,001
≥ 0,20	34 (50,7%)	30 (76,9%)	3 (10,7%)	p <0,001
<0,20	33 (49,3%)	9 (23,1%)	25 (89,3%)	

(a) Os dados são apresentados como mediana e intervalos interquartis, n (%), onde N corresponde ao número total de pacientes com dados disponíveis. (b) Os valores de p comparando pacientes graves a pacientes leves foram do teste Qui-quadrado, teste exato de Fisher ou teste U de Mann-Whitney. O nível de significância é $p < 0,05$. RPL: razão plaqueta-linfócito.

6.5. Índice de imuno-inflamação sistêmica (SII), Índice agregado de inflamação sistêmica (AISI) e Índice de imuno-inflamação sistêmica e concentração de hemoglobina (SII/Hb)

Ainda com relação aos marcadores laboratoriais, calculamos os seguintes índices: índice de imuno-inflamação sistêmica (SII), índice agregado de inflamação sistêmica (AISI) e índice de imuno-inflamação sistêmica e concentração de

hemoglobina (SII/Hb) como possíveis ferramentas para o prognóstico da COVID-19. De acordo com os dados, observamos que o SII foi significativamente maior nos pacientes com a forma grave da doença quando comparados com a forma leve da doença (2605,76 [IQR:1984,96 – 4801,80] vs 372,52 [IQR:251,72 – 526,75], $p < 0,001$). Identificamos também que cerca de 89,7% dos pacientes do grupo grave indicaram $SII \geq 1248$ ($p < 0,001$) (Tabela 07).

Com relação ao índice agregado de inflamação sistêmica (AIS) observamos que o valor foi significativamente maior em pacientes com sintomas graves quando comparados aos pacientes com sintomas leves (1655,10 [IQR: 843,23 – 2777,09] vs (213 [IQR: 107,63 – 309,86], $p < 0,001$). Além disso, o AIS indicou que cerca de 41% dos pacientes do grupo grave apresentaram $AIS \geq 1824$ na admissão em unidade de terapia intensiva ($p < 0,001$) (Tabela 08).

Os dados da Tabela 09 indicam diferença significativa do índice de imuno-inflamação sistêmica e concentração de hemoglobina (SII/Hb) entre os pacientes com graves e leves com COVID-19 (294,83 [IQR: 155,62 – 632,07] vs 24,05 [IQR: 14,18 – 32,86], $p < 0,001$). Verificamos também que o SII/Hb evidenciou que 89,7% dos pacientes do grupo grave demonstraram resultados ≥ 103.8 ($p < 0,001$).

Tabela 07. Índice de imuno-inflamação sistêmica (SII) em pacientes com COVID-19

	Todos os pacientes (N= 67)	Grupo grave (N=39)	Grupo leve (N=28)	Valor de p
SII	1460,12 (409,03 - 3381,71)	2605,76 (1984,96 - 4801,80)	372,52 (251,72 - 526,75)	$p < 0,001$
≥ 1248	35 (52,2%)	35 (89,7%)	0 (0,0%)	$p < 0,001$
<1248	32 (47,8%)	4 (10,3%)	28 (100%)	

(a) Os dados são apresentados como mediana e intervalos interquartis, n (%), onde N corresponde ao número total de pacientes com dados disponíveis. (b) Os valores de p comparando pacientes graves a pacientes leves foram do teste Qui-quadrado, teste exato de Fisher ou teste U de Mann-Whitney. O nível de significância é $p < 0,05$. SII: Índice de imuno-inflamação sistêmica.

Tabela 08. Índice agregado de inflamação sistêmica (AISI) em pacientes com COVID-19

	Todos os pacientes (N=67)	Grupo grave (N=39)	Grupo leve (N=28)	Valor de p
AISI	577,03 (227,05-1818,77)	1655,10 (843,23 - 2777,09)	213 (107,63 - 309,86)	p <0,001
≥ 1824	16 (23,9%)	39 (41%)	0 (0,0%)	p <0,001
<1824	51 (76,1%)	23 (59%)	28 (100%)	

(a) Os dados são apresentados como mediana e intervalos interquartis, n (%), onde N corresponde ao número total de pacientes com dados disponíveis. (b) Os valores de p comparando pacientes graves a pacientes leves foram do teste Qui-quadrado, teste exato de Fisher ou teste U de Mann-Whitney. O nível de significância é $p < 0,05$. AISI: Índice agregado de inflamação sistêmica.

Tabela 09. Relação SII/Hb em pacientes com COVID-19

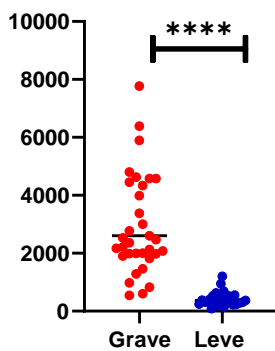
	Todos os pacientes (N= 67)	Grupo grave (N=39)	Grupo leve (N=28)	Valor de p
SII/Hb	140,77 (27,52 - 318,35)	294,83 (155,62 - 632,07)	24,05 (14,18 - 32,86)	p <0,001
≥ 103.8	35 (52,2%)	35 (89,7%)	0 (0,0%)	p <0,001
<103.8	32 (47,8%)	4 (10,3%)	28 (100%)	

(a) Os dados são apresentados como mediana e intervalos interquartis, n (%), onde N corresponde ao número total de pacientes com dados disponíveis. (b) Os valores de p comparando pacientes graves a pacientes leves foram do teste Qui-quadrado, teste exato de Fisher ou teste U de Mann-Whitney. O nível de significância é $p < 0,05$. SII/Hb: Índice de imuno-inflamação sistêmica e concentração de hemoglobina.

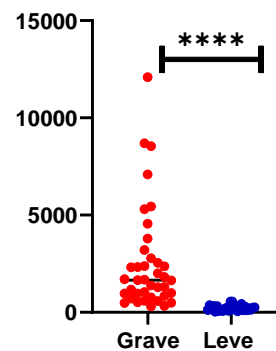
6.6. Comparação dos níveis de marcadores inflamatórios como prognóstico para a COVID-19

Com o agravamento da COVID-19, a comparação dos perfis hematológicos demonstrou o aumento notavelmente dos índices SII (4400 ± 3898 vs $419,7 \pm 238,6$, $p < 0,0001$), AISI (2531 ± 2652 vs $220,2 \pm 142$, $p < 0,0001$) e SII/Hb ($417,9 \pm 372,4$ vs $27,47 \pm 19,36$, $p < 0,0001$) em pacientes com COVID-19 grave quando comparados aos pacientes com a forma leve da doença (Figura 11).

Índice de imuno-inflamação sistêmica - SII



Índice agregado de inflamação sistêmica (AISI)



Índice de imuno-inflamação sistêmica e concentração de hemoglobina SII/Hb

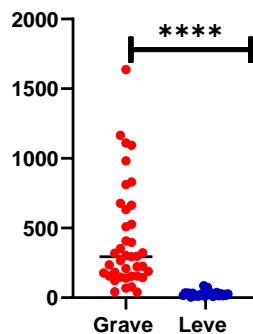


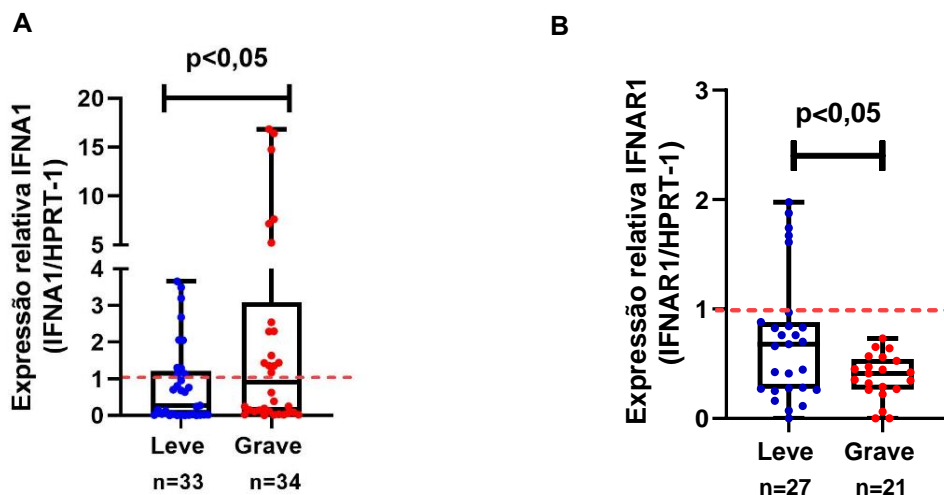
Figura 17. Comparação dos índices SII, AISI e SII/Hb entre pacientes com COVID-19

6.7 Análise da expressão gênica por meio do RT- qPCR

6.7.1 Pacientes com COVID-19 grave produzem maiores níveis de IFNA1, IFNAR1 e IL17A

Logo em seguida, buscamos avaliar a expressão de genes pró-inflamatórios, genes virais endógenos e genes de referência nos grupos grave e leve acometidos pela COVID-19. Analisamos se os genes HERVK-10, HERVW-1, IFNA1, IFNAR1, IFNAR2 e IL17A apresentavam maior expressão nos grupos avaliados em relação aos genes de referência RPL19 e HPRT-1. Encontramos expressão relativa significativamente maior do gene IFNA1 no grupo grave do que no grupo leve em comparação ao gene de referência HPRT-1 (0,8 [IQR: 0,0 – 3,0] vs 0,2 [IQR: 0,0 – 1,2]; $p < 0,05$) (Figura 18A). Com relação ao receptor IFNAR1 verificamos maior expressão relativa em pacientes com a forma leve da doença do que em pacientes graves em comparação ao gene de referência HPRT-1 (0,4 [IQR: 0,2 – 0,5] vs 0,6 [IQR: 0,2 – 0,8] $p < 0,05$) (Figura 18B). Não houve significância na expressão relativa do receptor INFAR2 (0,0 [IQR: 0,0 – 0,1] vs 0,01 [IQR: 0,0 – 0,3], $p = 0,22$) (Figura 18C).

Os resultados apontaram que os níveis de expressão relativa da IL17A foram significativamente maiores em pacientes com sintomas graves do que naqueles com sintomas leves por COVID-19 em comparação com o gene de referência HPRT-1 (0,2 [IQR: 0,0 – 0,9] vs 0,03 [IQR: 0,0 – 0,2], $p < 0,001$) (Figura 18D).



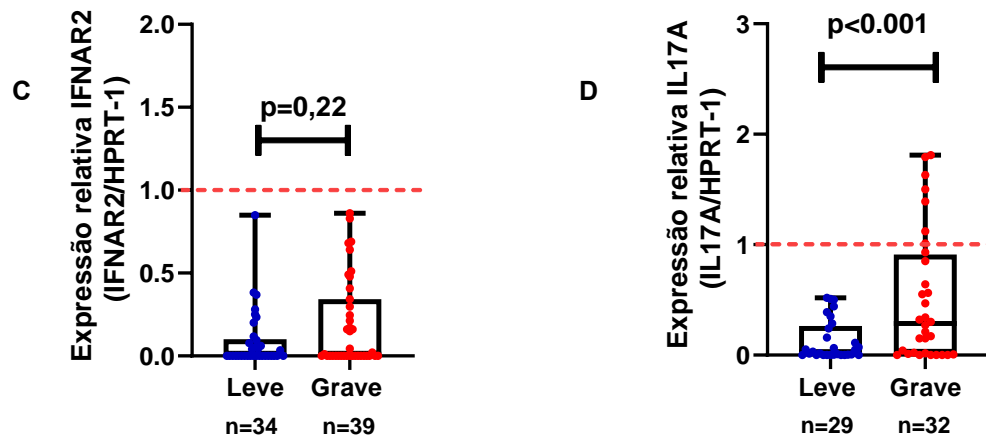


Figura 18. (a) Expressão relativa do IFNA1 e receptores IFNAR1 e INFAR2, IL17A em relação ao gene de referência HPRT-1. A linha tracejada corresponde a expressão do gene referência HPRT-1. (b) Os dados são apresentados como boxplots de Tukey e valores individuais. (c) O teste não paramétrico de Mann - Whitney foi usado para comparar os grupos. O nível de significância é $p < 0,05$ e $p < 0,001$. INFA1 -: Interferon tipo 1. IFNAR1: Receptor de interferon tipo 1. IFNAR2: Receptor de interferon tipo 2.

6.7.2 Avaliação dos Retrovírus Endógeno Humano HERVK-10 e HERVW-1 e sua relação com a progressão da COVID-19

Buscamos avaliar se os retrovírus endógenos humanos HERVK-10 e HERVW-1 estavam associados a gravidade da COVID-19. Os resultados mostraram que diferenças significativas foram observadas nos níveis expressão relativa do HERVW-1 entre os grupos grave e leve em comparação ao gene de referência RPL19 (0,03 [IQR: 0,0015 – 0,44] vs 0,003 [IQR: 0,001 – 0,018], $p < 0,05$) (Figura 19A). A análise da expressão relativa do HERVK-10 em comparação com o gene referência RPL19 não demonstrou significância entre os grupos (0,01 [IQR: 0.0 – 0.02] vs 0,01 [IQR: 0.0 – 0.03], $p = 0,90$) (Figura 19B).

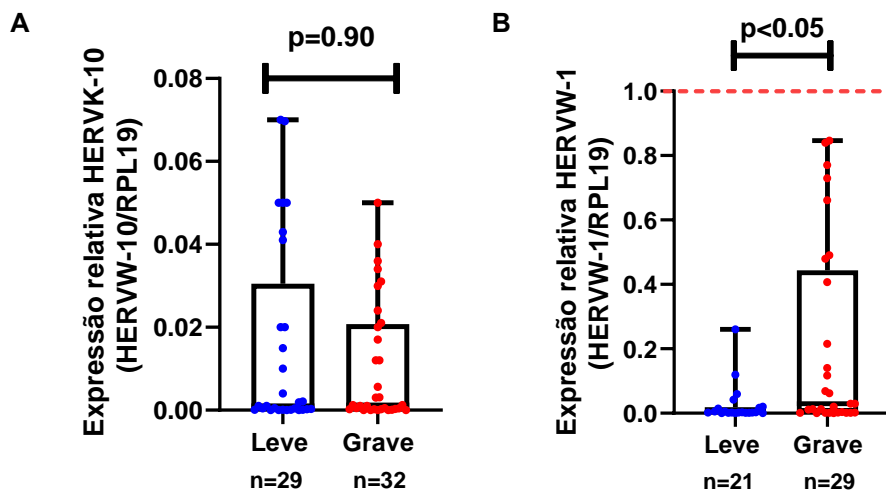


Figura 19. (a) Expressão relativa do retrovírus endógeno humano HERVW-1 e HERVK-10 em relação ao gene de referência RPL19. A linha tracejada corresponde a expressão do gene referência HPRT-1. (b) Os dados são apresentados como boxplots de Tukey e valores individuais. (c) O teste não paramétrico de Mann - Whitney foi usado para comparar os grupos. O nível de significância é $p < 0,05$ e $p < 0,001$. HERVK-10: Retrovírus Endógeno Humano K. HERVW-1: Retrovírus Endógeno Humano W.

6.8. AUC para RNL, RPL e genes IFNA1, IFNAR1, IL17A e HERVW-1 na previsão da gravidade em pacientes com COVID-19

A validade do teste diagnóstico do RNL, RPL e genes IFNA1, IFNAR1, IL17A e HERVW-1 foi analisada para a previsão da gravidade em pacientes com COVID-19 por meio da curva ROC. A análise ROC mostrou que a área sob a curva (AUC) para RNL (AUC: 0,97) e RPL (AUC: 0,89) era superior a 0,7 (Figura 20A). Além disso, estimamos os valores de corte de 5 para NLR (sensibilidade: 96,4%, especificidade: 94,8%, $p < 0,0001$) e 0,20 para RPL (sensibilidade: 92,8%, especificidade: 76,9%, $p < 0,0001$) para diferenciar entre pacientes graves e leves (Tabela 10).

Tabela 10. Análise de NLR e PLR usada para prever a gravidade do COVID-19

Parâmetros	AUC	Ponto de corte	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Valor de p
RNL	0,978	3,24	96,4	94,8	$p < 0,0001$
RPL	0,896	0,20	92,8	76,9	$p < 0,0001$

Abreviações: AUC, área sob a curva; COVID-19, doença de coronavírus 2019; NLR, razão neutrófilo-linfócito; PLR, razão plaqueta-linfócito.

Na Figura 20, a análise da curva ROC para os genes IFNA1 (AUC = 0,642 [IC 95%: 0,5 – 0,7, sensibilidade = 81,8 %, especificidade = 47%, $p = 0,044$), IFNAR1 (AUC = 0,676 [IC 95%: 0,5 – 0,8, sensibilidade = 55,5%, especificidade = 95,2%, $p = 0,0343$), IL17A (AUC = 0,699 [IC 95%: 0,5 – 0,8], sensibilidade = 100%, especificidade = 37,5%, $p < 0,05$) e HERVW-1 (AUC= 0,673 [IC 95%: 0,5 – 0,8], sensibilidade 90,4%, especificidade = 44,8%, $p = 0,0377$) apontou AUC abaixo de 0,7. Os pontos de corte relacionados ao gene para HERVW-1, IL17A, IFNAR1 e IFNA1 foram 0,061, 0,53, 0,65 e 1,32, respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11. Análise de HERVW-1, IL17A, INFAR1 e INFNA1 para prever a gravidade do COVID-19

Parâmetros	AUC	Ponto de corte	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Valor de p
HERVW-1	0,673	0,061	90,4%	44,8%	p= 0,0377
IL17A	0,700	0,53	100%	37,5%	p= 0,0074
IFNAR1	0,676	0,65	55,5%	95,2%	p = 0.0343
IFNA1	0,642	1,32	81,8%	47%	p= 0,044

Abreviações: AUC, área sob a curva; COVID-19, doença de coronavírus 2019; HERVW-1, retrovírus humano endógeno; IL17A, interleucina-17; IFNAR1, Receptor, Interferon alfa-beta; IFNA1: interferon tipo I.

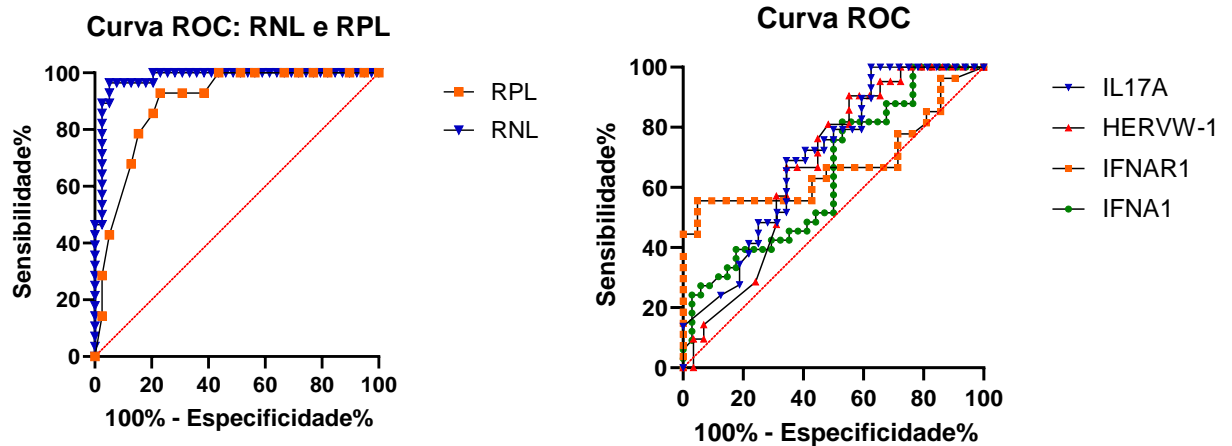


Figura 20. Curva ROC de NLR, PLR e genes IFNA1, IFNAR1, HERVW-1 e IL17A para prever a gravidade do COVID-19.

6.9. AUC para SII, AISI e SII/Hb como biomarcadores prognósticos para pacientes com infecção por SARS-CoV-2

A análise baseada na curva ROC para os índices SII (AUC= 0,988 [IC 95%= 0,9-1,0, sensibilidade= 100%, especificidade= 89,74%, $p < 0,0001$), AISI (AUC= 0,618, IC 95%= 0,4 - 0,7, sensibilidade= 78,57%, especificidade = 58,97%, $p = 0,1010$) e SII/Hb (AUC= 0,99 [IC95% = 0,9-1,0, sensibilidade= 100%, especificidade= 89,74%, $p < 0,0001$). A AUC dos índices tanto do SII como do AISI apontaram valores da curva maior que 0,7 (Figura 21). Os pontos de corte relacionados aos índices SII, AISI e

SII_Hb foram 1248, 1824 e 103,8, respectivamente (Tabela 12).

Tabela 12. Análise dos índices SII, AISI e SII_Hb como biomarcadores do COVID-19

Parâmetros	AUC	Ponto de corte	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Valor de p
SII	0,988	1248	100	89,74	p<0,0001
AISI	0,618	1824	78,57	58,97	p=0,1010
SII_Hb	0,991	103,8	100	89,74	p<0,0001

Abreviações: AUC, área sob a curva; COVID-19, doença de coronavírus 2019; SII: Índice de imuno-inflamação sistêmica; AISI: Índice agregado de inflamação sistêmica; SII/Hb: Índice de imuno-inflamação sistêmica e concentração de hemoglobina

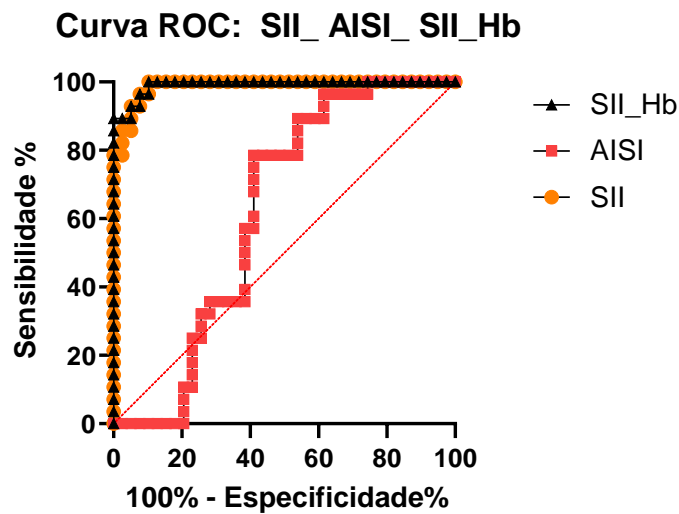


Figura 21. Curva ROC de SII, AISI, SII_Hb como prognóstico da doença COVID-19

6.10. Resposta do Interferon gama (IFN- γ) como biomarcador de gravidade na infecção por COVID-19

Em seguida, examinamos o nível plasmático de IFN- γ como possível biomarcador de gravidade na infecção através da dosagem plasmática do IFN- γ nos pacientes com COVID-19. Encontramos em nossa amostra avaliada que os resultados dos níveis plasmáticos do IFN- γ não demonstraram diferenças significativas entre os pacientes com sintomas leves e graves em decorrência da COVID-19 ($p > 0,05$) (Figura 22).

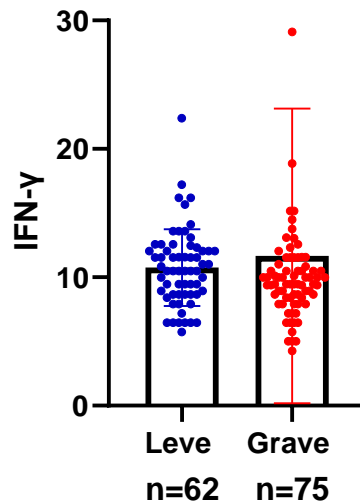


Figura 22 (a). Comparação da secreção de IFNG em concentrações plasmáticas nos pacientes com COVID-19. (b) Os dados são apresentados como boxplots de Tukey e valores individuais. (c) O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado para comparar os grupos. O nível de significância é $p < 0,05$. IFN- γ : Interferon-gama.

7. DISCUSSÃO

De acordo com os principais achados do estudo, os dados clínicos revelaram que na população de Salvador e Feira de Santana, as características clínicas demográficas, a exemplo idade, principalmente idosos, sexo masculino, raça negra e comorbidades como hipertensão, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares estiveram correlacionadas à gravidade em pacientes com COVID-19. O estudo também observou que sintomas como dispneia, febre, fadiga/mialgia são comuns entre os pacientes com COVID-19, tanto na forma leve como grave da doença. Nossos resultados corroboram com os dados observados por Matangila e colaboradores (2020) que demonstraram maior prevalência de pacientes idosos no grupo grave, do sexo masculino, com idade mediana de 58 anos e sintomas como febre (58%) e fadiga (54%). Com relação a raça negra, nossos resultados corroboram com a revisão sistemática conduzida por Mackey e colaboradores (2021) em que observam nas populações afro-americanas/negras taxas mais altas de infecção por SARS-CoV-2. Gomes e colaboradores (2021) observaram a maior frequência da raça/cor parda (59,85%) em casos confirmados de COVID-19 na macrorregião do Oeste da Bahia. Estudo retrospectivo realizado em um hospital universitário do Rio de Janeiro encontrou que dos pacientes avaliados 54,5% eram do sexo masculino, idosos e que apresentavam comorbidades como hipertensão arterial, diabetes mellitus, obesidade e doenças cardiovasculares (MOGAMI *et al.*, 2021). Este resultado é contrário ao do estudo de coorte retrospectivo que apontou a maior prevalência do sexo feminino acometidos pela COVID-19 (ZHOU *et al.*, 2020). Nossos resultados fortalecem que a prevalência do sexo masculino, raça negra, idosos e comorbidades pré-existentes são fatores mais propensos à gravidade da COVID-19. Identificar potenciais fatores de risco para a COVID-19 e esclarecer seus mecanismos subjacentes, torna-se imprescindível para aperfeiçoar o manejo de pacientes com COVID-19 e propiciar novas formas de abordagens terapêuticas.

A investigação atual identificou alterações nos marcadores hematológicos dos pacientes com a forma grave da COVID-19, dentre eles hemácias, hemoglobina, hematócrito e volume corpuscular médio (VGM) que encontravam-se

significativamente diminuídos nos pacientes com desfecho grave da COVID-19. Este achado também foi relatado por Liu e colaboradores (2020) que relataram nos pacientes com COVID-19 reduções consistentes nos níveis de hemoglobina. Pacientes diagnosticados com COVID-19 tendem a desenvolver níveis diminuídos de hemoglobina, indicando assim o possível desenvolvimento da anemia e o aumento patológico dos níveis de ferritina (TANERI *et al.*, 2020). A inflamação presente na COVID-19 afeta a eritropoiese tanto pelo metabolismo anormal do ferro mediado pela superprodução de IL-6, bem como a presença de citocinas pró-inflamatórias, como interferon- γ , IL-1 e IL-33 que resultam no desenvolvimento da anemia (BERGAMASCHI *et al.*, 2021). Além da anemia, o aumento nos níveis de ferritina sugere uma forte reação inflamatória na COVID-19 e seu impacto no metabolismo do ferro (KERNAN; CARCILLO, 2017; TANERI *et al.*, 2020). Estudo com 67 pacientes diagnosticados com COVID-19 aponta que durante o curso na unidade de terapia intensiva os pacientes desenvolveram níveis significativamente mais baixos em comparação com pacientes não internados na UTI (FAN *et al.*, 2020). Metanálise conduzida por Kowsar e colaboradores (2023) relata baixos níveis de hemoglobina em pacientes com COVID-19 internados em UTI. Em contraste com os resultados, Pan e colaboradores (2020) que observaram um aumento nos níveis de hemoglobina e hematócritos em pacientes com COVID-19.

Nossos resultados também são semelhantes ao relatados por Hou e colaboradores (2020) que sugeriram a associação da COVID-19 grave com o aumento dos neutrófilos, biomarcadores de infecção (PCR), níveis de citocinas e diminuição na contagem de linfócitos. Pacientes com COVID-19 admitidos na UTI apresentaram contagens aumentadas de neutrófilos no sangue em comparação com outros pacientes diagnosticados com os sintomas menos graves da infecção por SARS-CoV-2 (HUANG *et al.*, 2020). Yang e colaboradores (2020) identificaram que pacientes gravemente doentes apresentaram alta neutrofilia antes do desenvolvimento da inflamação, sugerindo assim a possível associação da resposta exacerbada dos neutrófilos com a patologia pulmonar aguda na COVID-19 fatal. Na COVID-19 grave, a neutrofilia acarreta maior influxo pulmonar de neutrófilos com a liberação excessiva das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) o que promove o dano alvéolo-

capilar e a manifestação patológica da SDRA. Com a liberação da cromatina pelas NETs que contêm grandes quantidades de histonas extracelulares ocorre o rompimento epitelial com indução a agregação plaquetária levando à trombose vascular pulmonar, inflamação e aumento da tempestade de citocinas (PEDERSEN *et al.*, 2020; NARASARAJU *et al.*, 2020). No que se refere aos leucócitos, em contraste com descobertas anteriores, Zhang e colaboradores (2020) em um estudo com 140 pacientes hospitalizados e diagnosticados com COVID-19 apontaram que a contagem de leucócitos encontrava-se dentro dos parâmetros normais em 68,1% dos pacientes. Em relação as plaquetas, o presente estudo relata maior contagem de plaquetas em pacientes com sintomas graves. Esse resultado reflete os de YIN e colaboradores (2021) e QU e colaboradores (2020) que apontam a maior contagem de plaquetas em pacientes com pneumonia grave decorrente do SARS-CoV-2 e sua relação com o maior número de dias referente a hospitalização. Lippi e colaboradores (2020) demonstraram em uma metanálise de 1.799 pacientes com infecções graves por COVID-19 a contagem de plaquetas significativamente mais baixas, isso difere dos achados aqui apresentados.

Ainda nesse contexto, nossos resultados sugerem a presença da eosinopenia nos pacientes internados na unidade de terapia intensiva. A eosinopenia caracteriza-se como a diminuição da produção e/ou liberação de eosinófilos, aumenta da migração para os tecidos somáticos e a diminuição da sobrevivência na circulação periférica (ROSENBERG;FOSTER,2021). Um dos mecanismos potenciais que favorecem a depleção dos eosinófilos, a resposta exacerbada de citocinas parece ser a característica central da COVID-19 grave (PUM *et al.*, 2021). Estudo realizado por Shen e colaboradores identificaram que os pacientes diagnosticados com COVID-19 apresentavam contagens significativamente mais baixas em comparação a pacientes diagnosticados com influenza. As evidências encontradas em nossos resultados apontam alterações nas células do sistema imune que acarretam o quadro clínico de leucocitose, neutrofilia, eosinopenia e linfopenia no sangue periférico dos pacientes com sintomas graves. Nossos achados são consistentes com o estudo de Javianian e colaboradores (2020) que apontam o aumento da contagem de leucócitos e que podem estar associados ao aumento da proteína C reativa (PCR) e à mortalidade.

Assim, os biomarcadores hematológicos são importantes para determinar as categorias de risco associadas ao diagnóstico de COVID-19 e com isso otimizar o manejo clínico, bem como a prevenção de complicações graves.

No âmbito da COVID-19, torna-se importante avaliar a razão neutrófilo/linfócito (RNL) e razão plaqueta/linfócito (RPL) e a sua associação com a gravidade da COVID-19. A infecção por SARS-CoV-2 reflete na redução dos linfócitos e a alteração do mecanismo de defesa do IFNG promove o acúmulo de neutrófilos patogênicos propiciando a neutrofilia (TAN *et al.*, 2020; ANTONIOLI *et al.*, 2020). Esses fatores contribuem para elevar os valores de RNL em pacientes com COVID-19 favorecendo a ativação prejudicial do sistema imunológico (BUONACERA *et al.*, 2022). Com relação ao RPL, as plaquetas desempenham papel crucial na resposta inflamatória, além de liberarem o fator plaquetário 4 que impede o desenvolvimento dos linfócitos (HAMILOS;PETOUSIS;PARTHENAKIS,2018). Além disso, a diminuição da contagem de linfócitos devido a piroptose por meio da ativação do inflamassoma NLRP3 favorece ao aumento da RPL na infecção por COVID-19 (YANG, 2020; RAVINDRA *et al.*, 2022). Diante disso, as relações RNL e RPL podem ser considerados como marcadores econômicos e que refletem a extensão da resposta inflamatória das citocinas podendo ser empregada para o monitoramento em pacientes com COVID-19. No presente estudo, os resultados obtidos com relação ao RNL apontaram que cerca de 87,2% dos pacientes no grupo grave apresentaram valores ≥ 5 , sendo o indicativo para o aumento de risco para mortalidade em pacientes com COVID-19. Esse achado é consistente com a metanálise conduzida por Simadibrata e colaboradores, (2021) que apontaram níveis elevados de RNL na admissão em pacientes graves e não sobreviventes em comparação com pacientes não graves e sobreviventes. Os resultados refletem com os de Ozawa e colaboradores., (2023) que em estudo de coorte retrospectivo apontam maior RNL em pacientes graves. Nesse mesmo contexto, nosso estudo mostrou a RPL com 76,9% em pacientes no grupo grave com score $\geq 0,20$ sugerindo assim associação positiva da gravidade com a COVID-19. A comparação dos nossos achados com o estudo de Asperges colaboradores (2023) em seu estudo de coorte retrospectivo confirma que a RPL é maior na COVID-19 desde a admissão com o aumento progressivo atingido em um

pico de 7 dias. Em estudo transversal direcionado por Man colaboradores (2021) revelou que a RPL apresenta valores maiores em pacientes com COVID-19 e ainda correlacionado com marcadores inflamatórios, a exemplo PCR e VHS. Diante disso, o RNL e RPL podem ser úteis para a avaliação da condição do paciente, bem como a gravidade da inflamação presente no curso da COVID-19.

Ao investigarmos no nosso estudo os índices inflamatórios baseados nos parâmetros hematológicos e compararmos os índices observamos que o SII, AISI e SII/Hb foram significativamente maiores no grupo com a forma grave da COVID-19 quando comparado aos pacientes leves. Como um marcador simples, conveniente, barato e não invasivo, o índice SII ou índice de imuno-inflamação sistêmica baseado nas contagens periféricas de neutrófilos, plaquetas e linfócitos reflete o microambiente tumoral, equilíbrio do estado imunológico e inflamatório do hospedeiro e recentemente também foi relatado como significativamente alterado em pacientes com COVID-19, sugerindo um papel diagnóstico em pacientes infectados por SARS-CoV-2 (USUL *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2014; FOIS *et al.*, 2020). Relativamente ao índice AISI composto pela contagem de linfócitos, neutrófilos, monócitos e plaquetas consiste em uma ferramenta utilizada como preditor significativo de tumores sólidos malignos (HU *et al.*, 2020; NOOH, *et al.*, 2022; CHO *et al.*, 2018). O índice AISI foi maior em pacientes pneumônicos com COVID-19 internados em UTI sendo assim relacionado a gravidade da COVID-19, indicando um papel diagnóstico em pacientes infectados com SARS-CoV-2 (HAMAD *et al.*, 2022). Recentemente, foi proposto por Hernandez-Ainsa e colaboradores (2022) o novo marcador denominado índice de imuno-inflamação sistêmica e concentração de hemoglobina (SII/Hb) que reflete a hemoglobina, inflamação sistêmica e a resposta das citocinas pró-inflamatórias e células imunes. Nesse contexto, buscamos aplicar a relação SII/Hb em nosso estudo devido a capacidade desse índice de refletir a inflamação sistêmica e o transporte de oxigênio no sangue viabilizando informações adicionais acerca da gravidade e o prognóstico da COVID-19, a qual a inflamação e anemia podem exercer papéis significativos.

De acordo com os presentes resultados, estudo retrospectivo com 495 pacientes acometidos pela COVID-19 aponta que o SII e o AISI foram maiores no grupo de pacientes internados na UTI (HAMAD *et al.*, 2022). Foi relatado que o SII foi

significativamente alterado em pacientes com COVID-19 em comparação a controles saudáveis, o que sugere seu papel diagnóstico em pacientes infectados por SARS-CoV-2 (USUL *et al.*, 2020). Fois e colaboradores (2020) também mencionaram que os índices de inflamação derivados da contagem de células sanguíneas, como o SII e AISI estão significativamente associados à gravidade da doença. Partindo do pressuposto de que durante as respostas inflamatórias observadas durante o câncer de colo retal, interleucinas como IL-6, IL-7 e IL17A responsáveis pela regulação das vias JAK1/2-STAT3 relacionada a angiogênese do CCR; doença metastática e localização do tumor; crescimento e metástase do câncer de colo retal, respectivamente (KRZYSTEK-KORPACKA *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2020; AMICARELLA *et al.*, 2017) interleucinas estas que também desempenham papéis importantes na resposta inflamatória do corpo à infecção por SARS-CoV-2 (HASANVAND, 2022). Nesse contexto, utilizamos o mesmo marcador para inflamação proposto por Hernandez-Ainsa e colaboradores (2022) denominado índice de imuno-inflamação sistêmica e concentração de hemoglobina (SII/Hb). Em nossos resultados, observamos que índice SII/Hb foi significativamente maior em pacientes graves quando comparados aos pacientes com a forma leve da infecção por SARS-CoV-2. Esses achados corroboram com o estudo caso-controle de Hernandez-Ainsa e colaboradores (2022) em que identificaram aumento significativo do SII/Hb em pacientes com câncer do colo retal em comparação com os pacientes controle, principalmente no momento do diagnóstico.

Analisamos em nossos resultados os valores de cortes das razões referentes aos neutrófilos, linfócitos e plaquetas e índices inflamatórios, sendo eles RNL, RPL, SII, AISI e SII/Hb calculados pela análise ROC. A curva ROC foi usada para detectar os valores de cortes ideais do RNL, RPL, SII, AISI e SII/Hb que revelou em nossa investigação que o SII e o SII/Hb tinham as áreas mais altas sob a curva (AUC=0,98, AUC= 0,99, respectivamente) com SII tendo um valor de corte ideal de 1248 e SII/Hb com valor de corte de 103,8. Em seu estudo Fois e colaboradore (2020) apontaram que a AUC para SII variava entre 0,534 a 0,715 refletindo o dano pulmonar e respiratório em pacientes com COVID-19. Este achado também foi relatado por Usul e colaboradores (2020) que identificaram a AUC= 0,760 para SII sugerindo que esse

escore pode ser usado no diagnóstico da COVID-19. Com relação ao SII/Hb, nossos achados são consistentes com o estudo desenvolvido por Hernandez-Ainsa e colaboradores (2022) que avaliaram o potencial uso diagnóstico desse índice para o câncer de colo retal, o novo marcador SII/Hb apresentou os melhores resultados relacionados a maior especificidade (92.06%) e valor preditivo positivo. Embora, mais estudos sejam necessários para investigar os índices SII e SII/Hb como valor prognóstico para a COVID-19, nosso estudo demonstrou a possível correlação dos índices com a gravidade da doença.

Na amostra avaliada investigamos a expressão relativa dos genes pró-inflamatórios IFNA1 e seus receptores IFNAR1/IFNAR2 e IL17A e genes virais endógenos HERVK-10 e HERVW-1. A diminuição sustentada na contagem de linfócitos – que caracteriza o quadro de linfopenia – no sangue periférico consiste no indicador precoce de pacientes graves/criticamente doentes com COVID-19 (ZHANG *et al.*, 2021; CHEN *et al.*, 2020). A linfopenia ocorre devido a ligação viral, lesões imunes de mediadores inflamatórios ou exsudação de linfócitos circulantes em tecidos pulmonares inflamatórios (WANG *et al.*, 2020). Estudo conduzido por Contoli e colaboradores (2021) sugere um paralelismo entre as respostas linfocíticas e a produção de IFNA1. Devido a isso, buscamos avaliar a resposta imunológica em nosso estudo e observamos o aumento do IFNA1 com a redução do seu receptor IFNAR1. Chen e colaboradores (2021) sugerem que após a infecção por SARS-CoV-2 ocorre a repressão de proteínas específicas que inibem fortemente a expressão do IFNAR1 resultando na depleção de 60 a 90% dessa proteína podendo levar ao desenvolvimento da forma grave da COVID-19 (KHANMOHAMMADI *et al.*, 2022). Além disso, nossos resultados corroboram com o estudo multicêntrico desenvolvido por Kramer e colaboradores (2021) em que observaram nos pacientes com COVID-19 grave a expressão elevada de genes com assinatura de IFNA1 no início da doença associando a resposta prolongada de células NK e a piora da evolução da doença. Esses resultados são consistentes com a análises longitudinais conduzidas por Lucas e colaboradores (2020) que apontaram produção aumentada de IFNA1 ao longo do tempo, enquanto pacientes moderados apresentaram níveis reduzidos de IFNA1. No entanto, este resultado é contrário ao de Bastard e colaboradores (2020) que

descobriram a presença de autoanticorpos contra interferons, inclusive nos IFNA1 em cerca de 10% dos pacientes com COVID-19. Os autoanticorpos promovem a redução plasmática do IFNA1 o que propicia o ciclo viram aumentando as chances do paciente desenvolver a forma grave ou crítica da doença. Foi sugerido por Trouillet- Assant e colaboradores (2020) que pacientes com menor concentração de IFNA1 apresentam pior prognóstico, com maior permanência na UTI, o que reforça o papel crucial do IFNA1 nas respostas antivirais.

Com relação ao receptor IFNAR1 foi possível observar expressão significativamente maior em pacientes leves acometidos pela COVID-19. Embora, Novoa e colaboradores (2023) em estudo de coorte prospectivo não tenham encontrado diferenças significativas entre as concentrações de IFNAR1, foi observado maior concentração de IFNAR1 em pacientes com sintomas leves. Investigação realizada por Zhang e colaboradores (2020) associa a deficiência autossômica recessiva do IFNAR1 aos pacientes com COVID-19 grave. Referente ao IFNAR2 não foi identificado expressão relativa significativa entre os grupos. Novoa e colaboradores (2023) relataram que as concentrações de IFNAR2 foram significativamente maiores em pacientes com COVID-19 grave. Com base no estudo de associação genômica ampla (GWAS) Ma e colaboradores (2021) buscaram identificar novas variantes de suscetibilidade ao COVID-19 e observaram que a expressão gênica do IFNAR2 está significativamente relacionada à infecção por SARS-CoV-2 em diversos tecidos, dentre eles pulmão, fígado, sangue e coração. Por outro lado, em um estudo realizado em pacientes internados em unidades de terapia intensiva no Reino Unido durante a primeira onda de COVID-19 verificou-se que o aumento da expressão do IFNAR2 reduziu as chances da COVID-19 grave sugerindo assim um papel protetor do IFNAR2 na COVID-19 (PAIRO- CASTINEIRA *et al.*, 2021). Embora mais estudos clínicos sejam necessários, acredita-se que as concentrações de IFNAR1 e IFNAR2 em pacientes com COVID-19 graves podem ser utilizadas como preditoras da gravidade da infecção decorrente do SARS-CoV-2.

Para determinar o estado inflamatório dos pacientes em estudo, a expressão de IL17A foi mensurada. Os resultados confirmam que pacientes com a forma grave da COVID-19 possuem elevados níveis de IL17A comparado aos pacientes leves. A

IL17A desempenha um papel importante para a maturação, diferenciação e recrutamento dos neutrófilos devido a capacidade de aumentar a liberação do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e com isso ser o fator central para a inflamação neutrofilica importante para a tempestade de citocinas relacionada a progressão clínica da COVID-19 (MAIONE *et al.*, 2021; LEY;SMITH;STARK, 2006; FOGLI *et al.*, 2013; BORGES *et al.*, 2020). Níveis elevados de IL17A no sangue periférico de pacientes infectados com SARS-CoV-2 estão associados a processos autoimunes e indução de mediadores inflamatórios como IL-1, IL-6 e TNF- α , além da metaloproteinase que promove dano tecidual (XU *et al.*, 2020; HOFFMANN *et al.*, 2020). A linfopenia paralelo ao aumento dos níveis de IL17A sugere fortemente que a resposta imune impulsiona a inflamação grave observada em pacientes com COVID-19 (FADLALLAH; EDDIN; RAHAL,2021). Resultados estes, que corroboram com os achados por Shibabaw que relatou um aumento das respostas de IL17A na forma grave de pacientes com COVID-19. A regulação positiva da IL17A associa-se a patologia pulmonar e SDRA, bem como a lesão a outros órgãos como coração, fígado e rins (SHIBABAW, 2020). Este achado é coerente com outro estudo em que os autores em sua coorte observaram o aumento da IL17A em casos graves em comparação com controles não infectados, sendo correlacionado positivamente com a gravidade da lesão pulmonar e recrutamento precoce de neutrófilos para os pulmões resultando no mau prognóstico em casos graves da COVID-19 (HUANG *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2020). Esta descoberta é contrária ao estudo anterior realizado no Irã e conduzido por Ghavazi e colaboradores (2021) que aponta o aumento significativo dos níveis de IL17A em casos leves em comparação com o grupo grave e grupo controle. Tomadas em conjunto, esses achados destacam o papel fundamental da IL17A sugerindo o seu possível envolvimento na imunopatogênese da COVID-19.

Também exploramos os níveis de dois marcadores e suas possíveis associações com a COVID-19, que consistiram no HERVK-10 e HERVW-1. Pudemos observar que os níveis de HERVK-10 não demonstraram significância entre os grupos avaliados. Assim como no caso da IL17A, o HERVK-10 já foi associado com a gravidade da COVID-19 (TEMEROZO *et al.*, 2022). Um estudo mostrou que a infecção por SARS-CoV-2 aumenta a expressão dos genes *gag*, *env* e *pol* do HERVK no

sangue total de pacientes com COVID-19, ainda neste estudo os autores identificaram que a resposta do HERVK promove a indução da secreção de interferon tipo I em pacientes com SARS-CoV-2 (GUO *et al.*, 2022). Em estudo conduzido por Temerozo e colaboradores (2022) em uma coorte de pacientes críticos com COVID-19 sob ventilação mecânica foram verificados maiores níveis de HERVK nos plasmas de pacientes com COVID-19 quando comparado aos pacientes que receberam alta ou com doadores saudáveis. O aumento dos níveis de HERVK nos pacientes que vieram a óbito foi correlacionado à expressão de marcadores pró-inflamatórios, ativação de monócitos e aumento de fatores de coagulação (TEMEROZO *et al.*, 2022). Com relação ao HERVW-1 nossos resultados demonstraram expressão relativa significativa nos grupos com a forma grave da COVID-19. Nesse mesmo contexto, Balestrieri e colaboradores (2021) avaliaram a expressão do HERVW *env* e observaram uma porcentagem significativamente maior de linfócitos HERVW *env* positivos em pacientes com COVID-19 em comparação com doadores saudáveis, a alta porcentagem de linfócitos HERVW *env* positivos podem estar correlacionados com o aumento o escore da gravidade. A detecção de HERVs no sangue periférico pode ser implicado na fisiopatologia de pacientes críticos com COVID-19, no entanto mais estudos precisam ser investigados.

Ao analisarmos a curva ROC dos genes IL17A, HERVW-1, IFNA1 e IFNAR1 observamos que a AUC da IL17A com 0,70 apresentou o melhor valor preditivo para a gravidade em pacientes com COVID-19. Em estudo anterior Desoky e colaboradores (2022) relataram que a análise da curva ROC demonstrou que a IL17A apresentou um ponto de corte > 46 pg/mL, com AUC = 1,0 sendo considerado um bom discriminador em pacientes com COVID-19. Além disso, Liu e colaboradores (2020) identificaram na curva ROC, o valor da AUC = 0,9 correspondente a IL17A o que sugere um potencial biomarcador da gravidade referente a infecção por SARS-CoV-2. No entanto, um estudo demonstra que a AUC da IL17A que correspondeu ao valor de 0,64 estando abaixo de 0,7 resulta em um baixo valor preditivo para a gravidade da doença em pacientes com COVID-19 (GHAZAVI *et al.*, 2021). Em resumo, nossos dados sugerem um papel da IL17A como um biomarcador confiável da gravidade associado a doença COVID-19, entretanto mais estudos são

necessários para avaliar o papel da IL17A na sinalização na COVID-19, para por exemplo atuar como estratégia no controle da inflamação pulmonar em decorrência da infecção por SARS-CoV-2.

Para estudar a relevância da produção dos IFNs durante a infecção por SARS-CoV-2 avaliamos também a ativação da via IFN- γ , nossos achados demonstraram que não houve diferença significativa dos níveis plasmáticos do IFN- γ entre os pacientes com sintomas graves e leves. Esses resultados diferem da coorte prospectiva de pacientes hospitalizados com diagnóstico de COVID-19 no sul do Brasil, em que observaram níveis mais altos de IFN- γ em pacientes que vieram a óbito (GADOTTI *et al.*, 2020). Ghavazi e colaboradores (2021) experimentalmente demonstraram que os níveis de IFN- γ indicou aumento de forma significativa no grupo grave em comparação com o grupo controle saudável. Entretanto, em estudo prospectivo conduzido por Cremoni e colaboradores (2022) foi observado que níveis mais baixos de IFN- γ foi preditor independente de hospitalização em pacientes com COVID-19. A expressão aumentada de IFN- γ parece estar associada a gravidade da COVID-19, porém mais estudos são necessários para investigar a sinalização do IFN- γ durante a infecção por SARS-CoV-2 com o intuito de delinear novos tratamentos para a COVID-19.

Nosso estudo apresenta limitações e pontos fortes importantes a se destacar. Como ponto forte nossa amostra é representativa de uma faixa do espectro relacionado a gravidade da COVID-19 de grande interesse clínico que são pacientes idosos e que necessitaram de admissão hospitalar em unidades de terapia intensiva. Outro ponto importante se aplica a coleta sistemática de dados clínicos e a forma de processamento padronizado em nosso laboratório. No que diz respeito as limitações, nosso estudo não avaliou os achados bioquímicos a exemplo, proteína C reativa, LDH, dímero D e marcadores hepáticos, como AST e ALT entre pacientes graves e leves. Embora nosso estudo se caracterize como transversal, o ideal seria um estudo de coorte para realizar as coletas tanto não apenas na admissão hospitalar ou na primeira visita domiciliar, mas de forma seriada com períodos determinados, a fim de investigar melhor o papel das citocinas e HERVs no desfecho da doença. Vale ressaltar que, a ausência de dados acerca da carga viral impossibilitou a investigação da relação da

carga viral com as respostas das citocinas.

8. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo em conjunto demonstram que pacientes do sexo masculino, raça negra/parda e portadores de comorbidades pré-existentes apresentam perfil mais propenso para o desenvolvimento da forma grave relacionada a COVID-19. As razões RNL e RPL e os índices de inflamação sistêmica como SII e SII/Hb sugerem associação para o diagnóstico da gravidade associada a COVID-19. Com relação a resposta imunológica observamos a neutrofilia e linfopenia, com a expressão significativa de IFNA1 e redução do seu receptor IFNAR1 e aumento dos níveis de IL17A que tomados em conjunto resultam na hiperinflamação sistêmica ou tempestade de citocinas que propiciam a gravidade da doença. Além, disso a expressão do HERVW-1 em amostras de sangue de pacientes com COVID-19 nos aponta que são necessários mais estudos para o entendimento do impacto imunopatogênico do HERVW-1 na evolução clínica da COVID-19. Nossa investigação não encontrou resultado significativo referente ao IFN- γ . Apesar de suas limitações, o estudo certamente contribui para a compreensão das respostas imunes hiperinflamatórias responsáveis pela tempestade de citocinas na COVID-19, lançando à luz novas perspectivas sobre genes inflamatórios, retrovírus endógenos e índices inflamatórios.

9 REFERÊNCIAS

ABLASSER, Andrea; HORNUNG, Veit. DNA sensing unchained. **Cell research**, v. 23, n. 5, p. 585-587, 2013.

ABOUDOUNYA, Mohamed M.; HEADS, Richard J. COVID-19 and toll-like receptor 4 (TLR4): SARS-CoV-2 may bind and activate TLR4 to increase ACE2 expression, facilitating entry and causing hyperinflammation. **Mediators of inflammation**, v. 2021, p. 1-18, 2021.

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, 2020.

AGRAWAL, Anshu et al. Altered innate immune functioning of dendritic cells in elderly humans: a role of phosphoinositide 3-kinase-signaling pathway. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 11, p. 6912-6922, 2007.

AMICARELLA, Francesca et al. Dual role of tumour-infiltrating T helper 17 cells in human colorectal cancer. **Gut**, v. 66, n. 4, p. 692-704, 2017.

ANTONIOLI, Luca et al. NKG2A and COVID-19: another brick in the wall. **Cellular & molecular immunology**, v. 17, n. 6, p. 672-674, 2020.

ASGHAR, Muhammad Sohaib et al. Comparative analysis of neutrophil to lymphocyte ratio and derived neutrophil to lymphocyte ratio with respect to outcomes of in-hospital coronavirus disease 2019 patients: A retrospective study. **Frontiers in medicine**, v. 9, 2022.

ASLANI, Mona; MORTAZAVI-JAHROMI, Seyed Shahabeddin; MIRSHAFIEY, Abbas. Cytokine storm in the pathophysiology of COVID-19: Possible functional disturbances of miRNAs. **International Immunopharmacology**, v. 101, p. 108172, 2021.

ASPERGES, Erika et al. Dynamic NLR and PLR in predicting Covid-19 severity: a retrospective cohort study. **Infectious Diseases and Therapy**, p. 1-16, 2023.

ASTUTI, Indwiani et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2(SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 14, n. 4, p. 407-412, 2020.

BACH, E. A., Aguet, M., & Schreiber, R. D. (1997). The IFN γ receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. **Annual review of immunology**, 15(1), 563-591.

BALESTRIERI, Emanuela et al. Human endogenous retrovirus K in the crosstalk between cancer cells microenvironment and plasticity: a new perspective for combination therapy. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1448, 2018.

BANNERT, Norbert; KURTH, Reinhard. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. suppl_2, p. 14572-14579, 2004.

BASTARD, Paul et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. **Science**, v. 370, n. 6515, 2020.

BATTAGLINI, Denise et al. Laboratory biomarkers for diagnosis and prognosis in COVID-19. **Frontiers in immunology**, v. 13, 2022.

BERGAMASCHI, Gaetano et al. Anemia in patients with Covid-19: pathogenesis and clinical significance. **Clinical and experimental medicine**, v. 21, n. 2, p. 239-246, 2021.

BERLIN, David A.; GULICK, Roy M.; MARTINEZ, Fernando J. Severe covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 25, p. 2451-2460, 2020.

BHETARIYA, P. J.; KRIESEL, J. D.; FISCHER, K. F. Analysis of human endogenous retrovirus expression in multiple sclerosis plaques. **Journal of emerging diseases and virology**, v. 3, n. 2, 2017.

BIAN, Jingwei; LI, Zijian. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2): SARS-CoV-2 receptor and RAS modulator. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

BIRRA, Domenico et al. COVID 19: a clue from innate immunity. **Immunologic research**, v. 68, p. 161-168, 2020.

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, 2020.

BOEHM, U. et al. Cellular responses to interferon- γ . **Annual review of immunology**, v. 15, n. 1, p. 749-795, 1997.

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

BRANDAO, Simone Cristina Soares et al. Is Toll-like receptor 4 involved in the severity of COVID-19 pathology in patients with cardiometabolic comorbidities?. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 58, p. 102-110, 2021.

BRANDI, Maria Luisa. Are sex hormones promising candidates to explain sex disparities in the COVID-19 pandemic?. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 23, n. 2, p. 171-183, 2022.

BREMBILLA, Nicolo Costantino; SENRA, Luisa; BOEHNCKE, Wolf-Henning. The IL-17 family of cytokines in psoriasis: IL-17A and beyond. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1682, 2018.

BUJA, Louis Maximilian et al. The emerging spectrum of cardiopulmonary pathology of the coronavirus disease 2019 (COVID-19): report of 3 autopsies from Houston, Texas, and review of autopsy findings from other United States cities. **Cardiovascular Pathology**, v. 48, p. 107233, 2020.

BUONACERA, Agata et al. Neutrophil to lymphocyte ratio: an emerging marker of the relationships between the immune system and diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 7, p. 3636, 2022.

BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Q

uantitative Real-Time PCR Experiments. 2009.

CALFEE, Carolyn S. et al. Subphenotypes in acute respiratory distress syndrome: latent class analysis of data from two randomised controlled trials. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 2, n. 8, p. 611-620, 2014.

CAMERON, Mark J. et al. Interferon-mediated immunopathological events are associated with atypical innate and adaptive immune responses in patients with severe acute respiratory syndrome. **Journal of virology**, v. 81, n. 16, p. 8692-8706, 2007.

CAO, Xuetao. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. **Nature reviews immunology**, v. 20, n. 5, p. 269-270, 2020.

CELLA, Marina et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. **Nature medicine**, v. 5, n. 8, p. 919-923, 1999.

CHANNAPPANAVAR, Rudragouda et al. IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes. **The Journal of clinical investigation**, v. 129, n. 9, p. 3625-3639, 2019.

CHANNAPPANAVAR, Rudragouda; ZHAO, Jincun; PERLMAN, Stanley. T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. **Immunologic research**, v. 59, p. 118-128, 2014.

CHARVET, Benjamin et al. SARS-CoV-2 awakens ancient retroviral genes and the expression of proinflammatory HERV-W envelope protein in COVID-19 patients. **Isience**, v. 26, n. 5, 2023.

CHEN, Da-Yuan, et al. "SARS-CoV-2 disrupts proximal elements in the JAK-STAT pathway." **Journal of virology** 95.19 (2021): e00862-21.

CHEN, Guang et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 5, p. 2620-2629, 2020.

CHEN, I.-Yin et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus viroporin 3aactivates the NLRP3 inflammasome. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 50, 2019.

CHEN, J. et al. Individual variation of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 gene expression and regulation. **Aging cell**, 19(7), e13168, 2020.

CHO, Uiju et al. Prognostic value of systemic inflammatory markers and development of a nomogram in breast cancer. **PloS one**, v. 13, n. 7, p. e0200936, 2018.

CHOW, N. et al. CDC COVID-19 Response Team. Preliminary estimates of the prevalence of selected underlying health conditions among patients with coronavirus disease 2019—United States, February 12–March 28, 2020.

CLERKIN, Kevin J. et al. COVID-19 and cardiovascular disease. **Circulation**, v.141, n. 20, p. 1648-1655, 2020.

CODO, Ana Campos et al. Elevated glucose levels favor SARS-CoV-2 infection and monocyte

response through a HIF-1 α /glycolysis-dependent axis. **Cell metabolism**, v. 32, n. 3, p. 437-446. e5, 2020.

CONNORS, Jean M.; LEVY, Jerrold H. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. **Blood**, v. 135, n. 23, p. 2033-2040, 2020.

CONTI, Pio; YOUNES, A. Coronavirus COV-19/SARS-CoV-2 affects women less than men: clinical response to viral infection. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 34, n. 2, p. 339-343, 2020.

CREMONI, Marion et al. Low baseline IFN- γ response could predict hospitalization in COVID-19 patients. **Frontiers in immunology**, v. 13, 2022.

CUI, Tenglong et al. The adverse inflammatory response of tobacco smoking in COVID-19 patients: biomarkers from proteomics and metabolomics. **Journal of Breath Research**, v. 16, n. 4, p. 046002, 2022.

DA SILVA, Rafaela Pires et al. Circulating type I interferon levels and COVID-19 severity: a systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 657363, 2021.

DANWANG, Celestin et al. A meta-analysis of potential biomarkers associated with severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Biomarker research**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2020.

DANZI, GIAN BATTISTA et al. Acute pulmonary embolism and COVID-19 pneumonia: a random association? **European Heart Journal**, v. 41, n. 19, p. 1858-1858, 2020.

DE WIT, Emmie et al. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 523-534, 2016.

DENG, Jun et al. Signal transducer and activator of transcription 3 hyperactivation associates with follicular helper T cell differentiation and disease activity in rheumatoid arthritis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1226,

DESSIE, Zelalem G.; ZEWOTIR, Temesgen. Mortality-related risk factors of COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 42 studies and 423,117 patients. **BMC infectious diseases**, v. 21, n. 1, p. 855, 2021.

DIAO, Bo et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Frontiers in immunology**, p. 827, 2020.

DING, Ting et al. Potential influence of menstrual status and sex hormones on female SARS-CoV-2 infection: a cross-sectional study from multicentre in Wuhan, China. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, 2020.

DIPIAZZA, Anthony T.; GRAHAM, Barney S.; RUCKWARDT, Tracy J. T cell immunity to SARS-CoV-2 following natural infection and vaccination. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 538, p. 211-217, 2021.

DJAHARUDDIN, Irawaty et al. Comorbidities and mortality in COVID-19 patients. **Gaceta sanitaria**, v. 35, p. S530-S532, 2021

DONG, Xiang et al. Eleven faces of coronavirus disease 2019. **Allergy**, v. 75, n. 7, p. 1699-1709, 2020.

DOWELL, Scott F. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus on hospital surfaces. **Clinical infectious diseases**, v. 39, n. 5, p. 652-657, 2004.

EIZIRIK, Decio L.; DARVILLE, Martine I. beta-cell apoptosis and defense mechanisms: lessons from type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 50, n. suppl 1, p. S64, 2001.

EL-DESOKY, Manal M. et al. Association of Interleukin-17F Polymorphism and Mortality Predictors with the Risk of COVID-19. **International Journal of Clinical Practice**, v. 2022, 2022.

ERCAN, Z. et al. The aggregate index of systemic inflammation may predict mortality in COVID-19 patients with chronic renal failure. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, p. 3747-3752, 2023.

ESCOSTEGUY, Claudia Caminha et al. COVID-19: estudo seccional de casos suspeitos internados em um hospital federal do Rio de Janeiro e fatores associados ao óbito hospitalar. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 30, 2020.

FADLALLAH, Sukayna; EDDIN, Marcel S. Sham; RAHAL, Elias A. IL-17A in COVID-19 Cases: a meta-analysis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 15, n. 11, p. 1630-1639, 2021.

FAJGENBAUM, David C.; JUNE, Carl H. Cytokine storm. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 23, p. 2255-2273, 2020.

FAN, Bingwen Eugene et al. Hematologic parameters in patients with COVID-19 infection. **American journal of hematology**, v. 95, n. 6, p. E131-E134, 2020.

FERRARA, JL M.; ABHYANKAR, S.; GILLILAND, D. G. Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1. In: **Transplantation proceedings**. 1993. p. 1216-1217.

FLANNERY, Sinead; BOWIE, Andrew G. The interleukin-1 receptor-associated kinases: critical regulators of innate immune signalling. **Biochemical pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 1981-1991, 2010.

FLOOK, Mary et al. Informing the public health response to COVID-19: a systematic review of risk factors for disease, severity, and mortality. **BMC infectious diseases**, v. 21, p. 1-23, 2021.

FOGLI, L. K., Sundrud, M. S., Goel, S., Bajwa, S., Jensen, K., Derudder, E., ... & Koralov, S. B. (2013). T cell-derived IL-17 mediates epithelial changes in the airway and drives pulmonary neutrophilia. **The journal of immunology**, 191(6), 3100-3111.

FOIS, Alessandro G. et al. The systemic inflammation index on admission predicts in-hospital mortality in COVID-19 patients. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5725, 2020.
Force. **European Respiratory Journal**, v. 8, n. 8, p. 1398-1420, 1995.

FRANCISCO, Vera et al. Adipokines: linking metabolic syndrome, the immune system, and

arthritic diseases. **Biochemical pharmacology**, v. 165, p. 196-206, 2019.

FRANK, J. A., & FESCHOTTE, C. Co-option of endogenous viral sequences for host cell function. **Current opinion in virology**, 25, 81-89, 2017.

FRUCHT, David M. et al. IFN- γ production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. **Trends in immunology**, v. 22, n. 10, p. 556-560, 2001.

GAERTNER, Florian; MASSBERG, Steffen. Patrolling the vascular borders: platelets in immunity to infection and cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 12, p. 747-760, 2019.

GALANI, Vasiliki et al. The role of apoptosis in the pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review. **Pathology-Research and Practice**, v. 206, n. 3, p. 145-150, 2010.

GALLO MARIN, Benjamin et al. Predictors of COVID-19 severity: a literature review. **Reviews in medical virology**, v. 31, n. 1, p. 1-10, 2021.

GALLUS, Silvano et al. The role of smoking in COVID-19 progression: a comprehensive meta-analysis. **European Respiratory Review**, v. 32, n. 167, 2023.

GAO, Feng et al. Obesity is a risk factor for greater COVID-19 severity. **Diabetescare**, v. 43, n. 7, p. e72-e74, 2020.

GARCÍA-SASTRE, Adolfo. Ten strategies of interferon evasion by viruses. **Cell host & microbe**, v. 22, n. 2, p. 176-184, 2017.

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

GHOBADI, Hassan et al. Role of leukocytes and systemic inflammation indexes (NLR, PLR, MLP, dNLR, NLPR, AISI, SIR-I, and SII) on admission predicts in-hospital mortality in non-elderly and elderly COVID-19 patients. **Frontiers in Medicine**, p. 2434, 2022.

GILYAZOVA, Irina et al. COVID-19: Mechanisms, risk factors, genetics, non-coding RNAs and neurologic impairments. **Non-coding RNA Research**, 2023.

GOLAN, Maya et al. Human endogenous retrovirus (HERV-K) reverse transcriptase as a breast cancer prognostic marker. **Neoplasia**, v. 10, n. 6, p.521-IN2, 2008.

GOMES, Daiene Rosa et al. Inland expansion of COVID-19 in Western Bahia: epidemiological profile and spatial analysis of deaths and confirmed cases. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 26, p. 4665-4680, 2021.

GRANDI, Nicole et al. Human Endogenous Retrovirus (HERV) Transcriptome Is Dynamically Modulated during SARS-CoV-2 Infection and Allows Discrimination of COVID-19 Clinical Stages. **Microbiology Spectrum**, p. e02516-22, 2023.

GRANDI, Nicole; TRAMONTANO, Enzo. HERV envelope proteins: physiological role and pathogenic potential in cancer and autoimmunity. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 462, 2018.

GRÖGER, Victoria et al. Formation of herv-k and herv-fc1 envelope family members is suppressed on transcriptional and translational level. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 7855, 2020.

GUAN W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. **N Engl J M** 2020; 382:1708-20.

GUAN, Wei-jie et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 inChina. **New England journal of medicine**, v. 382, n. 18, p. 1708-1720, 2020.

GUAN, Wei-jie et al. Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 inChina: a nationwide analysis. **European Respiratory Journal**, v. 55, n. 5, 2020.

GUO, Li et al. Comorbid diabetes and the risk of disease severity or death among 8807 COVID-19 patients in China: a meta-analysis. **Diabetes research andclinical practice**, v. 166, p. 108346, 2020.

GUO, Yaolin et al. High expression of HERV-K (HML-2) might stimulate interferon in COVID-19 patients. **Viruses**, v. 14, n. 5, p. 996, 2022.

HADJADJ, Jérôme et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. **Science**, v. 369, n. 6504, p. 718-724,2020.

HAMAD, Dina Ali et al. Combined blood indexes of systemic inflammation as a mirror to admission to intensive care unit in COVID-19 patients: a multicentric study. **Journal of Epidemiology and Global Health**, p. 1-10, 2022.

HAMILOS, Michalis; PETOUSIS, Stylianos; PARTHENAKIS, Fragiskos. Interaction between platelets and endothelium: from pathophysiology to new therapeutic options. **Cardiovascular diagnosis and therapy**, v. 8, n. 5, p. 568, 2018.

HAN, H. et al. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. **Emerging microbes & infections**, 9(1), 1123-1130, 2020.

HAN, Xiaoyu et al. Longitudinal Assessment of Chest CT Findings and Pulmonary Function after COVID-19 Infection. **Radiology**, v. 307, n. 2, p. e222888, 2023.

HARIYANTO, Timotius Ivan et al. Inflammatory and hematologic markers as predictors of severe outcomes in COVID-19 infection: a systematic review and meta-analysis. **The American journal of emergency medicine**, v. 41, p. 110-119, 2021.

HASANVAND, Amin. COVID-19 and the role of cytokines in this disease. **Inflammopharmacology**, v. 30, n. 3, p. 789-798, 2022.

HENDERSON, L. et al. On the alert for cytokine storm: immunopathology inCOVID-19. **Arthritis & Rheumatology**, 72(7), 1059-1063, 2020.

HERNANDEZ-AINSA, Maria et al. Blood-cell-based inflammatory markers as a useful tool for early diagnosis in colorectal cancer. **Frontiers in Medicine**, p. 1826, 2022.

HIBBERT, Kathryn; RICE, Mary; MALHOTRA, Atul. Obesity and ARDS. **Chest**, v.142, n. 3, p. 785-790, 2012.

HIRANO, Toshio; MURAKAMI, Masaaki. COVID-19: a new virus, but a familiar receptor and cytokine release syndrome. **Immunity**, v. 52, n. 5, p. 731-733, 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, 2020.

HOHN, Oliver; HANKE, Kirsten; BANNERT, Norbert. HERV-K (HML-2), the best preserved family of HERVs: endogenization, expression, and implications in health and disease. **Frontiers in oncology**, v. 3, p. 246, 2013.

HOTTZ, Eugenio D. et al. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. **Blood**, v. 136, n. 11, p. 1330-1341, 2020.

HOU, Hongyan et al. Using IL-2R/lymphocytes for predicting the clinical progression of patients with COVID-19. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 201, n. 1, p. 76-84, 2020.

HU, Bo et al. Systemic immune-inflammation index predicts prognosis of patients after curative resection for hepatocellular carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 23, p. 6212-6222, 2014.

HU, Chen et al. Prognostic value of systemic inflammatory factors NLR, LMR, PLR and LDH in penile cancer. **BMC urology**, v. 20, p. 1-9, 2020.

HUANG, Chaolin et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

HUANG, Yufan; DAI, Huaiyu; KE, Ruian. Principles of effective and robust innate immune response to viral infections: a multiplex network analysis. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1736, 2019.

IVASHKIV, Lionel B.; DONLIN, Laura T. Regulation of type I interferon responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 1, p. 36-49, 2014.

IWASAKI, Masae et al. Inflammation triggered by SARS-CoV-2 and ACE2 augment drives multiple organ failure of severe COVID-19: molecular mechanisms and implications. **Inflammation**, v. 44, p. 13-34, 2021.

JACKSON, Cody B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 23, n. 1, p. 3-20, 2022.

JAVANIAN, Mostafa et al. Clinical and laboratory findings from patients with COVID-19 pneumonia in Babol North of Iran: a retrospective cohort study. **Romanian Journal of Internal Medicine**, v. 58, n. 3, p. 161-167, 2020.

JI, Qingwei et al. Circulating Th1, Th2, and Th17 levels in hypertensive patients. **Disease Markers**, v. 2017, 2017.

Ji, Yuanyuan et al. Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 23, n. 4-6, p. 265-276, 2009.

JORDAN, S. C. Innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 in humans: relevance to acquired immunity and vaccine responses. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 204, n. 3, p. 310-320, 2021.

KABBANI, Nadine; OLDS, James L. Does COVID19 infect the brain? If so, smokers might be at a higher risk. **Molecular pharmacology**, v. 97, n. 5, p. 351-353, 2020.

KARKI, Rajendra et al. Synergism of TNF- α and IFN- γ triggers inflammatory cell death, tissue damage, and mortality in SARS-CoV-2 infection and cytokine shock syndromes. **Cell**, v. 184, n. 1, p. 149-168. e17, 2021.

KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637-650, 2011.

KERNAN, Kate F.; CARCILLO, Joseph A. Hyperferritinemia and inflammation. **International immunology**, v. 29, n. 9, p. 401-409, 2017.

KHANMOHAMMADI, Shaghayegh, et al. "A case of autosomal recessive interferon alpha/beta receptor alpha chain (IFNAR1) deficiency with severe COVID-19." **Journal of clinical immunology** (2022): 1-6.

KOSTAKIS, Ioannis D. et al. What can preoperative blood tests tell us about colorectal cancer. **J buon**, v. 23, n. 7, p. 84-95, 2018.

KOWSAR, Rasoul et al. Risk of mortality in COVID-19 patients: a meta-and network analysis. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 2138, 2023.

KRÄMER, Benjamin et al. Early IFN- α signatures and persistent dysfunction are distinguishing features of NK cells in severe COVID-19. **Immunity**, v. 54, n. 11, p. 2650-2669. e14, 2021.

KREMER, David et al. pHERV-W envelope protein fuels microglial cell- dependent damage of myelinated axons in multiple sclerosis. **Proceedings of theNational Academy of Sciences**, v. 116, n. 30, p. 15216-15225, 2019.

KRZYSZEK-KORPACKA, Malgorzata et al. Elevated systemic interleukin-7 in patients with colorectal cancer and individuals at high risk of cancer: association with lymph node involvement and tumor location in the right colon. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 66, p. 171-179, 2017

KUWABARA, Taku et al. The role of IL-17 and related cytokines in inflammatory autoimmune diseases. **Mediators of inflammation**, v. 2017, 2017.

LAGUNAS-ALVARADO, Maricarmen et al. Systemic immune inflammatory index in sepsis. **Medicina interna de México**, v. 33, n. 3, p. 303-309, 2017.

LAGUNAS-RANGEL, Francisco Alejandro. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and lymphocyte-to-C-reactive protein ratio in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 10, p. 1733, 2020.

LEE, Daniel W. et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood*, **The Journal of the American Society of Hematology**, v. 124, n. 2, p. 188-195, 2014.

LEE, Jeong Seok et al. Immunophenotyping of COVID-19 and influenza highlights the role of type I interferons in development of severe COVID-19. **Science immunology**, v. 5, n. 49, p. eabd1554, 2020.

LESCURE, Francois-Xavier et al. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 697-706, 2020.

LETKO, Michael; MARZI, Andrea; MUNSTER, Vincent. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. **Nature microbiology**, v. 5, n. 4, p. 562-569, 2020.

LEVET, Sandrine et al. An ancestral retroviral protein identified as a therapeutic target in type-1 diabetes. **JCI insight**, v. 2, n. 17, 2017.

LEW, Thomas WK et al. Acute respiratory distress syndrome in critically ill patients with severe acute respiratory syndrome. **Jama**, v. 290, n. 3, p. 374-380, 2003.

LEY, Klaus; SMITH, Emily; STARK, Matthew A. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. **Immunologic research**, v. 34, p. 229-242, 2006.

LI, Bo et al. Prevalence and impact of cardiovascular metabolic diseases on COVID-19 in China. **Clinical research in cardiology**, v. 109, n. 5, p. 531-538, 2020.

LI, Hong et al. Systemic Immune-Inflammatory Index predicts prognosis of patients with COVID-19: A retrospective study. 2020.

LI, Hui et al. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. **The Lancet**, v. 395, n. 10235, p. 1517-1520, 2020.

LI, Jianfeng; LIU, Yin; ZHANG, Xuming. Murine coronavirus induces type I interferon in oligodendrocytes through recognition by RIG-I and MDA5. **Journal of virology**, v. 84, n. 13, p. 6472-6482, 2010.

LI, Jingjing et al. The role of interleukins in colorectal cancer. **International journal of biological sciences**, v. 16, n. 13, p. 2323, 2020.

LI, Jingwei et al. Polymorphisms and mutations of ACE2 and TMPRSS2 genes are associated with COVID-19: a systematic review. **European Journal of Medical Research**, v. 27, n. 1, p. 1-10, 2022.

LI, Shasha et al. Differentially expressed immune response genes in COVID-19 patients based on disease severity. **Ageing (Albany NY)**, v. 13, n. 7, p. 9265, 2021.

LIN, Su-Chang; LO, Yu-Chih; WU, Hao. Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. **Nature**, v. 465, n. 7300, p. 885-890, 2010.

LIPPI, Giuseppe; PLEBANI, Mario; HENRY, Brandon Michael. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: a meta-analysis. **Clinica chimica acta**, v. 506, p. 145-148, 2020.

LIU, Jing et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. **EBioMedicine**, v. 55, p. 102763, 2020.

LIU, Xiaoqing; ZHANG, Run; HE, Guangsheng. Hematological findings in coronavirus disease 2019: indications of progression of disease. **Annals of hematology**, v. 99, p. 1421-1428, 2020.

LIU, Yingxia et al. Elevated plasma levels of selective cytokines in COVID-19 patients reflect viral load and lung injury. **National Science Review**, v. 7, n. 6, p. 1003-1011, 2020.

LIU, Yuwei et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. **Journal of Infection**, v. 81, n. 1, p. e6-e12, 2020.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v.25, p.402–408, 2001.

MA, Yunlong et al. Integrative genomics analysis reveals a 21q22. 11 locus contributing risk to COVID-19. **Human Molecular Genetics**, v. 30, n. 13, p. 1247-1258, 2021.

MACKEY, Katherine et al. Racial and ethnic disparities in COVID-19–related infections, hospitalizations, and deaths: a systematic review. **Annals of internal medicine**, v. 174, n. 3, p. 362-373, 2021.

MAHALLAWI, Waleed H. et al. MERS-CoV infection in humans is associated with a pro-inflammatory Th1 and Th17 cytokine profile. **Cytokine**, v. 104, p. 8-13, 2018.

MAMELI, Giuseppe et al. Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not Human herpesvirus 6. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 1, p. 264-274, 2007.

MAN, Milena Adina et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, platelets-to-lymphocyte ratio, and eosinophils correlation with high-resolution computer tomography severity score in COVID-19 patients. **PloS one**, v. 16, n. 6, p. e0252599, 2021.

MAO, L. et al. Neurologic manifestations of hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. **JAMA neurology**, 77(6), 683-690,2020.

MASON, Mike J. et al. Low HERV-K (C4) copy number is associated with type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 63, n. 5, p. 1789-1795, 2014.

MATANGILA, Junior Rika et al. Clinical characteristics of COVID-19 patients hospitalized at Clinique Ngaliema, a public hospital in Kinshasa, in the Democratic Republic of Congo: A retrospective cohort study. **PLoS One**, v. 15, n. 12, p. e0244272, 2020.

MATOS, Aline da Rocha et al. Identification of SARS-CoV-2 and additional respiratory pathogens cases under the investigation of COVID-19 initial phase in a Brazilian reference laboratory. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, 2020.

MAYER, Jens; BLOMBERG, Jonas; SEAL, Ruth L. A revised nomenclature for transcribed human endogenous retroviral loci. **Mobile DNA**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2011.

MCALLISTER, Sandra S.; WEINBERG, Robert A. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. **Nature cell biology**, v. 16, n. 8, p. 717-727, 2014.

MCCLEAN, K. M. et al. Obesity and the lung: 1· Epidemiology. **Thorax**, v. 63, n. 7, p. 649-654, 2008.

MCNAB, Finlay et al. Type I interferons in infectious disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 2, p. 87-103, 2015.

MEHTA, Puja et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. **The lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1033-1034, 2020.

MEHTA, Puja; FAJGENBAUM, David C. Is severe COVID-19 a cytokine storm syndrome: a hyperinflammatory debate. **Current opinion in Rheumatology**, v. 33, n. 5, p. 419, 2021.

MERAD, Miriam et al. The immunology and immunopathology of COVID-19. **Science**, v. 375, n. 6585, p. 1122-1127, 2022.

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, 2020.

METCALF, Talibah U. et al. Human monocyte subsets are transcriptionally and functionally altered in aging in response to pattern recognition receptor agonists. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 4, p. 1405-1417, 2017.

MIKACENIC, Carmen et al. IL-17A is associated with alveolar inflammation and poor outcomes in acute respiratory distress syndrome. **Critical care medicine**, v. 44, n. 3, p. 496, 2016.

MOGAMI, Roberto et al. Chest computed tomography in COVID-19 pneumonia: a retrospective study of 155 patients at a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Radiologia brasileira**, v. 54, p. 1-8, 2021.

MONTAÑO, Luis M. et al. Could lower testosterone in older men explain higher COVID-19 morbidity and mortalities?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, p. 935, 2022.

MORADI, Elnaz Vafadar et al. Increased age, neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and white blood cells count are associated with higher COVID-19 mortality. **The American journal of emergency medicine**, v. 40, p. 11-14, 2021.

MORANDI, Elena et al. The association between human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0172415, 2017.

MOROZOV, Vladimir A.; DAO THI, Viet Loan; DENNER, Joachim. The transmembrane protein of the human endogenous retrovirus-K (HERV-K) modulates cytokine release and gene expression. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e70399, 2013.

MURAKAMI, Masaaki; KAMIMURA, Daisuke; HIRANO, Toshio. Pleiotropy and specificity: insights from the interleukin 6 family of cytokines. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 812-831, 2019.

NAGAOKA, Kentaro et al. Circulating type I interferon levels in the early phase of COVID-19 are associated with the development of respiratory failure. **Frontiers in immunology**, v. 13, 2022.

NIGROVIC, Peter A. COVID-19 cytokine storm: what is in a name?. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 80, n. 1, p. 3-5, 2021.

NIKIFOROW, Sarah; BERLINER, Nancy. To “lump” or to “split” in macrophage activation syndrome and hemophagocytic lymphohistiocytosis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 72, n. 2, p. 206-209, 2020.

NOOH, Hend A. et al. The role of inflammatory indices in the outcome of COVID-19 cancer patients. **Medical Oncology**, v. 39, p. 1-14, 2022.

OMRANI-NAVA, Versa et al. Evaluation of Hepatic Enzymes Changes and Association with Prognosis in COVID-19 Patients. **Hepatitis Monthly**, v. 20, n. 4, 2020.

ORLOV, Marika et al. A case for targeting Th17 cells and IL-17A in SARS-CoV-2 infections. **The Journal of Immunology**, v. 205, n. 4, p. 892-898, 2020.

OZAWA, Takuya et al. Use of the neutrophil-to-lymphocyte ratio and an oxygen requirement to predict disease severity in patients with COVID-19. **Respiratory Investigation**, v. 61, n. 4, p. 454-459, 2023.

PAIRO-CASTINEIRA, Erola et al. Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. **Nature**, v. 591, n. 7848, p. 92-98, 2021.

PALERMO, Enrico et al. Type I interferons in COVID-19 pathogenesis. **Biology**, v. 10, n. 9, p. 829, 2021.

PAN, Yunbao et al. Can routine laboratory tests discriminate SARS-CoV-2-infected pneumonia from other causes of community-acquired pneumonia?. **Clinical and translational medicine**, v. 10, n. 1, p. 161-168, 2020.

PARACKOVA, Zuzana et al. Disharmonic inflammatory signatures in COVID-19: augmented neutrophils' but impaired monocytes' and dendritic cells' responsiveness. **Cells**, v. 9, n. 10, p. 2206, 2020.

PARK, Annsea; IWASAKI, Akiko. Type I and type III interferons—induction, signaling, evasion, and application to combat COVID-19. **Cell host & microbe**, v. 27, n. 6, p. 870-878, 2020.

PARK, Wan Beom et al. Virus isolation from the first patient with SARS-CoV-2 in Korea. **Journal of Korean medical science**, v. 35, n. 7, 2020.

PEDERSEN, Savannah F. et al. SARS-CoV-2: a storm is raging. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 5, p. 2202-2205, 2020.

PERNG, Yi-Chieh; LENSCHOW, Deborah J. ISG15 in antiviral immunity and beyond. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 423-439, 2018.

PONTI, Giovanni et al. Biomarkers associated with COVID-19 disease progression. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 57, n. 6, p. 389-399, 2020.

PUM, Alexandra et al. Cytokines and chemokines in SARS-CoV-2 infections—therapeutic strategies targeting cytokine storm. **Biomolecules**, v. 11, n. 1, p. 91, 2021.

Qi, F., Qian, S., Zhang, S., & Zhang, Z. Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses. **Biochemical and biophysical research communications**, 526(1), 135-140, 2020.

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, 2020.

QIU, Feifei et al. Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: up and down or upside down?. **Oncotarget**, v. 8, n. 1, p. 268, 2017.

QU, Rong et al. Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 9, p. 1533-1541, 2020.

RADZIKOWSKA, Urszula et al. Distribution of ACE2, CD147, CD26, and other SARS-CoV-2 associated molecules in tissues and immune cells in health and in asthma, COPD, obesity, hypertension, and COVID-19 risk factors. **Allergy**, v. 75, n.11, p. 2829-2845, 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, p. e00299-20, 2021

RAMOS-CASALS, Manuel et al. Adult haemophagocytic syndrome. **The Lancet**, v. 383, n. 9927, p. 1503-1516, 2014.

RASTRELLI, Giulia et al. Low testosterone levels predict clinical adverse outcomes in SARS-CoV-2 pneumonia patients. **Andrology**, v. 9, n. 1, p. 88-98, 2021.

RAVINDRA, Rahul et al. Platelet indices and platelet to lymphocyte ratio (PLR) as markers for predicting COVID-19 infection severity. **Cureus**, v. 14, n. 8, 2022.

REDDY, Kiran et al. Subphenotypes in critical care: translation into clinical practice. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 6, p. 631-643, 2020.

REDDY, Rohin K. et al. The effect of smoking on COVID-19 severity: A systematic review and meta-analysis. **Journal of medical virology**, v. 93, n. 2, p. 1045-1056, 2021.

REGHUNATHAN, Renji et al. Expression profile of immune response genes in patients with severe acute respiratory syndrome. **BMC immunology**, v. 6, p. 1-11, 2005.

RODRIGUEZ-NAVA, Guillermo et al. Comparison of clinical characteristics and outcomes of hospitalized patients with seasonal coronavirus infection and COVID-19: a retrospective cohort study. **BMC Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 1-11, 2022.

ROSENBERG, Helene F.; FOSTER, Paul S. Eosinophils and COVID-19: diagnosis, prognosis, and vaccination strategies. In: **Seminars in immunopathology**. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2021. p. 383-392.

ROSSI, Sabrina et al. Are markers of systemic inflammation good prognostic indicators in colorectal cancer?. **Clinical colorectal cancer**, v. 16, n. 4, p. 264-274, 2017.

ROVED, Jacob; WESTERDAHL, Helena; HASSELQUIST, Dennis. Sex differences in immune responses: Hormonal effects, antagonistic selection, and evolutionary consequences. **Hormones and Behavior**, v. 88, p. 95-105, 2017

RUAN, Qirong et al. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. **Intensive care medicine**, v. 46, n. 5, p. 846-848, 2020.

RYAN, Paul MacDaragh; CAPLICE, Noel. COVID-19 and relative angiotensin-converting enzyme 2 deficiency: Role in disease severity and therapeutic response. **Open Heart**, v. 7, n. 1, p. e001302, 2020.

RYZHAKOV, Grigory et al. IL-17 boosts proinflammatory outcome of antiviral response in human cells. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 10, p. 5357-5362, 2011.

SANTOS, Lucas Gomes et al. Prevalência de Hipertensão Arterial Sistêmica e Diabetes Mellitus em Indivíduos com COVID-19: Um Estudo Retrospectivo de Óbitos em Pernambuco, Brasil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 117, p. 416-422, 2021.

SARIOL, Alan; PERLMAN, Stanley. Lessons for COVID-19 immunity from other coronavirus infections. **Immunity**, 2020.

SCHMITT, Clemens A. et al. COVID-19 and cellular senescence. **Nature Reviews Immunology**, v. 23, n. 4, p. 251-263, 2023.

SCHNEIDER, William M.; CHEVILLOTTE, Meike Dittmann; RICE, Charles M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. **Annual review of immunology**, v. 32, p. 513-545, 2014.

SCHOEMAN, Dewald; FIELDING, Burtram C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. **Virology journal**, v. 16, n. 1, p. 1-22, 2019.

SCHRODER, Kate et al. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of leukocyte biology**, v. 75, n. 2, p. 163-189, 2004

SCHWARTZ, Samantha L. et al. Human OAS1 activation is highly dependent on both RNA sequence and context of activating RNA motifs. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. 13, p. 7520-7531, 2020.

SECRETARIA DE SAÚDE PÚBLICA DO ESTADO DA BAHIA (SESAB). Mapa epidemiológico do COVID-19. <https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2023/03/Semana-Epidemiologica-11-Boletim-Infografico-20-03-2023-1.pdf>. Acessado em maio de 2023.

SENGUL, Elvan Alper et al. Correlation of neutrophil/lymphocyte and platelet/lymphocyte ratio with visual acuity and macular thickness in age-related macular degeneration. **International Journal of Ophthalmology**, v. 10, n. 5, p. 754, 2017.

SHANG, Weifeng et al. The value of clinical parameters in predicting the severity of COVID-19. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 10, p. 2188-2192, 2020.

SHARIF-ASKARI, Fatemeh Saheb et al. Interleukin-17, a salivary biomarker for COVID-19 severity. **Plos one**, v. 17, n. 9, p. e0274841, 2022.

SHEN, Changxing et al. Comparative analysis of early-stage clinical features between COVID-19 and influenza A H1N1 virus pneumonia. **Frontiers in public health**, v. 8, p. 206, 2020.

SHEPHERD, Rebecca et al. Sexual dimorphism in innate immunity: the role of sex hormones and epigenetics. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 604000, 2021.

SHI, Heshui et al. Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet infectious diseases**, v. 20, n. 4, p. 425-434, 2020.

SHI, Qiao et al. Clinical characteristics and risk factors for mortality of COVID-19 patients with diabetes in Wuhan, China: a two-center, retrospective study. **Diabetescare**, v. 43, n. 7, p. 1382-1391, 2020.

SHIBABAW, Tewodros. Inflammatory cytokine: IL-17A signaling pathway in patients present with COVID-19 and current treatment strategy. **Journal of inflammation research**, p. 673-680, 2020.

SHAVOSHI, Fatemeh et al. On-admission and dynamic trend of laboratory profiles as prognostic biomarkers in COVID-19 inpatients. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 6993, 2023.

SIMADIBRATA, Daniel Martin et al. Platelet-to-lymphocyte ratio, a novel biomarker to predict the severity of COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. **Journal of the Intensive Care Society**, v. 23, n. 1, p. 20-26, 2022.

SINHA, Pratik et al. Development and validation of parsimonious algorithms to classify acute respiratory distress syndrome phenotypes: a secondary analysis of randomised controlled trials. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 3, p. 247-257, 2020.

SINHA, Pratik; MATTHAY, Michael A.; CALFEE, Carolyn S. Is a “cytokine storm” relevant to COVID-19?. **JAMA internal medicine**, v. 180, n. 9, p. 1152-1154, 2020.

SONG, Minkyoo et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and mortality in the United States general

population. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 464, 2021.

SOTGIU, Stefano et al. Multiple sclerosis-associated retrovirus and progressive disability of multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 16, n. 10, p. 1248-1251, 2010.

Study of COVID-19 Corona Virus Excludes Its Origin from Recombination or Characterized Biological Sources and Suggests a Role for HERVS in Its Wide Range Symptoms. **Cytology and Genetics**, v. 54, n. 6, p. 588-604, 2020.

SUTHERLAND, Tara E. et al. Chitinase-like proteins promote IL-17-mediated neutrophilia in a tradeoff between nematode killing and host damage. **Nature immunology**, v. 15, n. 12, p. 1116-1125, 2014.

TAN, Li et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 33, 2020.

TANERI, Petek Eylül et al. Anemia and iron metabolism in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **European journal of epidemiology**, v. 35, p. 763-773, 2020.

TAO, Zheyang et al. Anemia is associated with severe illness in COVID-19: a retrospective cohort study. **Journal of medical virology**, v. 93, n. 3, p. 1478-1488, 2021.

TAVARES, Caio de Assis Moura et al. Alterações da ECA2 e Fatores de Risco para Gravidade da COVID-19 em Pacientes com Idade Avançada. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, p. 701-707, 2020.

TERPOS, Evangelos et al. Hematological findings and complications of COVID-19. **American journal of hematology**, v. 95, n. 7, p. 834-847, 2020.

THAKUR, Bhaskar et al. A systematic review and meta-analysis of geographic differences in comorbidities and associated severity and mortality among individuals with COVID-19. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2021.

THOMAS, Tiffany et al. Evidence of structural protein damage and membrane lipid remodeling in red blood cells from COVID-19 patients. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 11, p. 4455-4469, 2020.

TO, Kelvin Kai-Wang et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. **The Lancet infectious diseases**, v. 20, n. 5, p. 565-574, 2020.

TODOROVIĆ-RAKOVIĆ, Nataša; WHITFIELD, Jonathan R. Between immunomodulation and immunotolerance: The role of IFN γ in SARS-CoV-2 disease. **Cytokine**, v. 146, p. 155637, 2021.

TRELA, Malgorzata; NELSON, Paul N.; RYLANCE, Paul B. The role of molecular mimicry and other factors in the association of Human Endogenous Retroviruses and autoimmunity. **Apmis**, v. 124, n. 1-2, p. 88-104, 2016.

TROUILLET-ASSANT, Sophie et al. Type I IFN immunoprofiling in COVID-19 patients. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 146, n. 1, p. 206-208. e2, 2020.

UEMATSU, Satoshi; AKIRA, Shizuo. Toll-like receptors and Type I interferons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 21, p. 15319-15323, 2007.

USUL, Eren et al. Role of hematological parameters in COVID-19 patients in the emergency room. **Biomarkers in Medicine**, v. 14, n. 13, p. 1207-1215, 2020.

VELDHOEN, Marc. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. **Nature immunology**, v. 18, n. 6, p. 612-621, 2017.

VENET, Manon et al. Severe COVID-19 patients have impaired plasmacytoid dendritic cell-mediated control of SARS-CoV-2. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 694, 2023.

VERHELST, Judith; HULPIAU, Paco; SAELENS, Xavier. Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 4, p. 551-566, 2013.

VILLALBA, María Caridad Montalvo et al. Interferon gamma, TGF- β 1 and RANTES expression in upper airway samples from SARS-CoV-2 infected patients. **Clinical Immunology**, v. 220, p. 108576, 2020.

WANG, Aihong et al. Timely blood glucose management for the outbreak of 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) is urgently needed. **Diabetes research and clinical practice**, v. 162, 2020.

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. 1061-1069, 2020.

WANG, Fan, et al. "Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia." **The Journal of infectious diseases** 221.11 (2020): 1762-1769.

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 Leucocyte Biology**, v. 108, n. 1, p. 17-41, 2020.

WATANABE, Akira et al. CD147/EMMPRIN acts as a functional entry receptor for measles virus on epithelial cells. **Journal of virology**, v. 84, n. 9, p. 4183-4193, 2010.

WEI, Lai et al. Viral invasion and type I interferon response characterize the immunophenotypes during COVID-19 infection. 2020.

WITKOWSKI, Mario et al. Untimely TGF β responses in COVID-19 limit antiviral functions of NK cells. **Nature**, v. 600, n. 7888, p. 295-301, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Infection prevention and control of epidemic-and pandemic-prone acute respiratory infections in health care. **WorldHealth Organization**, 2014.

WU, Jun et al. Angiotensin II upregulates Toll-like receptor 4 and enhances lipopolysaccharide-induced CD40 expression in rat peritoneal mesothelial cells. **Inflammation Research**, v. 58, p. 473-482, 2009.

WU, Xianfang et al. Intrinsic immunity shapes viral resistance of stem cells. **Cell**, v. 172, n. 3, p. 423-438. e25, 2018.2018.

XIE, Wenliang et al. A Novel Nomogram Combined the Aggregate Index of Systemic Inflammation and PIRADS Score to Predict the Risk of Clinically Significant Prostate Cancer. **BioMed Research International**, v. 2023, 2023.

XIONG, Yong et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. **Emerging microbes & infections**, v. 9, n. 1, p. 761-770, 2020.

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, 2020.

XUE, Bei; SECHI, Leonardo A.; KELVIN, David J. Human endogenous retrovirus K (HML-2) in health and disease. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 1690, 2020.

YAGHOUBI, Arash et al. TMPRSS2 polymorphism (rs12329760) and the severity of the COVID-19 in Iranian population. **PloS one**, v. 18, n. 2, p. e0281750, 2023.

YANG, Ai-Ping et al. The diagnostic and predictive role of NLR, d-NLR and PLR in COVID-19 patients. **International immunopharmacology**, v. 84, p. 106504, 2020.

YANG, Guang et al. Effects of angiotensin II receptor blockers and ACE (angiotensin-converting enzyme) inhibitors on virus infection, inflammatory status, and clinical outcomes in patients with COVID-19 and hypertension: a single-center retrospective study. **Hypertension**, v. 76, n. 1, p. 51-58, 2020.

YANG, Ming. Cell pyroptosis, a potential pathogenic mechanism of 2019-nCoV infection. **Available at SSRN** 3527420, 2020.

YANG, Wenjie et al. Clinical characteristics and imaging manifestations of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19): a multi-center study in Wenzhou city, Zhejiang, China. **Journal of Infection**, v. 80, n. 4, p. 388-393, 2020.

YANG, Xiaobo et al. Thrombocytopenia and its association with mortality in patients with COVID-19. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 6, p. 1469-1472, 2020.

YAO, Zhixian et al. Immune environment modulation in pneumonia patients caused by coronavirus: SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2. **Aging (Albany NY)**, v. 12, n. 9, p. 7639, 2020.

YAUGEL-NOVOA, Melyssa et al. Association of IFNAR1 and IFNAR2 with COVID-19 severity. **The Lancet Microbe**, 2023.

YE, Qing; WANG, Bili; MAO, Jianhua. The pathogenesis and treatment of the Cytokine Storm in COVID-19. **Journal of infection**, v. 80, n. 6, p. 607-613, 2020.

YIN, Shiyu et al. Difference of coagulation features between severe pneumonia induced by SARS-CoV2 and non-SARS-CoV2. **Journal of thrombosis and thrombolysis**, v. 51, p. 1107-

1110, 2021.

YIN, YUDONG; WUNDERINK, RICHARD G. MERS, SARS and other YUKI, Koichi; FUJIOGI, Miho; KOUTSOGIANNAKI, Sophia. COVID-19 pathophysiology: A review. **Clinical immunology**, v. 215, p. 108427, 2020.

YUN, Hu et al. Laboratory data analysis of novel coronavirus (COVID-19) screening in 2510 patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 507, p. 94-97, 2020.

ZALINGER, Zachary B. et al. MDA5 is critical to host defense during infection with murine coronavirus. **Journal of virology**, v. 89, n. 24, p. 12330-12340, 2015.

ZHANG et al. "Clinical, radiological, and laboratory characteristics and risk factors for severity and mortality of 289 hospitalized COVID-19 patients." **Allergy** 76.2 (2021): 533-550.

ZHANG, Huan-ping et al. Recent developments in the immunopathology of COVID-19. **Allergy**, v. 78, n. 2, p. 369-388, 2023

ZHANG, Huilan et al. Histopathologic changes and SARS-CoV-2 immunostaining in the lung of a patient with COVID-19. **Annals of internal medicine**, v. 172, n. 9, p. 629-632, 2020.

ZHANG, Jin-jin et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. **Allergy**, v. 75, n. 7, p. 1730-1741, 2020.

ZHANG, Jin-jin et al. Clinical, radiological, and laboratory characteristics and risk factors for severity and mortality of 289 hospitalized COVID-19 patients. **Allergy**, v. 76, n. 2, p. 533-550, 2021.

ZHANG, Jin-jin et al. Risk and protective factors for COVID-19 morbidity, severity, and mortality. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 64, n. 1, p. 90-107, 2023.

ZHANG, Jintao; ZHAO, Chunyuan; ZHAO, Wei. Virus caused imbalance of type I IFN responses and inflammation in COVID-19. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 633769, 2021.

ZHANG, Lin et al. Retrospective analysis of clinical features in 134 coronavirus disease 2019 cases. **Epidemiology & Infection**, v. 148, p. e199, 2020.

ZHANG, Mengwen; LIANG, Jessie Qiaoyi; ZHENG, Shu. Expressional activation and functional roles of human endogenous retroviruses in cancers. **Reviews in medical virology**, v. 29, n. 2, p. e2025, 2019.

ZHANG, Qian et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. **Science**, v. 370, n. 6515, 2020.

ZHANG, Wen et al. The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): The Perspectives of clinical immunologists from China. **Clinical immunology**, v. 214, p. 108393, 2020.

ZHANG, Zu-Li et al. Laboratory findings of COVID-19: a systematic review and meta-

analysis. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 80, n. 6, p. 441-447, 2020.

ZHOU, Fang. Molecular mechanisms of IFN- γ to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. **International reviews of immunology**, v. 28, n. 3-4, p. 239-260, 2009.

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, 2020.

ZHOU, Ji et al. Clinical characteristics of re-positive COVID-19 patients in Huangshi, China: A retrospective cohort study. **PloS one**, v. 15, n. 11, p. e0241896, 2020.

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

ZHOU, Yonggang et al. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. **National Science Review**, v. 7, n. 6, p. 998-1002, 2020.

ZHU, Zhe et al. Clinical value of immune-inflammatory parameters to assess the severity of coronavirus disease 2019. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 95, p. 332-339, 2020.

ZSICHLA, Levente; MÜLLER, Viktor. Risk Factors of Severe COVID-19: A Review of Host, Viral and Environmental Factors. **Viruses**, v. 15, n. 1, p. 175, 2023.

ANEXOS

Anexo 1. Ficha clínica aplicada nas visitas domiciliares

FICHA CLÍNICA

Nº _____ Aplicado por: _____ Data da coleta: ____/____/____

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____
 Nome da mãe: _____
 Endereço: _____
 Bairro: _____ Cidade: _____
 CEP: _____ Estado: _____
 Telefone: _____ Profissão: _____
 Naturalidade: _____
 Data de Nascimento: ____/____/____

VARIÁVEIS SOCIOECONÔMICAS E SOCIODEMOGRÁFICAS

1 Idade: _____ **2 Sexo:** (0) Masculino (1) Feminino
3 Raça/Cor (autorreferida): (0) Amarelo (1) Branco (2) Preto (3) Pardo
4 Escolaridade: (0) Pós-graduação (1) Ens. superior completo (2) Ens. superior incompleto
 (3) 2º grau completo (4) 2º grau incompleto (5) Ens. fundamental completo (6) Ens. fundamental
 incompleto (7) Analfabeto
5 Anos de estudos: _____
6 Ocupação atual: (0) Desempregado (1) Empregado (2) Aposentado (3) Autônomo (4) Não
 trabalha (5) Outro. Qual? _____
7 Se empregado(a), qual a ocupação atual: _____
8 Possui renda própria? (0) Sim (1) Não.
9 Renda familiar em salários mínimos: (0) 1 (2) <1 (3) 1 a 2 (4) 3 ou mais
10 Número de moradores em sua residência: _____
11 Estado civil: (0) Solteiro (1) Casado (2) Viúvo (3) Divorciado (4) União estável

VARIÁVEIS DE ESTILO DE VIDA

12 É fumante? (0) Não (1) Sim. (2) Ex-fumante.
13 Em caso positivo, há quanto tempo? _____. **E qual a quantidade de cigarros/dia?** _____
14 Se ex-fumante, por quanto tempo fumou? _____ **E há quanto tempo parou de fumar?** _____
15 Consumo de bebida alcoólica: (0) Não (1) Sim (2) Já consumi
 Tipo de bebida: _____. Tempo de consumo (em anos): _____
16 Prática de atividade física: (0) Não (1) Sim **17 Em caso positivo, qual tipo de atividade?**
 _____. **E qual frequência/semana?** _____.

VARIÁVEIS DE CONDIÇÃO DE SAÚDE	
--------------------------------	--

18 Tosse seca: (0) Não (1) Sim	21 Temp.: (0) $\leq 37,5^{\circ}\text{C}$ (1) $>37,5^{\circ}\text{C} \leq 39^{\circ}\text{C}$ (2) $> 39^{\circ}\text{C}$
---------------------------------------	--

19 Tosse produtiva: (0) Não (1) Sim	22 Febre: (0) Não (1) Sim
--	----------------------------------

20 Dispneia: (0) Não (1) Sim	23 Mialgia ou fadiga: (0) Não (1) Sim
-------------------------------------	--

24 Hipertensão arterial? (0) Não (1) Sim. Medicação: _____.

25 Diabetes? (0) Não (1) Sim. Tipo: _____. Medicação: _____.

26 Doença renal? (0) Não (1) Sim. Qual? _____. Medicação: _____.

27 Doença cardiovascular? (0) Não (1) Sim Medicação: _____.

28 Doença hepática? (0) Não (1) Sim Medicação: _____.

29 Síndrome do ovário policístico? (0) Não (1) Sim

30 Doença Pulmonar (asma/tuberculose/bronquite/pneumonia/enfisema/DPOC)? (0) Não (1) Sim Qual? _____. Medicação: _____.

31 Alergia? (0) Não (1) Sim. Qual? _____.

32 Obesidade? (0) Não (1) Sim

33 Doença autoimune? (0) Não (1) Sim Qual? _____.

34 Neoplasia maligna (câncer)? (0) Não (1) Sim Qual? _____.

35 Doença neurológica (Alzheimer, Parkinson, Epilepsia, Demência, etc.)? (0) Não (1) Sim Qual? _____.

36 Doença hematológica? (0) Não (1) Sim Qual? _____.

37 Possui alguma outra doença não citada anteriormente? (0) Não (1) Sim Qual? _____.

37 Usa algum outro tipo de medicamento não citado anteriormente? (0) Não (1) Sim Qual(s)? _____.

OBSERVAÇÕES

Método diagnóstico:

Início dos sintomas:

Outros sintomas:

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
 Autorizada pelo Decreto Federal Nº 77.498 de 27/04/76
 Reconhecida pela Portaria Ministerial Nº 874/86 de 19/12/86

PROJETO: Estudo da assinatura molecular para a determinação da gravidade da doença do coronavírus 2019 (COVID-19)

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Soraya Castro Trindade

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Para ser lido para/por todos os participantes do estudo

As informações a seguir descrevem o estudo e os seus direitos como participante. Além do que for aqui esclarecido, o entrevistador poderá responder qualquer questão que você tenha referente ao estudo. Por favor, leia ou ouça com atenção e, sempre que achar necessário, interrompa para perguntar.

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa "Estudo da assinatura molecular para a determinação da gravidade da doença do coronavírus 2019 (COVID-19)". Antes de decidir participar, dedique um tempo para ler cuidadosamente as informações seguintes e, se preferir, peça para alguém de sua confiança ler para você. Se você desejar, pense melhor em casa, converse com seus familiares, amigos ou com seu médico. Pergunte-nos se houver qualquer coisa que não esteja clara ou se precisar de mais informações.

A COVID-19 é uma doença viral (virose) que se caracteriza por uma inflamação de todo o seu corpo e de seus pulmões. O estudo das células e moléculas envolvidas no processo inflamatório é importante para compreender melhor a atividade dessa doença e seus fatores de risco, inclusive os fatores genéticos. Os resultados desta pesquisa nos ajudarão a ter uma melhor compreensão da COVID-19 e poderão possibilitar um crescimento científico relacionado a esse tema, inclusive influenciando na forma de prevenir e tratar a doença aqui estudada.

O objetivo deste estudo é identificar componentes do sistema imune humano que atuam em casos mais graves da doença. Para tanto, serão realizados, no momento do seu atendimento médico, em local reservado, respeitando sua privacidade:

- a) preenchimento de questionário com perguntas sobre sua saúde;
- b) exame clínico para diagnóstico da doença, realizado por um (a) médico (a) participante da pesquisa (pesquisador);
- c) coleta de uma amostra de sangue do seu braço (exame de sangue comum), realizada por um (a) profissional capacitado (a) e treinado (a) para a coleta;
- d) coleta da secreção do seu nariz e da sua boca de forma delicada, sem dor.

Seus dados são confidenciais. O questionário de saúde, a ficha do exame clínico e este documento serão guardados em sigilo na universidade sob a responsabilidade da pesquisadora responsável por 05 anos após o término da pesquisa e serão descartados após esse período. Sua identidade nunca será revelada.

As secreções do seu nariz e da sua boca serão utilizadas para verificar a presença do vírus em seu organismo. O sangue coletado será utilizado para se obter o soro que será testado na pesquisa para observar os níveis de anticorpos e componentes inflamatórios do seu organismo. Solicitamos aqui a sua autorização para coleta e utilização do seu sangue para esta pesquisa. **Todo o material coletado (amostras) será descartado após o término da pesquisa (não será armazenado).**

 Hubrica do pesquisador

Durante a coleta de sangue do seu braço, você poderá sentir dor. A intensidade da dor varia entre cada indivíduo, porém é uma dor suportável. Quanto mais tranquilo (a) você estiver, menos doloroso será o procedimento.

Após a coleta, pode-se formar um hematoma (ficar um pouco roxo) ou ficar dolorido, mas o (a) pesquisador (a) que realizará a coleta dispõe de meios para contornar esses efeitos indesejáveis.

Você pode possuir uma alteração na coagulação da qual não tenha conhecimento, podendo apresentar sangramento além do esperado após a coleta de sangue. O (a) pesquisador (a) realizará os procedimentos para conter o sangramento e você será levado ao atendimento médico necessário sem nenhum custo para você, recebendo o suporte do (a) pesquisador (a) responsável. Lembre-se que o (a) profissional está capacitado (a) para o procedimento e para evitar tais complicações e para contorná-las caso ocorram. Faça perguntas sobre essas complicações para o (a) profissional a fim de se tranquilizar.

Participando desta pesquisa, você não receberá nenhum tipo de benefício material, como dinheiro, mas estará contribuindo para a elaboração de um trabalho científico que poderá proporcionar benefícios futuros à sociedade. Os profissionais de saúde envolvidos na pesquisa realizarão o seu tratamento. Como você é um paciente do serviço de saúde, sua participação ocorrerá no horário do atendimento médico, então você não terá custo adicional com sua participação.

Os resultados dessa pesquisa podem ajudar no desenvolvimento, pelos serviços de saúde, de ações voltadas para prevenção e tratamento da COVID-19; as quais trarão benefícios futuros para você, sua família e sua comunidade.

Vale ressaltar que, a qualquer momento, você poderá fazer perguntas sobre esta pesquisa com a garantia de que serão respondidas. Tem a liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si, podendo entrar em contato com os pesquisadores desta pesquisa para pedir que os seus dados sejam retirados da mesma, sem qualquer prejuízo para o seu atendimento médico.

Os dados obtidos neste estudo serão apresentados em congressos e encontros da comunidade científica e serão publicados em revistas especializadas. No entanto, a sua identidade nunca será revelada.

Caso ocorram danos a sua saúde causados diretamente pela pesquisa, a mesma será interrompida e os pesquisadores farão os encaminhamentos necessários. Nenhum custo será cobrado a você, pois será coberto pelo orçamento da pesquisa. Você tem o direito a buscar indenização. Vale ressaltar que o risco de danos causados pela sua participação na pesquisa é baixo, pois serão realizados procedimentos médicos que já seriam realizados na sua avaliação clínica e laboratorial.

Para o esclarecimento de dúvidas sobre o projeto, você pode entrar em contato com a pesquisadora Soraya Castro Trindade no telefone (71) 99983-3870 ou ligue (75) 3161-8112 (NUPPIIM-UEFS).

Estando de acordo, assinem:

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura do pesquisador

Local e Data: _____

Pesquisadora responsável: Soraya Castro Trindade.
NUPPIIM - UEFS. Campus Universitário, Feira de Santana - Bahia.
BR-116, quilômetro 3, avenida Universitária, sem número.

Anexo: ARTIGO SUBMETIDO REVISTA CLINICAL IMMUNOLOGY COMMUNICATIONS (ISSN 2772-6134)

Investigation of Systemic Immune-Inflammation Indexes and IFN-Related Gene Expression in COVID-19 Severity: An Observational Study.

Nívia N. Silva^{a,b†}, Fabiane S. Reis-Goes^{a,b†}, Gondim, T.^b, Ricardo G. Figueiredo^c, Gabriella de A. O. Evangelista^d, Ryan S. Costa^a, Roberto Jose Meyer^{a,b}, Costa, S.L.^{a,b} Soraya C. Trindade^{b,e}, Vitor Fortuna^{a,b}

^a Department of Biochemistry and Biophysics, Health Sciences Institute, Federal University of Bahia, Brazil

^b Postgraduate Program in Immunology, Health Sciences Institute, Federal University of Bahia, Brazil

^c Postgraduate Program in Collective Health, State University of Feira de Santana, Brazil

^d Couto Maia Institute Hospital, Bahia, Brazil

^e Postgraduate Program in Biotechnology, State University of Feira de Santana, Bahia, Brazil

Corresponding author: Vitor Fortuna, Federal University of Bahia (UFBA), Avenida Reitor Miguel Calmon, Vale do Canela, 40.110-100 Salvador, Bahia, Brazil.

E-mail address: vfort@ufba.br

† These authors contributed equally to this work.

Highlights:

- Severe COVID-19 patients exhibit elevated levels of immune-inflammatory indexes and cytokine expression, indicating systemic inflammation and an exaggerated immune response.
- Blood-based systemic inflammation indexes, such as SII and SII/Hb, but not AISI, show potential as prognostic tools to differentiate between mild and severe cases of COVID-19.
- The up-regulation of IFNA1 and IL17A and the down-regulation of IFNAR1 in peripheral blood leukocytes were associated with severe cases and demonstrated high prognostic efficacy in predicting COVID-19 severity.
- Plasmatic levels of IFNG do not differ significantly between mild and severe COVID-19 cases, suggesting it may not be a reliable biomarker for disease severity.

Abstract:

Despite progress in vaccination and protective measures, severe outcomes in COVID-19 patients continue to raise concerns. Early prediction and accurate prognosis are crucial for managing severe cases. Interferons (IFNs) play a crucial role in the immune response against viral infections, but their expression and association with COVID-19 severity remain not fully understood. This study aimed to investigate the potential association between systemic immune-inflammation indexes, gene expression of IFNA1, IFN receptors, IL17A, and plasmatic IFN-gamma in COVID-19 patients to differentiate between mild and severe cases. This observational study included 67 eligible COVID-19 patients divided into mild (n=28) or severe (n=39) cases. Demographic, clinical, and laboratory data were collected, and gene expression analysis was conducted on isolated blood leukocytes using RT-qPCR assay. Plasma IFNG levels were measured with ELISA assay. Severe COVID-19 patients were predominantly males (61.5%) and belonged to the black ethnic group (87.2%). They were, on average, 17.4 years older than patients with mild COVID-19 ($p < 0.0001$). The systemic immune-inflammation index (SII), SII/hemoglobin (Hb) ratio, and aggregate index of systemic inflammation (AISI) were significantly higher in severe COVID-19 patients ($p < 0.0001$). Severe patients exhibited significant up-regulation of IFNA1 and IL17A ($p < 0.05$ and $p < 0.001$), while IFNAR1 expression was higher in mild cases ($p < 0.05$). ROC curve analysis demonstrated the high

predictive value of the SII index and SII/hemoglobin ratio in discriminating severe COVID-19 patients. Plasma levels of interferon-gamma (IFNG) showed no significant difference. The study suggests that gene expression levels of IFNA1, IFNAR1, and IL17A, along with routine blood parameters, can potentially serve as biomarkers for predicting disease severity in COVID-19 patients. The SII and SII/Hb ratios were highly effective prognostic parameters, aiding in risk stratification and personalized treatment approaches. Further research is necessary to validate these findings and explore their clinical implications.

Key-words: COVID-19; Systemic Immune-inflammation Index; IFNA1; IL17A.