



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**PATOBIOLOGIA DOS PACIENTES COM SÍNDROME GRIPAL LEVE E
MODERADA DA COVID-19 EM COMPARAÇÃO COM PACIENTES SEM
COVID-19 E CONTROLES SAUDÁVEIS**

RAFHAELLA NOGUEIRA DELLA GUARDIA GONDIM

FORTALEZA/CE

2022

RAFHAELLA NOGUEIRA DELLA GUARDIA GONDIM

**PATOBIOLOGIA DOS PACIENTES COM SÍNDROME GRIPAL LEVE E
MODERADA DA COVID-19 EM COMPARAÇÃO COM PACIENTES SEM
COVID-19 E CONTROLES SAUDÁVEIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

FORTALEZA/CE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G635p Gondim, Rafaella Nogueira Della Guardia.
Patobiologia dos pacientes com síndrome gripal leve e moderada da COVID-19 em comparação com pacientes sem COVID-19 e controles saudáveis / Rafaella Nogueira Della Guardia Gondim. – 2022.
102 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, 0, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

1. COVID-19. 2. SARS-CoV-2. 3. BIOMARCADORES. I. Título.

CDD

RAFHAELLA NOGUEIRA DELLA GUARDIA GONDIM

**PATOBIOLOGIA DOS PACIENTES COM SÍNDROME GRIPAL LEVE E
MODERADA DA COVID-19 EM COMPARAÇÃO COM PACIENTES SEM
COVID-19 E CONTROLES SAUDÁVEIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aldo Ângelo M Lima (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Érico Antonio Gomes de Arruda
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Jeová Keny Baima Colares
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profa. Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Mariana Silva Lima
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Aos meus filhos, Daniel e Davi

AGRADECIMENTO

Agradeço a primeiramente a Deus, aos meus filhos e ao meu esposo por serem a minha maior fonte de inspiração, por todo amor, companheirismo e suporte diário. Agradeço também, aos meus pais e aos meus irmãos por toda intercessão e torcida.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, por ser exemplo de humildade e amor a pesquisa. Agradeço a oportunidade dada, pelo compartilhamento de tantos ensinamentos e pela sua confiança em mim para a realização desse trabalho.

Agradeço de forma especial a minha amiga Lyvia, e a todos que contribuíram diretamente no desenvolvimento e finalização do meu trabalho, são eles: Prof. Alex, Marco Clementino, Virgínia, Samilly, Kleybson, Quirino, Júnior e Pedro Quintela. Obrigada pela parceria, correções, discussões e paciência.

Agradeço aos meus colegas de laboratório LDI / LTM e a toda equipe do INCT, UPC-NUBIMED pelo compartilhamento de conhecimentos, por toda ajuda e por terem ajudado no meu crescimento científico e pessoal, em especial Charliene, Luciana, Terezinha, José, Fabiana, Charles e Kátia.

Um agradecimento especial aos nossos parceiros no LACEN, nas pessoas da Dra. Liana Perdigão, Karene e Vânia; aos funcionários do HEMOCE, em especial Dra. Luciana e Carolina; e aos médicos e funcionários do Hospital São José.

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFC, Prof. Dr. Reinaldo Oriá e Ivone por sempre estarem disponíveis para qualquer esclarecimento.

Agradeço a FUNCAP, pelo suporte financeiro durante todo o período do doutorado.

Agradeço a todos os envolvidos no projeto ARTAN-C19, e principalmente os participantes do estudo, por contribuírem no avanço da pesquisa.

A todos, MUITO OBRIGADA!

*"Tomai meu jugo sobre vós e recebei minha doutrina,
porque eu sou manso e humilde de coração
e achareis o repouso para as vossas almas.
Porque meu jugo é suave e meu peso é leve". (Mt 11, 29-30)*

RESUMO

Infeções do trato respiratório estão entre as principais causas de hospitalização em todo o mundo. No final de 2019, na cidade de Wuhan/China, uma doença de etiologia viral causada pelo SARS-CoV-2 disseminou-se pelo mundo, e a pandemia de COVID-19 foi declarada pela Organização Mundial de Saúde. A COVID-19 é uma doença que apresenta um quadro clínico que varia de infecções assintomáticas a quadros respiratórios graves. Dessa forma, vários biomarcadores têm sido avaliados como preditivos da gravidade ou para direcionar seu tratamento. Contudo, essa relação ainda não está bem estabelecida. Neste estudo, buscamos biomarcadores inflamatórios que pudessem estar associados à COVID-19. Avaliamos os níveis séricos de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento celular em pacientes sintomáticos para síndrome gripal leve à moderada que buscaram atendimento em ambulatório hospitalar, sendo 113 positivos para SARS-CoV-2 e 58 negativos. Ainda, os dados foram comparados a um grupo controle, com 53 participantes assintomáticos (grupo controle). Os participantes sintomáticos e negativos para SARS-CoV-2 tiveram as amostras verificadas para a presença de outros vírus causadores de doenças respiratórias (Influenza A, B e Vírus Sincicial Respiratório). Como resultado, verificou-se que um perfil elevado de citocinas inflamatórias como IL-1 β , MCP-3, TNF- α e G-CSF nos participantes com sintomas gripais leves a moderados, enquanto a IL-10 e a IL-6 foram associadas apenas a presença da SARS-CoV-2 quando comparadas aos assintomáticos. Os indivíduos com COVID-19 apresentaram associação com sintomas de febre, anosmia, ageusia e mialgia, contudo os participantes sintomáticos negativos para SARS-CoV-2 tiveram maior prevalência de dor de garganta. Além disso, 5% (4/83) das amostras dos participantes que testaram negativo para SARS-CoV-2 apresentaram resultado positivo para vírus Sincicial Respiratório. Os dados fornecidos pela pesquisa, quando associados a caracterização da patobiologia da doença leve a moderada, fornecem elementos para a caracterização da influência das alterações biológicas pró e anti-inflamatórias na avaliação clínica da COVID-19.

Palavras-chave: COVID-19, SARS-COV-2, Biomarcadores.

ABSTRACT

Respiratory tract infections are one of the leading causes of hospitalization worldwide. At the end of 2019, in the city of Wuhan/China, a disease of viral etiology, caused by SARS-CoV-2, spread around the world and the COVID-19 pandemic was declared by the WHO. COVID-19 is a disease that presents a clinical picture that varies from asymptomatic infections to severe respiratory conditions, thus, several biomarkers have been evaluated as predictors of severity or to direct its their treatment, however, this relationship is not yet well established. In this study, we evaluated the serum levels of cytokines, chemokines and cell growth factors associated with the pathobiology of COVID-19 in symptomatic individuals for mild to moderate flu syndrome who sought outpatient hospital care, which could act as inflammatory biomarkers of the disease. These levels were compared between individuals divided into 3 groups, they are: 113 positives for COVID-19; 58 negatives for COVID-19 (both groups confirmed by RT-qPCR testing of nasal swab samples); and 53 asymptomatic participants (control group). Symptomatic participants negative for SARS-CoV-2 also had their samples checked for the presence of other viruses that cause respiratory diseases (Influenza A, B and Respiratory Syncytial Virus). As a result of the analyses, it was found that a profile of inflammatory cytokines such as IL-1 β , MCP-3, TNF- α and G-CSF, were elevated in participants with mild to moderate flu-like symptoms, while IL-10 and IL-6 were associated only with the presence of SARS-CoV-2 when compared to asymptomatic individuals. Individuals with COVID-19 had an association with symptoms of fever, anosmia, ageusia, and myalgia, however, symptomatic non-COVID-19 participants had a prevalence of sore throat. In addition, 5% (4/83) of samples from participants who tested negative for COVID-19 tested positive for Respiratory Syncytial Virus. The data provided by the research, when associated with the characterization of the pathobiology of mild to moderate disease, provide elements for the characterization of the influence of pro- and anti-inflammatory biological changes in the clinical evaluation of COVID-19.

Keywords: Coronavirus SARS-CoV-2, COVID-19, biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação do Coronavírus (ICTV).....	21
Figura 2 - Estrutura do genoma do SARS-CoV-2.....	22
Figura 3 - Estrutura molecular do SARS-CoV2 e interação com o receptor celular ECA2..	22
Figura 4 - Fluxograma de recrutamento dos participantes.....	40
Figura 5 - <i>Primes e probes</i> utilizados no PCR SARS-CoV-2	42
Figura 6 – Mapa da cidade de Fortaleza/Ceará/Brasil e localização do estudo clínico.....	46
Figura 7 A e B – Comparativo da concentração plasmática dos biomarcadores avaliados no estudo, entre os grupos de participantes selecionados.....	50
Figura 8 – - Modelo da patobiologia da infecção humana respiratória leve a moderada por SARS-CoV-2.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características sociais e epidemiológicas dos participantes do estudo	47
Tabela 2 - Sinais e sintomas clínicos leves a moderados dos participantes sintomáticos.....	48
Tabela 3 - Níveis séricos dos biomarcadores analisados nos participantes do estudo.....	49
Tabela 4 - Exames Complementares dos grupos sintomáticos analisados.....	52
Tabela 5 - Avaliação do nível de IgG / IgM COVID-19 dos participantes sintomáticos.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ECA – 2	Enzima conversora de angiotensina - 2
G-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
HCoV	Coronavírus Humano
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IFN	Interferon
ITR	Infecções do trato respiratório
LPS	Lipopolissacarídeos
MCP	Proteína Quimioatratadora de Monócitos
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa Beta
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NSP	Proteínas Não Estruturais
ORF	Quadros de Leitura Aberta
PCT	Procalcitonina
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
PRRs	Receptor de Reconhecimento de Padrões
SAM	Síndrome de Ativação Macrofágica
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SRALM	Síndrome Respiratória Aguda Leve a Moderada
TGO	Transaminase Oxalacética
TGP	Transaminase Pirúvica
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VSR	Vírus Sincicial Respiratório

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Infecções Respiratórias.....	15
1.2	Pandemia de SARS-CoV-2.....	16
1.3	Coronavírus.....	20
1.4	Biomarcadores inflamatórios	23
1.4.1	G-CSF.....	25
1.4.2	IL-10.....	25
1.4.3	IL-1 β	27
1.4.4	IL1-RA.....	28
1.4.5	IL-6.....	28
1.4.6	MCP-1.....	29
1.4.7	MCP-3.....	31
1.4.8	IP-10.....	31
1.4.9	IFN- γ	32
1.4.10	TNF- α	33
1.4.11	Procalcitonina.....	34
1.5	Justificativa.....	36
2	HIPÓTESES.....	37
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	Objetivo Geral.....	38
3.2	Objetivos Específicos.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1	Aspectos éticos e Delineamento do Estudo	39
4.2	Caracterização da população do estudo.....	39
4.3	Coleta e processamento das amostras.....	40
4.4	Diagnóstico molecular de SARS-CoV-2.....	41
4.5	Análise de Citocinas, Quimiocinas e Fatores de Crescimento.....	42
4.6	Diagnóstico molecular para outros agentes infecciosos.....	43
4.7	Deteção de anticorpos específicos para SARS-CoV-2.....	44
4.8	Análise de Dados.....	44
5	RESULTADOS.....	45
6	DISCUSSÃO.....	54

7 CONCLUSÃO.....	67
8 REFERÊNCIAS.....	68
ANEXOS.....	91
ANEXO A - Curvas padrões utilizados nas quantificações dos biomarcadores avaliados.....	92
ANEXO B- Lista de publicações dos últimos 5 anos.....	100
ANEXO C - Parecer consubstanciado de aprovação do CEP projeto ARTAN-C19.....	101
ANEXO D - Parecer consubstanciado de aprovação do CEP da tese.....	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções Respiratórias

As infecções do trato respiratório (ITR) estão entre as principais causas de hospitalização em todo o mundo, e podem ser causadas por um grupo heterogêneo de vírus e bactérias que produzem apresentações clínicas semelhantes (DEBBIA et al., 2001; WARD et al., 2004; MCDONOUGH et al., 2005). Uma grande proporção de ITRs é causada por vírus respiratórios, incluindo Influenza A (FluA) e B (FluB), vírus Parainfluenza 1-4 (PIV1-4), vírus Sincicial Respiratório (VSR), Rinovírus (RhV), Enterovírus (EnV) e Adenovírus (AdV) (JUVEN et al., 2000; LEGG et al., 2005; WEIGL et al., 2005). Além disso, tem sido cada vez mais comum epidemias de vírus emergentes como a do Coronavírus 2002-2003 (SARS-CoV), e a mais recente por SARS-CoV-2 (MORIYAMA et al., 2020). Dentre outros fatores, diferentes níveis de carga viral podem resultar em uma variedade de sintomas, desde uma bronquite comum a uma pneumonia fatal (LI et al., 2010; TORRES et al., 2010; MARTIN et al., 2012; TAKEYAMA et al., 2012).

Os vírus respiratórios compartilham semelhanças em seus mecanismos de transmissão, como gotículas grandes, aerossóis ou fômites (MACINTYRE et al., 2009). Esses vírus são responsáveis por 15% a 56% dos casos de pneumonia adquirida na comunidade (PAC) por adultos (RUUSKANEN et al., 2011; JAIN et al., 2015).

O diagnóstico etiológico específico depende quase inteiramente de exames laboratoriais. Os ensaios de detecção rápida de antígenos são amplamente usados em laboratórios de diagnóstico de rotina (CASIANO-COLON et al., 2003; FERNANDEZ-SABE et al., 2003), também projetados para rastrear uma ampla gama de patógenos. Reconhecer os agentes causadores da infecção também pode fornecer informações sobre as medidas apropriadas de controle, reduzindo hospitalizações e permitindo a descontinuação de antibióticos desnecessários (FERRONATO et al., 2012; GARCIA-GARCIA et al., 2012; TANDAY et al., 2016).

Jain et al., (2015), relatou que entre os adultos hospitalizados com PAC, patógenos foram detectados em 38% dos pacientes, sendo os principais VSR (9%) e vírus Influenza (6%). Os patógenos prevalentes também podem diferir de acordo com a região geográfica, o clima, a estação e o ano, além da faixa etária (JAIN et al., 2015). Em resumo, as infecções por vírus respiratórios são altamente prevalentes, e os testes de identificação podem melhorar

a compreensão do seu papel nas doenças respiratórias, contribuindo para um melhor manejo clínico (HUIJSKENS et al., 2012).

1.2 Pandemia de COVID-19

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em dezembro de 2019, foi alertada sobre um aumento nos casos de pneumonia na cidade de Wuhan, província de Hubei, China. Em janeiro de 2020, apenas algumas semanas depois, as autoridades chinesas confirmaram a identificação do novo Coronavírus, que foi denominado como SARS-CoV-2 (OPAS, 2022).

A Síndrome Respiratória Aguda causada pelo Coronavírus-19 (COVID-19) disseminou-se mundialmente, e a OMS declarou pandemia em março de 2020. A pandemia ocasionada pelo SARS-CoV-2 apresentou altas taxas de morbidade e mortalidade nos últimos dois anos, junto à uma paralisação a nível global (ZHOU et al., 2020).

Em junho de 2022, contabilizavam-se 525.226.550 casos confirmados de COVID-19, incluindo 6.334.728 mortes relatadas à OMS, a nível mundial. No Brasil, somavam-se mais de 32.282.879 casos confirmados da doença com mais de 671.125 mortes (OMS, 2022). Na cidade de Fortaleza/CE, 355.084 casos de residentes foram confirmados, por critério laboratorial, até o dia 11 de julho de 2022; entre eles 11.389 óbitos registrados por COVID-19 (CEARÁ, 2022).

A transmissão da COVID-19 ocorre por gotículas / aerossóis gerados ao tossir e espirrar por pacientes infectados, sintomáticos ou não (ROTHER et al., 2020). Estudos mostraram maior carga viral na cavidade nasal em comparação com a orofaringe, porém sem diferença entre sintomáticos e assintomáticos (ZOU et al., 2020). A infecção é adquirida por inalação dessas gotículas ou contato com superfícies contaminadas, e em seguida ao tocar o nariz, a boca e os olhos (SINGHAL et al., 2020). Os fatores que influenciam a sobrevivência do vírus nas superfícies dependem de várias condições, como o número de vírus depositados (carga viral), o tipo de superfície, meio de suspensão, temperatura, umidade relativa e outros (CARINCI et al., 2020). Porém, estudos recentes relatam que este tipo de transmissão só é possível em condições de muito alta humidade, dificilmente verificável nos ambientes da vida real e de fômites contaminados por gotículas do SARS-CoV-2 (MEISTER et al., 2022; ROCHA et al., 2021).

O diagnóstico diferencial para a COVID-19 inclui todos os tipos de infecções respiratórias virais [Influenza, Parainfluenza, vírus Sincicial Respiratório (RSV), Adenovírus, Metapneumovírus humano, Coronavírus não-COVID-19], bactérias causadoras

de pneumonia atípica (micoplasma, clamídia) e outras infecções bacterianas. Não é possível diferenciar a COVID-19 dessas infecções, clinicamente ou através de exames laboratoriais de rotina. Inicialmente, a relação com viagens tinha relevância. No entanto, à medida que transmissão comunitária se consolidou, as histórias de viagens tornaram-se pouco relevantes (SINGHAL et al., 2020).

O principal teste de diagnóstico laboratorial é realizado por biologia molecular, permitindo identificar a presença do material genético (RNA) do vírus SARS-CoV-2 em amostras de secreção respiratória. As técnicas de amplificação utilizadas atualmente são a reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) e amplificação isotérmica mediada por *loop* com transcriptase reversa (RT-LAMP) (BRASIL, 2022).

Quanto ao diagnóstico por imagem, pode ser utilizada a tomografia computadorizada de alta resolução – TCAR, na qual observam-se as seguintes alterações tomográficas compatíveis com casos de COVID-19: opacidade em vidro fosco periférico, bilateral, com ou sem consolidação ou linhas intralobulares visíveis (“pavimentação”); opacidade em vidro fosco multifocal de morfologia arredondada com ou sem consolidação ou linhas intralobulares visíveis (“pavimentação”) e; sinal de halo reverso ou outros achados de pneumonia em organização (observados posteriormente à doença) (BRASIL, 2022).

Atualmente, as modalidades diagnósticas não fornecem informações sobre infecção em tecidos específicos e não revelam a presença ou extensão da resposta inflamatória associada à gravidade (SCHNEIDER, 2022).

A patologia clínica da COVID-19 pode ser categorizada em estágios: leve, grave e crítico (HE et al., 2020). Na infecção leve, o paciente pode ou não desenvolver pneumonia, às vezes com sintomas de infecção respiratória superior, marcada por febre baixa, tosse seca, e outros sintomas gripais (XU et al., 2020.1). Em casos mais graves, pode ocorrer dispnéia, tosse produtiva, falta de ar e hipoxia, que normalmente se desenvolvem dentro de 24 a 48 horas desde os sintomas iniciais. O estágio crítico é marcado por pneumonia grave, insuficiência respiratória, parada cardiorrespiratória e/ou falência múltipla de órgãos, e leva ao óbito (GANESH et al. 2021).

A COVID-19 é uma doença sistêmica e suas complicações podem incluir, nos casos mais graves, pneumonia e tromboembolismo pulmonar (DOCHERTY et al., 2020). Ainda, pode ocorrer um aumento no risco cardiovascular (DOCHERTY et al., 2020; SATTAR et al., 2020), inflamação e disfunção endotelial (LIBBY et al., 2020; GUZIK et al., 2020). Essas disfunções microvasculares provavelmente desempenham um papel fundamental na

alteração da homeostase de múltiplos órgãos, especialmente pulmão, coração e rim (MORROW et al., 2022).

O quadro clínico inicial da doença é caracterizado como Síndrome Gripal (SG). O diagnóstico pode ser feito por investigação clínico-epidemiológica, anamnese e exame físico adequado do paciente. As características clínicas não são específicas e podem ser similares àquelas causadas por outros vírus respiratórios, que também ocorrem sob a forma de surtos e, eventualmente, circulam ao mesmo tempo, tais como Influenza, Parainfluenza, Rinovírus, Vírus Sincicial Respiratório, Adenovírus, outros Coronavírus humanos, entre outros. Segundo a ANVISA, a SG pode ser definida como a presença de febre, mesmo que referida, acompanhada de tosse e/ou dor de garganta, com quadro iniciado nos últimos 7 dias. Em crianças menores de 2 anos de idade, considera-se também febre de início súbito associada de tosse, coriza e/ou obstrução nasal, na ausência de outro diagnóstico específico (BRASIL, 2022).

Embora a COVID-19 se apresente principalmente como uma doença respiratória, ela pode afetar vários outros órgãos e sistemas que apresentam expressão da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2), visto que essa atua como receptor para o vírus. Pode-se destacar o coração, rins, intestinos, fígado, sistema muscular e nervoso (CHEN et al., 2020). Dados sugerem que as infecções por SARS-CoV-2 incluem disfunção vascular, inflamação e hipercoagulabilidade, com envolvimento em múltiplos órgãos (LEISMAN et al., 2020). A ECA-2 é altamente expressa em pericitos, além de células epiteliais alveolares tipo II, e essa alta expressão, incluindo níveis elevados no coração, pode levar ao desenvolvimento de disfunção vascular (CHEN et al., 2020; SHI et al., 2020). Além disso, vasculite distal com lesões acroisquêmicas já foi observada nos dedos das mãos e dos pés de pacientes com COVID-19 (FERNANDEZ-NIETO et al., 2020; MARZANO et al., 2020; ZHANG H et al., 2020).

O sistema cardiovascular é significativamente afetado na COVID-19 e pode ocorrer de forma direta ou por dano mediado por seus antígenos e componentes estruturais. Lesões miocárdicas inespecíficas são ocasionadas pela reação inflamatória subjacente a infecção ou mesmo pela resposta imune excessiva mediada por citocinas e outros mensageiros celulares (GONZÁLEZ-CALLE et al., 2022).

Foi documentada associação entre a COVID-19 e o tromboembolismo venoso (TEV), incluindo a trombose venosa profunda (TVP) e a embolia pulmonar (EP) em alguns casos clínicos. Por esse motivo, a tromboprofilaxia também vêm sendo considerada uma opção para manejo desses pacientes (TANG et al., 2020; DANZI et al., 2020).

Mais de 30% dos pacientes hospitalizados com COVID-19 manifestam sintomas neurológicos, neuropsiquiátricos, além de variados graus de encefalite (KOTFIS et al., 2020; MAO et al., 2020; VARATHARAJ et al., 2020). Mais recentemente, houve um aumento do número de relatos de efeitos prolongados pós COVID-19 aguda - caracterizada por sintomas persistentes e/ou complicações tardias, por mais de 4 semanas do início dos sintomas. Em sua maioria, esses sintomas persistentes são sequelas neuropsiquiátricas (NALBANDIAN et al., 2021).

A pneumonia grave causada pelo Coronavírus tem sido associada a rápida replicação viral, infiltração de células inflamatórias e nível elevado de citocinas, resultando em danos aos órgãos internos e síndrome respiratória aguda grave - SRAG (CONTI et al., 2020). Considera-se SRAG quando um caso de SG evolui com sintomas de dispnéia/desconforto respiratório, pressão persistente no tórax, saturação de oxigênio menor que 95% em ar ambiente e coloração azulada de lábios ou rosto. Na infecção por SARS-CoV-2, SRAG é o resultado final de uma grande quantidade de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias liberadas por células imunes efectoras, promovendo uma exacerbada resposta inflamatória pulmonar e sistêmica (COPERCHINI et al., 2020). Essa resposta exacerbada frequentemente recebe a denominação de “tempestade de citocinas”, e pode levar ao edema pulmonar e à insuficiência respiratória (WU C et al., 2020).

A tempestade de citocinas está associada à ativação de leucócitos, plaquetas e células endoteliais que desencadeiam a liberação de fatores teciduais e trombina, formação de fibrina, e ativação da via de coagulação e plaquetas (HUANG C et al., 2020). Mediadores solúveis de uma tempestade de citocinas incluem fatores de crescimento e citocinas como interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), interleucina-9 (IL-9), interleucina-10 (IL-10), interleucina-12 (IL-12), interleucina-17 (IL-17), interleucina-18 (IL-18), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e interferon-gama (IFN- γ), quimiocinas como interleucina-8 (IL-8), proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 α) e quimioatraente de linfócitos B, bem como proteínas plasmáticas, como proteína C reativa (PCR), ferritina e complemento (HUANG I et al., 2020; FAJGENBAUM et al., 2020).

De forma geral, a invasão de patógenos como vírus, bactérias e fungos, é combatida por duas grandes defesas do sistema imunológico: a imunidade inata e, mais tardiamente, a imunidade adquirida (ABBAS et al., 2021; MOLAEI et al., 2021). A imunidade inata tem como objetivo impedir a entrada de agentes externos ao organismo, utilizando as barreiras

físicas - pele e mucosas - e peptídeos antimicrobianos secretados por células epiteliais e por alguns leucócitos. Essa defesa inicial ainda apresenta células que detectam e fagocitam o antígeno, como macrófagos, neutrófilos, monócitos e células sentinelas que sinalizam ao sistema imunológico do processo infeccioso em instalação (ABBAS et al., 2021; DE SORDI et al., 2020; LI et al., 2020). A reação inflamatória aguda secreta mais citocinas pró-inflamatórias e liberam mediadores inflamatórios. Essa ação conjunta promove o recrutamento e a migração de neutrófilos do sangue para o tecido inflamado e o extravasamento de plasma rico em proteínas de fase aguda, tais como a proteína C reativa e a proteína C3 do complemento, que são produzidas pelo fígado em resposta à ação endócrina da citocina IL-6, podendo participar também as citocinas TNF- α e a IL-1 β (DE SORDI et al., 2020; LI et al., 2020).

À medida que a reação inflamatória aguda se desenvolve, citocinas podem ser também produzidas por células endoteliais e os mediadores inflamatórios podem ser derivados dos leucócitos recém-chegados ao foco inflamatório, bem como de proteínas da via alternativa do sistema complemento (ABBAS et al., 2021; DE SORDI et al., 2020). Caso a defesa inicial não obtenha êxito na eliminação do antígeno, a imunidade adquirida entra em ação.

1.3 Coronavírus

O Coronavírus é extremamente versátil, comumente difundido em nosso meio, sendo a segunda causa de resfriado comum, após o Rinovírus. Até as últimas décadas, o coronavírus raramente causava doenças mais graves em humanos. Ao todo, sete Coronavírus humanos (HCoV) já foram identificados (**Figura 1**), entre eles SARS-CoV (que causa síndrome respiratória aguda grave), MERS-CoV (que causa síndrome respiratória do Oriente Médio) e o mais recente, novo Coronavírus (que em 11 de fevereiro de 2020, recebeu o nome de SARS-CoV-2). Este novo Coronavírus é o responsável por causar a doença COVID-19 (OPAS, 2022).

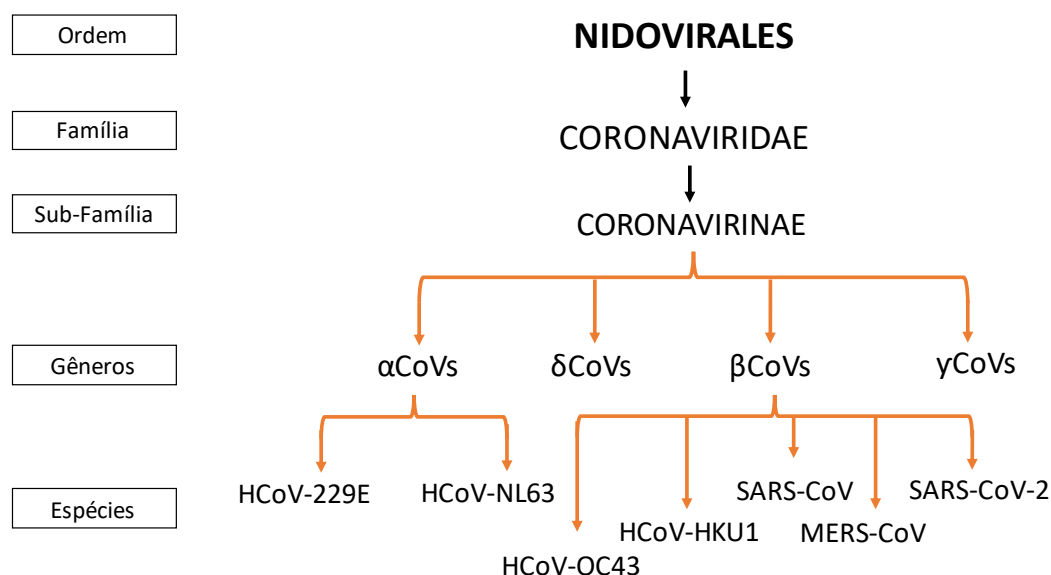


Figura1. Classificação do Coronavírus (ICTV). Adaptado de GANESH et al., 2021.

O arranjo genômico do HCoV encontra-se representado da seguinte forma: 5' - replicase (gene *rep*), ORF1a, ORF1b, *spike* (S), envelope (E), membrana (M), nucleocapsídeo (N)-3' com pequenas seções não traduzidas em ambos os terminais. O gene *rep* codifica para o gene de proteínas não estruturais (NSPs) e constitui aproximadamente dois terços do genoma. Foi demonstrado que seu genoma tem diferentes tipos de quadros de leitura aberta (ORFs). Duas das três partes do RNA viral são principalmente apresentados nas primeiras ORFs (ORF1a/b) que se traduz em duas poliproteínas como pp1a e pp1ab e codificam 16 NSPs, enquanto os ORFs residuais codificam proteínas estruturais e acessórias (GANESH et al., 2021).

O SARS-CoV-2, membro do gênero betacoronavírus, possui RNA de fita simples com proteínas estruturais típicas, envolvendo as proteínas de envelope (proteína E), membrana (proteína M), nucleocapsídeo (proteína N) e espícula (proteína S, do inglês *spike*), responsáveis pela infectividade viral (**Figura 2**) (CHOUDHURY et al., 2020; SAGHAZADEH et al., 2020). As proteínas S na superfície do SARS-CoV-2 se ligam a proteína transmembrana ECA-2 que, por sua vez, transferem seu material genético para dentro da célula e, em seguida, iniciam seu processo de replicação (CHOUDHURY et al., 2020; SAGHAZADEH et al., 2020, ZHANG H et al., 2020). Os Coronavírus são vírus de RNA de sentido positivo, envelopados, variando de 60 a 140 nm de diâmetro, com pico como projeções em sua superfície dando-lhe uma aparência de coroa sob o microscópio eletrônico; daí o nome Coronavírus (**Figura 3**) (RICHMAN et al., 2016). Quatro destes

vírus, nomeadamente HKU1, NL63, 229E e OC43 estão em circulação em humanos e geralmente causam doença respiratória leve (SINGHAL et al., 2020).

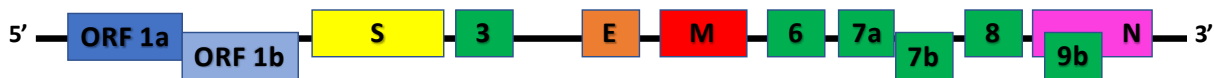


Figura 2. Estrutura do genoma do SARS-CoV-2. Adaptado de GANESH et al., 2021.

A patobiologia da infecção por SARS-CoV-2 atinge inicialmente as vias aéreas superiores. A proteína S se liga a ECA-2 na célula epitelial pulmonar formando um complexo que é clivado pela TMPRSS2 (protease transmembrana tipo 2), permitindo a ativação da proteína S e a fusão do envelope viral com a membrana da célula, com consequente liberação do genoma viral no interior celular (HU et al., 2020; KUMAR et al., 2020; RABI et al., 2020). Os Coronavírus utilizam o RNA ribossomal da célula do hospedeiro para tradução de algumas proteínas não estruturais, dentre elas as replicases, que também auxiliam na síntese dos novos genomas virais. Inicialmente são produzidos RNAs subgenômicos responsáveis pela formação das novas partículas virais. A montagem dos novos vírions acontece dentro de vesículas no retículo endoplasmático e é finalizada no complexo de Golgi. Por fim, ocorre a liberação por exocitose, após fusão das vesículas com a membrana da célula hospedeira (DONG et al., 2020; HU et al., 2020; KUMAR et al., 2020; LU Q et al., 2021).

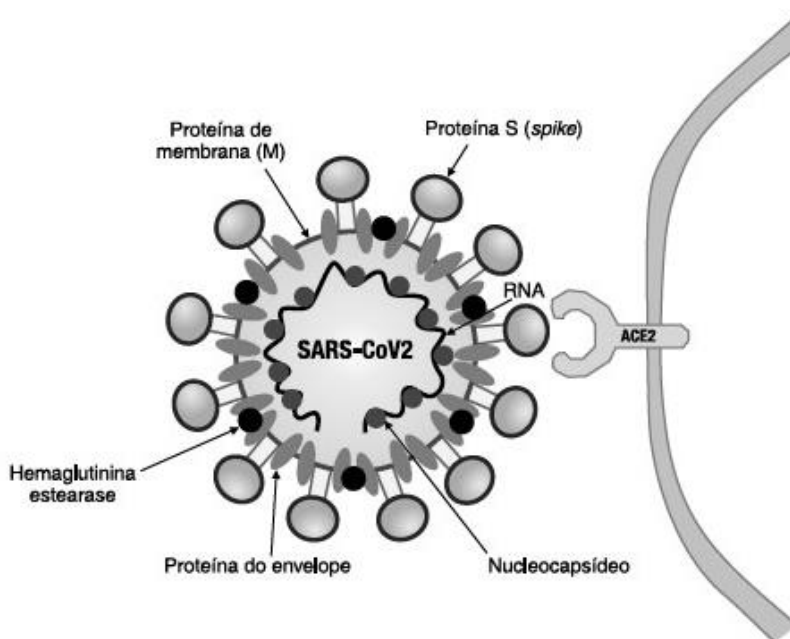


Figura 3. Estrutura molecular do SARS-CoV2 e interação com a enzima ACE2 que atua como receptor celular (Adaptado de AARESTRUP et al., 2020).

A ECA-2 é amplamente expressa em células epiteliais pulmonares e outras células como macrófagos no tecido pulmonar (XIANG S et al., 2020; SU et al., 2021) e têm pouca ou nenhuma expressão nas células sanguíneas do sistema periférico humano (SU et al., 2021).

1.4 Biomarcadores inflamatórios

Os biomarcadores pode ser uma ferramenta de diagnóstico valiosa no manejo da cepa de coronavírus SARS-CoV-2 (CALLAGHAN et al. 2020). Na prática hospitalar, os biomarcadores podem auxiliar no diagnóstico, previsão de prognóstico e no desenvolvimento de estratégias de estratificação de risco para pacientes com COVID-19 (KERMALI et al. 2020; LUO et al. 2020; MAHAJAN et al. 2020). Tanto a revisão da literatura quanto as evidências clínicas demonstram que o COVID-19 é uma doença sistêmica, e a compreensão dos biomarcadores associados é crucial para a tomada de decisão clínica adequada dos pacientes hospitalizados (SCHNEIDER, 2022).

Os biomarcadores são identificadores usados para detectar a presença ou ausência de doença, monitorar mudanças no curso clínico de uma patologia, interpretar a resposta a uma intervenção ou ambiente, prever a resposta ao tratamento, identificar populações com alto risco de progressão, recorrência ou eventos clínicos, identificar suscetibilidade ou risco aumentado e determinar a probabilidade de eventos adversos (CALIFF, 2018; PONTI et al., 2020; KEDDIE et al. 2020; APOSTOLOPOULOS et al., 2020).

Na COVID-19, uma resposta inflamatória eficiente e equilibrada permite uma evolução autolimitada e benigna da doença. A forma grave, em sua maioria, ocorre numa parcela de pacientes que apresenta uma resposta imune exacerbada ao SARS-CoV-2 (WU D et al., 2020; PANDA et al., 2019; MEHTA et al., 2020; ZHOU F et al., 2020).

Cerca de 30% das pessoas infectadas com SARS-CoV-2 permanecem assintomáticas, com a maioria dos pacientes apresentando apenas sintomas leves ou moderados; no entanto, cerca de 20% desenvolvem doença grave ou crítica (CHENG et al., 2020). O desenvolvimento da forma mais grave da doença está associado ao aumento extremo de citocinas inflamatórias, incluindo IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, IP-10, MCP-1, MIP-1A e TNF- α (CHEN et al., 2020). Desfechos adversos e morte são mais comuns em idosos e naqueles com comorbidades subjacentes (50-75% dos casos fatais). A taxa de mortalidade em pacientes adultos hospitalizados variou de 4 a 11%. Estima-se que a taxa geral de mortalidade de casos tenha variação entre 2 e 3% (OMS, 2022). O Brasil, em março de 2022,

ocupava a 14^o posição no ranking de mortalidade por COVID-19, com 3.058 mortes/milhão, estando o estado do Ceará um pouco abaixo dessa média nacional, com 2.860 mortes/milhão (BRASIL, 2022).

A lesão imunopatológica de células hospedeiras, desencadeada pelo sistema imunológico em resposta ao vírus, desempenham um papel fundamental na patogênese das infecções virais. Muitas citocinas / quimiocinas liberadas de células imunes não apenas participam do processo de resposta imunológica antiviral, mas também estão envolvidas no dano celular e no desenvolvimento de disfunções orgânicas (LUSTER et al., 1998; JULKUNEN et al., 2000; NG et al., 2003). A determinação do papel desses fatores solúveis no sangue deve ajudar na compreensão dos processos imunopatológicos do SARS-CoV-2 e permitem o diagnóstico diferencial de outras pneumonias atípicas que requerem abordagens bastante diferentes para o manejo de pacientes (OPENSHAW et al., 2004).

O reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), presentes em vírus por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), leva à liberação de mediadores antimicrobianos pelo sistema imunológico da mucosa do hospedeiro e serve para formar uma primeira linha eficaz de resistência contra a infecção. As respostas do tipo 1 são caracterizadas pela liberação de IFNs tipo I (IFN- α e IFN- β) e IFNs tipo III (IFN- λ 1, IFN λ 2, IFN- λ 3) (PEEBLES et al., 2005). Estes são potentes mediadores antivirais induzidos precocemente na infecção de células epiteliais e células imunes residentes, contribuintes para a produção de IFN, levando ao subsequente recrutamento de monócitos inflamatórios para os pulmões (GORITZKA et al., 2015).

Os perfis de citocinas / quimiocinas em pacientes com SARS têm sido bem documentados (WONG et al., 2004; JONES et al., 2004; NG et al., 2004), mas ainda há incertezas sobre o padrão da expressão dessas substâncias e os fatores de iniciação no desenvolvimento do SARS-COV-2. Uma resposta imune modulada contra o SARS-CoV-2 parece ser fundamental para a resolução da COVID-19. Essa resposta se dá pela coordenada produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que, junto com a atuação celular e das imunoglobulinas (Ig), age a fim de atingir o máximo potencial de combate ao vírus (MARQUES et al., 2016; MEHTA et al., 2020; MCGONAGLE et al., 2020).

Devido à sua participação na patogênese de muitas doenças, as citocinas constituem alvos-chave para abordagens terapêuticas. A descoberta de que as formas solúveis dos receptores de citocinas estão envolvidas na regulação da atividade endógena tem provocado interesse substancial na sua utilização como agentes imunoterapêuticos (BOTRAN et al., 2002; LEVINE, 2008).

1.4.1 G-CSF

O fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) é uma das principais citocinas hematopoiéticas envolvidas na defesa pelo sistema imune (BARREDA et al., 2004). Tem como função estimular e regular a proliferação, sobrevivência e diferenciação das células precursoras de neutrófilos na medula óssea (HARTUNG et al., 1998.2), as quais atuam na primeira linha de defesa do organismo contra agentes infecciosos (BARREDA et al., 2004; METCALF, 1986). O G-CSF atua na promoção da maturação dos neutrófilos, estimulação da sua atividade fagocítica e quimiotática, além de estar envolvido no processo de segmentação nuclear. Ainda, atua em outras linhagens celulares, com um papel importante na mobilização de células-tronco hematopoiéticas da medula óssea para a circulação (REZAIE et al., 2012).

O G-CSF é uma glicoproteína que foi descrita há mais de vinte anos; incluem-se como suas fontes monócitos, células mesoteliais, fibroblastos e células endoteliais (WELTE et al., 1985; BEGLEY et al., 1986; HU et al., 2003). Possui claramente um efeito neuroprotetor aparentemente multimodal, incluindo-se atividade antiapoptótica em neurônios (SCHNEIDER et al., 2005), regeneração de vascularização (LEE et al., 2005), efeito anti-inflamatório (HARTUNG et al., 1998.1) e estimulação de neurogênese endógena (SCHNEIDER et al., 2005).

Ainda é questionável se a presença do fator estimulador estaria associada a um pior prognóstico. Dados de autópsias de pacientes com COVID-19 mostram extravasamento de neutrófilos no espaço alveolar, o que poderia ser intensificado pelo aumento do G-CSF, levantando preocupações de que a expansão de neutrófilos resultante desse aumento possam levar a respostas exageradas, piorando a função respiratória nos pacientes com COVID-19 (BARNES et al., 2020; FOX et al., 2021; ZUO et al., 2020).

1.4.2 IL-10

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina dimérica descoberta em 1989; foi inicialmente nomeada como fator inibidor de síntese de citocinas (FISC) devido sua ação supressora na produção de citocinas importantes na estimulação de células Th1 (FIORENTINO et al., 1989). O seu receptor é constituído de duas subunidades (uma solúvel e outra insolúvel) e é membro da família de receptores de citocinas de classe 2. Para que a

IL-10 desencadeie sua atividade biológica é necessário que se ligue à subunidade solúvel do receptor (IL-10R1 ou IL-10R α) presente na superfície extracitoplasmática da maioria das células hematopoiéticas. Essa região possui alta afinidade e apresenta em sua estrutura domínios N e C-terminais em forma de L que se ligam às superfícies da citocina. Já a subunidade insolúvel (IL-10R2 ou IL-10R β) está localizada na região intramembranar e citoplasmática e contribui pouco para a ligação da citocina ao receptor solúvel, mas sua ação biológica depende da interação da IL-10 com IL-10R1. Após a ativação, a IL-10R2 é responsável por ativar e recrutar proteínas tirosinas-quinases para geração de um complexo de sinalização intracelular, permitindo assim a fosforilação das proteínas-quinases que poderão agir inibindo a síntese de proteínas ou inativando-as (BAZAN et al., 1990; LIU et al., 1994; JOSEPHSON et al., 2001; MOORE et al., 2001).

A IL-10 surgiu como um imunorregulador chave durante a infecção por vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos, melhorando as respostas excessivas de células T Th1 e CD8+ (tipificadas pela superprodução de IFN- γ e TNF- α) que são responsáveis por grande parte da imunopatologia associada às infecções. A IL-10 por si só e através da cooperação com citocinas Th1 (como IL-12), também regula as respostas Th2 para evitar a superprodução de IL-4, IL-5 e IL-13, citocinas que podem levar a fibrose grave, por exemplo (SCHANDENE et al., 1994; GRUNIG et al., 1997; JOSS et al., 2000; HOFFMANN et al., 2000; WILSON et al., 2007).

É evidente que a IL-10 pode ser produzida por muitas células mieloides e linfoides diferentes, e que mais de uma população de células produtoras dessa citocina pode ser induzida durante uma única infecção (COUPER et al., 2008).

A IL-10 é avaliada como uma das citocinas que pode ser utilizada na predição da gravidade da doença COVID-19 (HAN et al., 2020). Além disso, é um componente significativo do sistema de citocinas que regula e suprime a expressão de citocinas pró-inflamatórias durante os estágios de cura de infecções, reduzindo assim os danos causados por citocinas inflamatórias. Essa interleucina é um regulador central negativo da inflamação. Outro ponto relevante é a sua importância no controle da imunidade viral, sendo responsável por equilibrar sinais pró-inflamatórios induzidos por PAMPs virais (ROJAS et al., 2017).

Estudos que examinaram o perfil dos biomarcadores de pacientes com COVID-19 ainda são limitados; apesar disso, estudos anteriores relataram resultados variados e contraditórios em relação ao *status* do fator inflamatório IL-10 em pacientes de diferentes gravidades da doença em questão. Também deve ser observado que os perfis de biomarcadores inflamatórios podem ser afetados por condições climáticas, região, etnia,

padrões nutricionais, condições de vida e bem-estar. A avaliação desse biomarcador nos pacientes é de importância terapêutica, nutricional e epidemiológica (NAGHASHPOUR et al., 2021).

1.4.3 IL-1 β

A interleucina 1 (IL-1) é uma interleucina pró-inflamatória prototípica. Existem duas formas de IL-1: IL-1 α e IL-1 β , ambas com atividades biológicas quase indistinguíveis (DINARELLO et al., 1997).

IL-1 β é uma das formas moleculares de IL-1, produzida por praticamente todos os tipos celulares nucleados, principalmente monócitos, macrófagos e células dendríticas, e está entre os mais importantes marcadores de indução da resposta inflamatória associada à infecção aguda. O mecanismo de inibição natural dessa citocina envolve o bloqueio da ligação no receptor por antagonistas de receptores de citocinas, assim como o IL-1RA, antagonista do receptor de IL-1 (FERRERO-MILIANI et al., 2006). O bloqueio da atividade IL-1 β é uma terapia padrão-ouro para pacientes com doenças autoimunes ou linfomas (DINARELLO et al., 1997).

As citocinas pró-inflamatórias, e em particular a interleucina IL-1, são importantes mediadores na inflamação local e sistêmica (DINARELLO et al., 1986). A IL-1 estimulada em infecções virais, medeia a inflamação pulmonar e tecidual, febre e fibrose (KRITAS et al., 2020). Os macrófagos ativados na COVID-19 são cruciais para a patogênese da fibrose, uma vez que realizam atividade fagocitária sobre restos de células e tecidos mortos, liberando substâncias inflamatórias. Essas reações podem estar relacionadas a padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) que possuem receptores chamados PRRs que também incluem receptores semelhantes a *toll* (TLRs). A ativação de TLR2, TLR3 ou TLR4 pelo SARS-CoV-2 promove liberação de citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 β (CONTI & YOUNES, 2020; THEOHARIDES et al., 2019).

Sabe-se, que os níveis de citocinas pró-inflamatórias estão correlacionados com a replicação e a COVID-19 (CONTI et al., 2020). A inflamação ocorre para restaurar a homeostase após a infecção e pode ser muito prejudicial se não for controlada. A IL-1 gerada durante a inflamação por células imunes, fibroblastos e células endoteliais é uma resposta ao vírus patogênico e desempenha um papel importante na patogênese da doença respiratória obstrutiva aguda e crônica e na progressão da fibrose pulmonar (DOS SANTOS et al., 2012).

1.4.4 IL-1RA

IL-1RA é uma proteína da família das interleucinas, originalmente descrita como uma molécula secretada por monócitos e macrófagos, que modula uma variedade de respostas imunes e inflamatórias relacionadas à IL-1. É um inibidor natural do efeito pró-inflamatório de IL-1 β (AREND et al., 2000).

A IL-1RA é uma citocina inibitória precoce que suprime as citocinas pró-inflamatórias e as respostas dos linfócitos T. Esta citocina também é responsável por controlar as respostas inflamatórias durante os estágios iniciais da ativação imune (IWASAKI et al., 2014). A IL-1RA é produzida por monócitos, macrófagos ou CDs (células dendríticas) (BENEDICT et al., 2003; DIENZ et al., 2012) e se liga competitivamente ao IL-1R (AREND et al., 1998). Dessa forma, ela pode modular a produção de IL-1 e TNF- α (OLEKSOWICZ et al., 1994) e IFN tipo I (THEOFILOPOULOS et al., 2005). Portanto, a produção precoce de IL-1RA pode afetar a indução de citocinas pró-inflamatórias e antivirais durante a fase inicial desta infecção por Coronavírus.

O papel da IL-1RA na resposta imune pode variar, dadas as diferentes concentrações séricas medidas em infecções graves e leves. Em casos leves, o papel inibitório de IL-1RA elevado pode ser substituído pelas respostas imunes adaptativas robustas ao vírus. No entanto, nos casos graves, níveis muito mais altos dessa interleucina foram observados em comparação com os casos leves, sugestivos de uma resposta imune hiperativa, o que pode contribuir para a mudança do ambiente imunológico controlado e protetor para o dano tecidual induzido por inflamação (ZHAO et al., 2020). Acredita-se, portanto, que o papel inibitório dessa citocina contribui para a supressão geral do sistema imunológico, controle viral e gravidade da doença.

Por fim, é intuitivo pensar que citocinas anti-inflamatórias, como IL-1RA, podem proporcionar alívio tanto na inflamação sistêmica quanto na febre que ocorre durante a infecção por COVID-19 (DINARELLO et al., 2019).

1.4.5 IL-6

A interleucina 6 (IL-6) pode ser produzida por vários tipos celulares, sendo as células B, T e monócitos as principais fontes. Os estímulos para a sua síntese são IL-1, lipopolissacarídeos (LPS) e TNF (ROTHERWELL et al., 1991).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que influencia respostas imune antígeno específicas e reações inflamatórias, sendo um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação. Estimula a produção de proteínas da fase aguda da inflamação nos hepatócitos e aumenta a concentração de zinco intracelular nestas células, além de ter ação importante na atração de eosinófilos para o local de inflamação (HEINRICH et al., 1990).

A IL-6 é uma citocina com ação pró-inflamatória que se eleva rapidamente como resposta a diversos eventos patológicos, como traumas ou agentes infecciosos. Também possui papel importante em doenças autoimunes, sendo que o uso de medicamento bloqueador de IL-6 possui efeitos benéficos em pacientes com artrite reumatoide (AR) (SCHEINBERG et al., 2009).

Recentemente, a pandemia de COVID-19 elucidou mais um importante papel desempenhado por esta citocina no acompanhamento de pacientes. Diversos estudos revelam que a dosagem de IL-6 é capaz de orientar médicos quanto a necessidade de internação e intubação. Além disso, níveis séricos elevados estão, normalmente, associados a prognósticos de evolução grave (AZIZ et al., 2020; ZHANG J et al., 2020; SABAKA et al., 2021).

A associação entre altos níveis de IL-6 e casos graves de COVID-19 parece ocorrer devido a tempestade de citocinas, comum em pacientes que necessitam de assistência em UTIs. Neste contexto, desde o final de 2019, a Central de Controle de Doenças americano (CDC) autorizou uma série de estudos, muitos ainda em andamento, que buscam evidenciar se o uso dos mesmos medicamentos bloqueadores de IL-6 usados no tratamento da AR poderiam trazer benefícios também a pacientes graves de COVID-19 (CDC, 2022).

É notório que o conhecimento a respeito da evolução e tratamento da COVID-19 está sendo construído a cada dia. Contudo, considerando tudo que já se sabe sobre participação da IL-6 em diversas doenças inflamatórias, é seguro concluir que este pode ser um teste essencial como auxílio diagnóstico no acompanhamento de pacientes com essa doença.

1.4.6 MCP-1

Durante a inflamação aguda ocorre um processo complexo caracterizado pela migração coordenada de células efectoras e células imunes para o sítio de inflamação. Essa movimentação coordenada exige a expressão induzida de quimiocinas inflamatórias e de seus respectivos receptores nas células-alvo. A interação entre os quimiotáticos e as células

imunes desencadeia uma série de eventos bioquímicos e celulares coordenados (GRIFFITH et al., 2014; MURDOCH et al., 2000).

As quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular com poderosa atividade quimioatrativa que desempenham papéis no recrutamento de células imunes durante a inflamação; eles são classificados por sua estrutura química nas famílias C, CC CXC e CX3C (XU et al., 2020). Sua capacidade quimioatraente é causada por sua ligação aos seus receptores acoplados à proteína G, que abrangem sete domínios transmembrana e são expressos em leucócitos e células endoteliais. (BACHELERIE et al., 2014).

Os níveis séricos de quimiocinas estão elevados em pacientes com COVID-19 e são ainda maiores naqueles que precisaram de internação em unidade de terapia intensiva (UTI), sugerindo uma relação entre quimiocinas, danos pulmonares e gravidade da doença (HUANG C et al., 2020). Embora as concentrações de quimiocinas também sejam elevadas em pacientes com COVID-19 leve (CHI et al., 2020), não está claro se a alta expressão de quimiocinas poderia ser usada como um marcador para o diagnóstico e prognóstico da doença leve.

A proteína quimioatratora de monócitos MCP-1 (CCL2 - Ligante 2 de quimiocina CC) é secretada tipicamente em duas formas predominantes, com pesos moleculares semelhantes de 9 e 13kDa. Tem o mesmo núcleo proteico e difere pela adição de carboidratos O-ligados à forma maior (JIANG et al., 1990). Apesar da diferença, tem atividades idênticas *in vitro* (JIANG et al., 1992).

A MCP-1 estimula a quimiotaxia de monócitos e vários eventos celulares associados à quimiotaxia, incluindo o fluxo de cálcio e a expressão de integrinas. Ela é também um indutor fraco da expressão de citocina em monócitos e, em altas concentrações, gera espécies reativas de oxigênio (JIANG et al., 1992; ROLLINS et al., 1988).

A MCP-1, pertence à família de quimiocinas CC e é um poderoso fator quimiotático de monócitos que é constitutivamente produzido ou induzido por estresse oxidativo, citocinas ou fatores de crescimento. Monócitos e macrófagos são a sua principal fonte e atua regulando a migração e infiltração de monócitos, células T de memória e NK (célula *natural killer*) (DESHMANE et al., 2009). Huang C et al., (2020) descobriram que os níveis de expressão de MCP-1 eram mais altos em pacientes com COVID-19 e ainda maiores entre os internados na UTI. Foi relatado que a expressão dessa quimiocina aumenta rapidamente no início da fase aguda da infecção e depois diminui progressivamente à medida que a doença avança (LIN et al., 2020).

Xiong X et al., (2020) detectaram níveis elevados de MCP-1 no líquido de lavagem broncoalveolar de pacientes com COVID-19 e descobriram uma associação com a patogênese da doença. Níveis elevados também foram detectados no tecido pulmonar de pacientes infectados com o SARS-CoV-2 (CHU et al., 2020). Portanto, monitorar os níveis de MCP-1 precocemente e agir em qualquer elevação aparenta ser uma estratégia viável para evitar que o COVID-19 progrida de leve a grave.

1.4.7 MCP-3

Os monócitos utilizam diferentes moléculas quimiotáticas para migrar; entretanto, MCP-1 (CCL2) e MCP-3 (CCL7 - Ligante 7 de quimiocina CC) são produzidas rapidamente por células estromais e células imunes após a ativação dos PRR ou depois da estimulação de citocinas (ROLLINS et al., 1988; GRIFFITH et al., 2014).

Geralmente, MCP-1 e MCP-3 têm propriedades semelhantes, apesar da última poder exibir características tanto da MCP-1 quanto da RANTES (CCL5), sugerindo que ela possui maior amplitude de ligação do que outras quimiocinas (BROXMEYER et al., 1989; OPDENAKKER et al., 1993).

Os resultados de alguns estudos sugerem que IP-10 e MCP-3 podem servir como excelentes biomarcadores para a previsão da progressão de COVID-19, mas são necessários mais estudos para validar a associação de IP-10 e MCP-3 elevados com doença crítica (YANG Y et al., 2020; MCELVANEY et al., 2020).

1.4.8 IP-10

A inflamação está associada à secreção de IP-10 (CXCL10) por leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos, epitélios, células endoteliais, estromais e queratinócitos em resposta ao Interferon gama (IFN- γ) (LUSTER et al., 1987; DYER et al., 2009; LO et al., 2010). CXCL10 ativa especificamente CXCR3, um receptor acoplado à proteína G transmembrana (LOETSCHER et al., 1996) predominantemente expresso em linfócitos T e B ativados (SALLUSTO et al., 1998), células NK, células dendríticas e macrófagos. Essa quimiocina induz quimiotaxia, apoptose, inibição do crescimento celular e angiostase. Níveis anormais de CXCL10 foram observados em fluidos corporais de indivíduos infectados por agentes virais (TRIPP et al., 2000; HAEBERLE et al., 2001; DYER et al., 2009), bactérias (LIENHARDT et al., 2002; AZZURRI et al., 2005), fungos (SHIRAKI et

al., 2008) e parasitas (ARMAH et al., 2007; JAIN et al., 2008), indicando um papel importante na patogênese dessas doenças.

A IP-10 é uma molécula pleiotrópica capaz de exercer potentes funções biológicas, incluindo a promoção da atividade quimiotática de células CXCR3+, induzindo apoptose, regulando o crescimento e proliferação celular, bem como angiogênese em doenças infecciosas, inflamatórias e câncer (LIU et al., 2011). Essa quimiocina é pequena (10,8 kD) e pode ser secretada por muitos tipos de células em resposta IFN- γ . Esses tipos incluem monócitos, células endoteliais e fibroblastos (VAN DEN BORNE et al., 2014). Durante a secreção, IP-10 é clivada em uma proteína bioativa, que atua como agente quimiotático para células T, células NK, monócitos/macrófagos e células dendríticas (BODNAR et al., 2006).

O fato de as células Th1 produzirem IFN- γ , que induz a produção por diferentes tipos de células de CXCL10, permite que esta possa atrair e recrutar células Th1, sugerindo a existência de um *feedback* positivo entre células Th1 produtoras de IFN- γ e células residentes produtoras de CXCL10 (CAMPBELL et al., 2004). A poderosa ação quimiotática do CXCL10 em linfócitos ativados permite modular a imunidade inata e adaptativa, induzindo ao dano (NEVILLE et al., 1997; LIU et al., 2005; ENDERLIN et al., 2009).

Em alguns estudos, o IP-10 tem se apresentado com efeito protetor na SRAG induzida por Coronavírus (SARS-CoV) (CHEN et al., 2007; HSIEH et al., 2009). Considerando que em pacientes infectados por SARS-CoV, a elevação dos níveis de IP-10 ocorreu em pelo menos duas semanas após o início da doença (LAM et al., 2004; WONG et al., 2004).

Uma comparação adicional entre pacientes com COVID-19 assistidos em UTI e assistidos fora da UTI mostrou que as concentrações plasmáticas de IP-10 foram maiores nos primeiros (HUANG C et al., 2020), sugerindo uma relação entre essa quimiocina e a gravidade da COVID-19. Liu Y et al., (2020) associaram níveis séricos elevados de IP-10 com maior carga viral e maior dano pulmonar em pacientes com SARS-CoV-2.

1.4.9 IFN- γ

Os interferons (IFNs) foram originalmente descobertos como agentes que interferem na replicação viral (ISAACS et al., 1957). Inicialmente, foram classificados pelo tipo de célula secretora, e atualmente são classificados em tipo I e tipo II de acordo com a especificidade do receptor e a homologia de sequência (SCHRODER et al., 2004). O IFN- γ é o único IFN do tipo II. Ele não está estruturalmente relacionado aos IFNs do tipo I, liga-se

a um receptor diferente e é codificado por um *locus* cromossômico separado. Acreditava-se que linfócitos T *helper* CD4+ tipo 1 (Th1), linfócitos citotóxicos CD8+ e células NK produziam exclusivamente IFN- γ (YOUNG et al., 1996; BACH et al., 1997). No entanto, existem evidências de que outras células, como células B, células NK e células apresentadoras de antígenos (APCs) têm essa capacidade (GESSANI et al., 1998; YOSHIMOTO et al., 1998; CARNAUD et al., 1999; FLAISHON et al., 2000; HARRIS et al., 2000; FRUCHT et al., 2001).

O IFN- γ orquestra a atração de leucócitos e direciona o crescimento, maturação e diferenciação de muitos tipos de células, além de aumentar a atividade das células *natural killer* (NK) (CARNAUD et al., 1999).

Atualmente, tem-se investigado o papel dos IFNs no combate ao SARS-CoV-2. Dois estudos *in vitro* mostraram que o vírus é sensível ao tratamento com interferon do tipo I (IFN- α e IFN- β), assim como com interferon do tipo III (IFN- λ) em células cultivadas, inferindo que a terapia com IFN pode reduzir a carga viral e prevenir danos maciços nos tecidos pulmonares dos pacientes com COVID-19 (MANTLO et al., 2020; PARK et al., 2020). É possível que o mecanismo de ação dos interferons no corpo humano seja capaz de montar a resposta imune inata mediada pelo fármaco na infecção por SARS-CoV-2. Se isso acontecer, pode ajudar a limitar a infecção e agravamento dos sintomas em um estágio inicial da doença. Numa fase posterior, a resposta imune adaptativa pode eventualmente ajudar os pacientes a se recuperarem da doença (MANTLO et al., 2020).

1.4.10 TNF- α

Dentre as principais citocinas produzidas, quando infectadas por vírus, destacam-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), responsável pela ativação neutrofílica, promoção da coagulação e atuação a nível central para produção de febre (MARQUES et al., 2016; WANG C et al., 2020; TAY et al., 2020; MEHTA et al., 2020; MCGONAGLE et al., 2020; TUFAN et al., 2020).

Em 1975, Carswell et al. descobriu o TNF- α , que passou a ser considerada uma das principais citocinas envolvidas nos processos inflamatórios e imunes, com ação em diferentes partes do corpo. A presença de LPS bacterianos são o principal estímulo para a secreção desta citocina por macrófagos, linfócitos e monócitos.

O TNF- α tem como principal efeito fisiológico a promoção da resposta imune e inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o *site* da infecção, e

por fim ativá-los. Para que isto ocorra, ele provocará uma série de efeitos no organismo (ABBAS et al., 1998).

O efeito biológico do TNF- α após sua síntese e liberação ocorrerá após a ligação aos seus receptores específicos, chamados TNF-R I e II (VITALE et al., 2007). O TNF-RI é responsável por recrutar uma proteína ativadora das caspases e promover a apoptose. Dessa forma, o TNF- α pode culminar na expressão de gene ou morte celular. Esses receptores são membros da superfamília de receptor de TNF e levam ao recrutamento de proteínas de fatores associados ao receptor de TNF (TRAFs) para o citoplasma, que por sua vez ativam o fator nuclear *kappa* β (NF- κ B) (ABBAS et al., 1998).

Quando liberado em baixas concentrações, essa citocina age nas células endoteliais promovendo vasodilatação e estimulando a secreção de quimiocinas com ação quimiotática para os leucócitos, promovendo inflamação local e possibilitando o combate a quadros infecciosos. No hipotálamo, o TNF- α age induzindo febre, enquanto no fígado estimula a produção das proteínas da fase aguda do processo inflamatório e de fibrinogênio (ABBAS et al., 1998).

A imunopatologia da COVID-19 se caracteriza por elevação de IL-6 e TNF- α . Essas citocinas são produtos de ativação do receptor do tipo *toll* 4 (TLR4), que faz parte da imunidade inata (EGUCHI et al., 2014; CHOUDHURY et al., 2020).

Níveis séricos elevados de TNF- α na COVID-19 podem amplificar o estado de desregulação da resposta imune que, além de não ser capaz de conter o processo infeccioso, acaba por promover o desenvolvimento de uma resposta hiper inflamatória sistêmica e lesões teciduais (GIAMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2020).

1.4.11 Procalcitonina

A procalcitonina (PCT) é um biomarcador inflamatório usado para o diagnóstico diferencial entre infecções virais e bacterianas, nas quais costumam apresentar níveis desregulados no soro (HAMADE et al., 2020).

A PCT, peptídeo precursor da calcitonina, é um hormônio envolvido na homeostase do cálcio e apresenta níveis séricos extremamente reduzidos em indivíduos normais. Alguns estudos confirmaram uma correlação positiva entre seus níveis elevados e pacientes com achados positivos para infecção bacteriana e sepse (hemoculturas positivas). Posteriormente, demonstraram que a PCT não se eleva em infecções virais e seus níveis reduzem quando o tratamento antibiótico apropriado é empregado (SCHUETZ et al., 2011; KIP et al., 2018).

A PCT tem mostrado boa sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de infecções bacterianas secundárias em pacientes com Influenza. Espera-se que, por analogia, poderia também ter a mesma utilidade nos pacientes com COVID-19. Segundo alguns autores, um estudo retrospectivo em pacientes com COVID-19 havia mostrado que a dosagem da PCT diminuiu o uso de antibióticos sem impactar nos desfechos estudados; em contrapartida, a PCT elevada tem sido descrita como um marcador de gravidade, e não estaria claro se ela poderia também ser consequência da síndrome inflamatória associada à COVID-19, e não apenas indicativa de infecção bacteriana secundária (WILLIAMS P et al., 2021).

No contexto da COVID-19, atualmente a PCT é poderosa aliada para determinar o momento ideal para introdução de antibióticos. Febre alta, assim como proteína C reativa (PCR) elevada, são esperadas no início da doença viral pelo pico inflamatório produzido. É importante destacar que estes dados não contraindicam a antibioticoterapia. A PCT pode ser utilizada para determinar o momento da coinfeção bacteriana quando seus níveis se elevam (valores acima do corte de 0,1 – 0,5 ng/mL), uma vez que infecções virais não costumam apresentar aumento desse biomarcador (CLELAND et al., 2021).

1.5 Justificativa

A avaliação de biomarcadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento celular na patobiologia da infecção leve à moderada por COVID-19 podem auxiliar no melhor entendimento da doença e no desenvolvimento de terapias para prevenção e tratamento. Atualmente, nenhum biomarcador laboratorial de rotina, isoladamente, é utilizado no diagnóstico da COVID-19, bem como para ajudar na seleção de pacientes prioritários ao tratamento. Ao invés disso, outros testes de diagnóstico são necessários.

Exames laboratoriais para análises de biomarcadores de rotina podem fornecer uma visão geral do estado de saúde dos pacientes no atendimento inicial. No entanto, ainda existe a necessidade de encontrar qual a relação específica entre os biomarcadores inflamatórios dos pacientes com COVID-19, com outras síndromes gripais não-COVID e pacientes saudáveis (sem sintomas clínicos de gripe). Pesquisas são necessárias para identificar se biomarcadores laboratoriais de rotina podem ser usados no desenvolvimento de um sistema clínico para auxiliar na triagem destes pacientes (SUKLAN et al., 2021).

Compreender os mecanismos imunopatológicos envolvidos na evolução da COVID-19 é um desafio para a ciência mundial. A observação da existência de formas clínicas diferentes da doença, podendo ocorrer desde manifestações leves até formas graves, demonstra a complexidade da resposta imune desenvolvida frente à infecção pelo SARS-CoV-2. Embora a COVID-19 comumente se apresente como uma infecção respiratória, a disfunção multissistêmica ressalta a necessidade de avaliação de biomarcadores em múltiplos órgãos, com finalidade de verificação de prognóstico, risco de quadro grave, resposta à intervenção e eventos adversos. Com isso, é essencial contribuir na elucidação dos tipos clínicos da COVID-19, assim como na busca de estratégias de imunoprofilaxia e terapêutica para a infecção causadas pelo SARS-CoV-2.

2 HIPÓTESES

- 1) Postulamos que a infecção por SARS-CoV-2 aumente a produção dos biomarcadores de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento celular em pacientes com síndrome gripal leve a moderada (SRALM), diferindo-se em relação a pacientes saudáveis ou aos pacientes acometidos pela SRALM não-COVID-19, possibilitando a análise das diferenças nas manifestações clínicas relatadas e desfechos da infecção.
- 2) Postulamos que a detecção de outros vírus respiratórios como VSR e Influenza A/B, presentes em pacientes com sintomas gripais leves a moderado que buscaram atendimento ambulatorial com diagnóstico negativo para SARS-CoV-2, possibilite um conhecimento adicional à patobiologia da COVID-19.
- 3) Postulamos que a descrição do perfil dos pacientes e suas características clínicas e laboratoriais estejam associadas aos sinais / sintomas gripais apresentados pelos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 e propicie um maior conhecimento da doença, diferenciando-a de outras síndromes gripais, possibilitando o desenvolvimento um sistema clínico de avaliação que auxilie na triagem dos pacientes que buscam atendimento médico, mas sem acesso imediato ao teste laboratorial para COVID-19.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Comparar os níveis séricos dos biomarcadores de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento celular, IL-6, IL-10, IL-1RA, IL-1 β , IFN- γ , G-CSF, IP-10, TNF- α , MCP-1, MCP-3 e PCT, entre os indivíduos com sintomas gripais leves a moderadas COVID-19 positivos, COVID-19 negativos e pacientes saudáveis.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Relatar os casos Influenza A, B e VSR circulantes na cidade de Fortaleza/CE, Brasil, durante os anos de 2020/2021, período da pandemia de infecção por SARS-CoV-2, entre os indivíduos com sintomas gripais negativos para COVID-19;
- b) Caracterizar o perfil demográfico, clínico e laboratorial dos grupos de estudo, associando-os entre a presença/ausência de sintomas gripais e SARS-CoV-2;
- c) Determinar quais biomarcadores de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento celular poderiam auxiliar no desenvolvimento de um sistema clínico de monitoramento dos desfechos e triagem dos pacientes com COVID-19.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos e Delineamento do Estudo

O atual estudo prospectivo transversal é parte de um estudo maior intitulado ARTAN-C19 (Antirretroviral Análogo de Nucleosídeos para COVID-19), que trata-se de um ensaio clínico tipo III, duplo-cego, randomizado e controlado por placebo que avaliou a eficácia do tenofovir disoproxil fumarato (TDF) e TDF combinado com emtricitabina (FTC) em pacientes com síndrome gripal leve a moderada causada por SARS-CoV-2. O protocolo do estudo e TCLE foram aprovados pela CONEP com o CAAE número 34 182620.0.0000.5045 e registrado no *ClinicalTrials.gov Identifier*: NCT04712357. Mais detalhes do estudo maior podem ser encontrados em ARRUDA et al., (2021).

A pesquisa clínica em questão foi realizada no Hospital São José (HSJ) e no Centro de Hemoterapia e Hematologia do estado do Ceará (HEMOCE), município de Fortaleza, Brasil. Este município, possui 2.686.607 habitantes e registrava, até o dia 13 de agosto de 2021 (período em que foram realizadas as coletas das amostras do estudo), um total de 254.898 casos e 9.616 óbitos por COVID-19, com a taxa de mortalidade igual a 357,9 por 100 mil habitantes (Informe Semanal COVID-19, Ano 2021, 32º. Semana Epidemiológica, Secretaria Municipal de Saúde, Fortaleza-CE).

4.2 Caracterização da população do estudo

Para o presente estudo, foram selecionados indivíduos com base nos seguintes critérios de inclusão: (a) idade entre 18-60 anos e, (b) suspeita clínica de síndrome gripal leve a moderada que buscaram atendimento ambulatorial, para os participantes sintomáticos. Os sintomas clínicos recrutados foram: respiratórios (dor de garganta, rinorreia e tosse) e/ou gastrointestinais (diarreia e febre) e/ou neurológicos (cefaleia, anosmia e ageusia), nos últimos 7 dias. A síndrome gripal leve a moderada foi definida como ausência de dispneia, desconforto respiratório e saturação de $O_2 < 95\%$.

Quanto ao grupo controle, os participantes deveriam apresentar ausência de qualquer sintoma de síndrome gripal por pelo menos 15 dias anteriores ao recrutamento, e permanecerem assintomáticos por pelo menos uma semana após a coleta.

Os critérios de exclusão foram: (a) ser participantes de outro estudo; (b) doença ou outra condição médica que impedia o uso dos medicamentos da intervenção; (c) paciente

incapacitado de ingerir, reter e absorver os medicamentos da intervenção; (d) mentalmente incapacitado; (e) plano de internação nas próximas 24 horas; (f) diagnóstico de infecções por HIV e/ou hepatite B; (g) gestante e, (h) paciente com residência fixa fora do município do estudo. Participantes do grupo controle que relataram algum tipo de sintoma de gripe na ligação da semana posterior a coleta também foram excluídos do estudo.

Os participantes sintomáticos foram recrutados de 9 de novembro de 2020 a 5 de julho de 2021, ao procurarem atendimento ambulatorial no HSJ. Os testes de RT-PCR dos selecionados foram realizados no laboratório central referência do Estado do Ceará – LACEN (conforme descrito posteriormente).

O terceiro grupo, composto inicialmente por 60 controles saudáveis, assintomáticos, foram recrutados entre os dias 20 e 22 de junho de 2022, no HEMOCE. A coleta da amostra de sangue, o preenchimento dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e as respostas aos questionários ocorreram no dia do recrutamento. Posteriormente, realizou-se um contato telefônico, após 1 semana (± 7 dias), para confirmação que os participantes se mantinham sem a presença de sintomas gripais. O fluxograma de seleção dos participantes encontra-se detalhada na **Figura 4**.

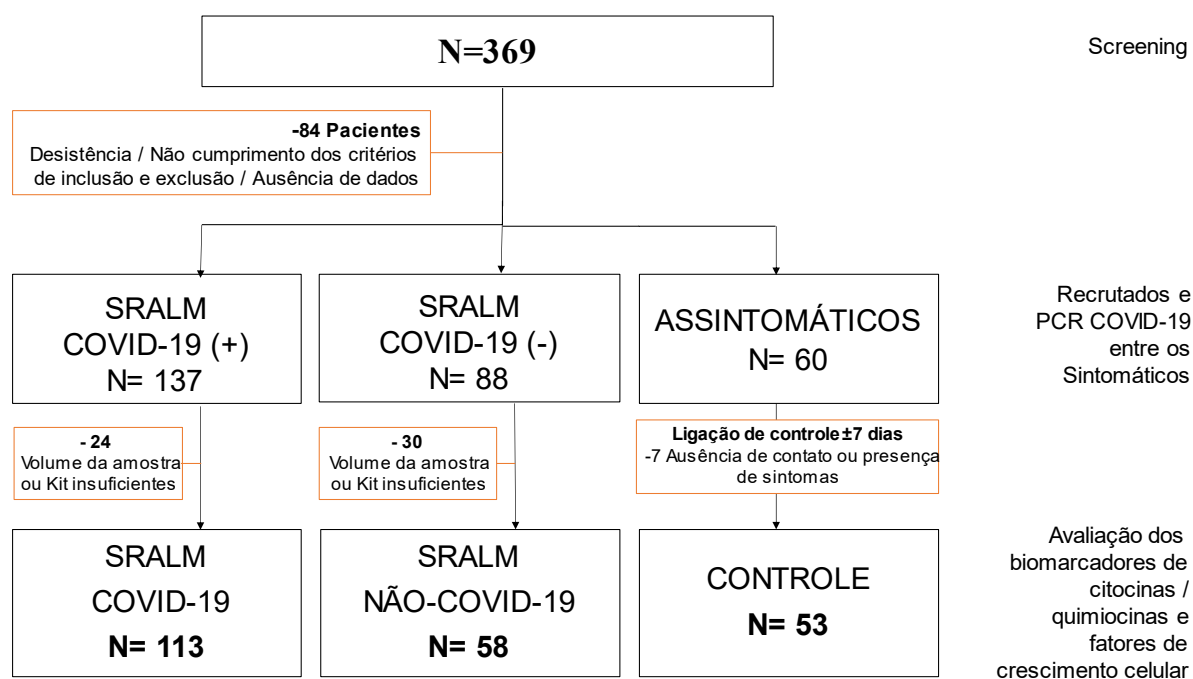


Figura 4. Fluxograma de recrutamento dos participantes. SRALM= Síndrome respiratória aguda leve a moderada. FONTE: Próprio autor.

4.3 Coleta e processamento das amostras

Os participantes sintomáticos foram acompanhados pela equipe médica e outros profissionais de saúde durante quatro visitas: dia 1, dia 7 (± 3 dias), dia 14 (± 3 dias) e dia 28 (± 3 dias), no ambulatório do HSJ. No momento do recrutamento, foram coletados dados demográficos, clínicos, *swab* nasofaríngeo e amostras de sangue. Nas visitas 2, 3 e 4 foram novamente coletadas amostras de *swab* nasofaríngeo e sangue, com o objetivo de realizar o acompanhamento da carga viral, avaliação dos biomarcadores e imunoglobulinas, além de outros dados clínicos julgados necessários. O grupo controle realizou somente uma visita ao HEMOCE.

As amostras de *swab* nasofaríngeo foram inativadas em banho-maria a temperatura de 55°C, por 30 minutos, aliquotadas e armazenadas em freezer -80°C até o momento do uso.

Coletamos cerca de 5 ml de sangue de cada participante do estudo em tubos com gel separador. Os tubos eram posteriormente centrifugados e o soro eram aliquotados e armazenados em freezer -80 ° C. As amostras de soro foram descongeladas no momento da utilização para avaliação dos níveis de citocinas / quimiocinas e fatores de crescimento.

4.4. Diagnóstico molecular de SARS-CoV-2

O diagnóstico molecular das amostras de *swab* nasofaríngeo dos participantes sintomáticos foram realizadas por PCR em Tempo Real (RT-PCR) baseado nas diretrizes oficiais determinadas pelo CDC americano (CDC) e pelo Laboratório Central do Estado do Ceará (LACEN/CE).

Em resumo, após a inativação viral (descrita anteriormente), 300 μ L da amostra seguiram para isolamento de ácido nucleico (AcNu), através do protocolo via isolamento automático de RNA por esferas magnéticas (*beads*), kit CHEMAGIC 360-D (PerkinElmer, MA, EUA), conforme as instruções do fabricante.

Após as extrações, os AcNus coletados eram submetidos a uma reação de controle interno da Subunidade 30 de RNase P humana (HRP30) (IDT, NJ, EUA), com a finalidade de confirmar a presença de RNA na amostra extraída, verificação da eficiência e seletividade do processo.

Em sequência, as reações de RT-PCR foram realizadas por diagnóstico *uniplex*. Os *primers* e *probes* para SARS-CoV-2 obtidos comercialmente dispensaram procedimentos de otimização laboratorial. As reações de RT-PCR foram processadas segundo o painel de diagnóstico para o SARS-CoV-2 do CDC 2019 COV RT-PCR, conforme a **Figura 5**. Reações de 20 μ L de volume total incluíram: 10 μ L da enzima RT-PCR; 0,4 μ L da enzima

RT; 1,5 µL de *primer probe mix*; 3,1 µL de água ultrapura autoclavada; e 5 µL da amostra de RNA viral.

NOME	DESCRIÇÃO	SEQUÊNCIA 5' →3'	MARCA	CONC. FINAL
2019-nCoV_N1-F	2019-nCoV_N1 Forward Primer	GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT	None	500nM
2019-nCoV_N1-R	2019-nCoV_N1 Reverse Primer	TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG	None	500nM
2019-nCoV_N1-P	2019-nCoV_N1 Probe	FAM-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC-BHQ1	FAM, BHQ-1	125nM
2019-nCoV_N1-P	2019-nCoV_N1 Probe	FAM-ACC CCG CAT /ZEN/ TAC GTT TGG TGG ACC-3IABkFQ	FAM, ZEN, 3IABkFQ	125nM
2019-nCoV_N2-F	2019-nCoV_N2 Forward Primer	TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA	None	500nM
2019-nCoV_N2-R	2019-nCoV_N2 Reverse Primer	GCG CGA CAT TCC GAA GAA	None	500nM
2019-nCoV_N2-P	2019-nCoV_N2 Probe	FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG-BHQ1	FAM, BHQ-1	125nM
2019-nCoV_N2-P	2019-nCoV_N2 Probe	FAM-ACA ATT TGC /ZEN/ CCC CAG CGC TTC AG-3IABkF	FAM, ZEN, 3IABkFQ	125nM
RP-F	RNAse P Forward Primer	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G	None	500nM
RP-R	RNAse P Reverse Primer	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT	None	500nM
RP-P	RNAse P Probe	FAM – TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG – BHQ-1	FAM, BHQ-1	125nM
RP-P	RNAse P Probe	FAM-TTC TGA CCT /ZEN/ GAA GGC TCT GCG CG-3IABkFQ	FAM, ZEN, 3IABkFQ	125nM

Figura 5. *Primes e probes* utilizados no processo de identificação do SARS-COV-2. Conc. Final = Concentração final. Fonte: Adaptado de CDC, 2019.

4.5 Análise Citocinas, Quimiocinas e Fatores de Crescimento

Para determinar quais biomarcadores de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento poderiam impactar no desfecho da COVID-19, comparou-se grupos de participantes com sintomas gripais leves a moderado com resultados positivos ou negativos para COVID-19 ao do grupo controle (sem nenhum sintoma gripal). Foram selecionados biomarcadores de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento celular, potencialmente importantes para a progressão da doença, com base em um painel de publicações anteriores

de SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 e Influenza (LUCAS et al., 2020; ZHAO et al., 2020; CHATTERGOON et al., 2011; BLANCO-MELO et al., 2020; BROGGI et al., 2020).

Para avaliação dos biomarcadores da resposta inflamatória utilizamos a Tecnologia XMAP Luminex (Merck, NJ, EUA), incluindo a análise simultânea em uma mesma amostra de soro (volume de 25 μL), de um painel de marcadores proteicos de atividade pró e anti-inflamatória e fatores de crescimento celular (IL-6, IFN- γ , MCP-1, MCP-3, IL-1 β , IL-10, G-CSF, IL1-RA, IP-10, TNF- α), através do kit Milliplex Painel A Citocina Humana – HCYTA-60K-10 (Millipore, MA, EUA). No teste em questão, os biomarcadores se ligam a anticorpos específicos ligados à microesferas carboxiladas contendo distintos fluorocromos, possibilitando a identificação múltipla em uma mesma reação. Foram construídas curvas padrões para cada proteína, possibilitando a quantificação. Os resultados estão indicados em $\text{pG}/\mu\text{L}$.

A quantificação da procalcitonina (PCT) foi realizada em separado dos outros biomarcadores, utilizando o kit ELISA para Procalcitonina Humana (Sigma-Aldrich, MO, EUA), conforme instruções do fabricante. Foram construídas curvas padrão, possibilitando a leitura dos resultados em $\text{pG}/\mu\text{L}$.

As amostras do grupo controle (assintomáticos) foram processadas para identificação de 6 dos 11 biomarcadores utilizados nos indivíduos sintomáticos, são eles: MCP-3, IL-1 β , IL-10, G-CSF, TNF- α e IL-6, baseados nas análises preliminares realizadas com os participantes sintomáticos.

As análises dos biomarcadores dos participantes sintomáticos (COVID-19 e não-COVID-19) foram realizadas nas amostras de sangue coletadas durante o recrutamento (visita 1), assim como as amostras do grupo controle (assintomático).

4.6 Diagnóstico molecular para outros agentes infecciosos

As amostras dos participantes sintomáticos que buscaram atendimento ambulatorial e que testaram negativo para SARS-CoV-2 (RT-PCR) foram re-analisadas por um sistema Multiplex RT-PCR *one step* em tempo real para detecção simultânea de SARS-CoV-2, vírus Influenza A, Influenza B e vírus Sincicial Respiratório (VSR) humano (Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV), na tentativa de descobrir a presença do agente infeccioso em questão.

Esse ensaio é o utilizado como padrão pelo LACEN e possibilita a amplificação e diferenciação simultânea dos ácidos nucleicos alvo do gene S, gene RdRP e gene N do

SARS-CoV-2, vírus Influenza A (Flu A), Influenza B (Flu B) e vírus Sincicial Respiratório humano (VSR) com dois Controles Internos (CI Endógeno e CI Exógeno). A presença de sequências de genes específicos na reação é indicada como um valor Ct através do *software* de análise *Seegene Viewer*. Ambos os genes endógeno e exógeno são utilizados como Controle Interno (CI). O CI endógeno é utilizado para verificar as amostras adequadas e o CI exógeno é utilizado para monitorar todo o processo de extração do ácido nucleico e para verificar alguma possível inibição da reação de PCR. Os dois CIs permitem demonstrar uma escolha de amostra adequada e validade do ensaio de cada espécime numa única reação.

4.7 Detecção de anticorpos específicos para SARS-CoV-2

Os testes de IgM/IgG foram realizados seguindo o protocolo recomendado pelo kit LIAISON[®] SARS-CoV-2 S1/S2 IgG e IgM (DiaSorin, Saluggia, Itália). Foi utilizada a técnica de imunoensaio de quimioluminescência (CLIA) para a determinação qualitativa de anticorpos IgM contra o SARS-CoV-2 em amostras de soro ou plasma humano. As análises foram realizadas com as coletas de sangue referente aos dias 7±3 dias após a primeira visita (visita 2) e 28±3 dias após a primeira visita (Visita 4) do estudo clínico, das amostras dos sintomáticos.

4.8 Análise de dados

Conduzimos análise estatística usando *SPSS Statistics 20.0* (IBM Corporation, <https://www.ibm.com>). Usamos o *Teste de Shapiro-Wilk* para avaliar a normalidade quantitativa dos dados e o *Teste de Levene* para avaliar a igualdade de variações. Para variáveis não-paramétricas utilizamos o *Teste de Mann-Whitney U*, *Kruskal-Wallis Test*, para amostras independentes, ou *Wilcoxon Signed Rank Test*, para amostras pareadas. Analisamos variáveis qualitativas usando o *Teste χ^2* ou *Teste exato de Fisher*. Usamos *GraphPad Prism* versão 3.0 para Windows (Software GraphPad, <https://www.graphpad.com>) e *ArcGIS* programa versão 9.0 (ESRI Co. Redlands, CA) para análise estatística complementar, formatação de tabelas e criação de figuras. Todos os testes estatísticos tinham 2 lados com nível de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Selecionamos 369 indivíduos para o nosso estudo. Foram atendidas 309 pessoas com sintomas leves a moderados de síndrome gripal; destes, 227 indivíduos atendiam aos critérios de inclusão/exclusão e foram incluídos no estudo. Porém, apenas 225 tiveram os dados completos coletados (137 testaram positivo para COVID-19 e 88 testaram negativo para COVID-19). Além dos participantes sintomáticos, coletamos dados e amostras de 60 voluntários saudáveis, que representam nosso grupo controle. Destes, três apresentaram sintomas de gripe na semana posterior da coleta e quatro não conseguimos efetivar o contato posterior, e foram excluídos do estudo, totalizando 53 participantes do grupo controle.

No primeiro atendimento dos participantes sintomáticos, a coleta foi realizada com a totalidade dos 225 indivíduos recrutados. Em uma segunda visita (7 ± 3 dias após a primeira), foram atendidos 187 indivíduos (83%), para acompanhamento dos sintomas e sinais clínicos, e coleta de uma nova amostra de *swab* da nasofaringe e de sangue. Na terceira visita (14 ± 3 dias da primeira visita), compareceram ao retorno 155 participantes (69%) para acompanhamento dos sintomas/sinais clínicos e coleta de novas amostras (*swab* da nasofaringe e sangue). No quarto e último retorno (28 ± 3 dias após a primeira visita), foram atendidos 129 participantes (57%) para avaliação dos sintomas/sinais clínicos e novamente coleta de amostras de *swab* da nasofaringe e de sangue. Os participantes do grupo controle realizaram apenas uma visita de coleta e a confirmação de ausência de sintomas na semana posterior, por contato telefônico.

A **Figura 6** mostra a localização geográfica da cidade de Fortaleza no mapa do Brasil e o mapa de calor da dispersão de casos (25.683 casos georreferenciados) no pico da segunda onda de COVID-19 na cidade, em março de 2021. Esse período coincide com o período de maior recrutamento no ensaio clínico, sob a predominância da variante gama do SARS-CoV-2. Houve uma grande aglomeração contínua que ocupou vários bairros como Benfica, Damas, Bom Futuro, José Bonifácio e Parquelândia, próximo ao Hospital São José, local da fonte de recrutamento dos indivíduos sintomáticos do estudo.

As características dos grupos de estudo são apresentadas na **Tabela 1**. A idade variou entre 17 e 73 anos, com média de 40 anos no grupo COVID-19 positivo e 37 anos no grupo sintomático negativo para COVID-19. No grupo controle, a média da idade foi de 38 anos, sem diferença estatística entre os grupos.

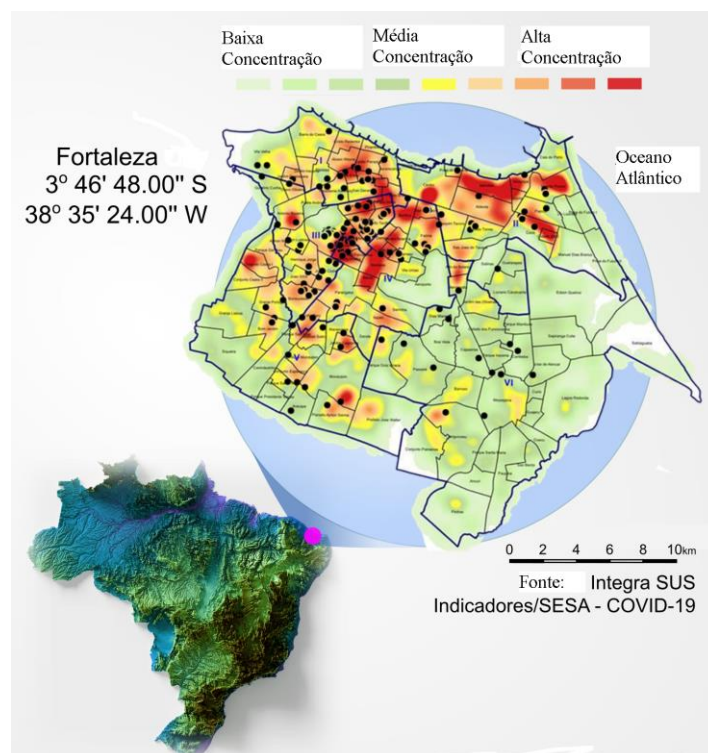


Figura 6. Mapa da cidade de Fortaleza/Ceará, Brasil e localização do estudo. O mapa mostra a disseminação dos casos para o sul da região metropolitana de Fortaleza. Os pontos marcados em preto no mapa representam origem dos participantes sintomáticos recrutados no ensaio clínico, de 9 de novembro de 2020 a 5 de julho de 2021. Adaptado de ARRUDA et al., 2021.

Os investigados neste estudo foram: (a) 137 participantes com infecção por SARS-CoV-2, sendo 61% (83/137) mulheres e 39% (54/137) homens; (b) 88 indivíduos sintomáticos e COVID-19 negativos, sendo 69% (62/88) mulheres e 29% (26/88) homens; e (c) 53 participantes do grupo controle, sendo 38% (20/53) mulheres e 62% (33/53) homens. Houve proporcionalmente maior número de participantes do sexo masculino entre os controles, com significância ($p= 0,001$, teste Qui-quadrado de *Pearson*) em relação aos grupos que buscaram atendimento ambulatorial (sintomáticos).

Com relação a escolaridade dos participantes do estudo, 47% afirmaram possuir o ensino médio completo. No grupo COVID-19 positivos, a segunda maior prevalência foi de pessoas com o ensino fundamental completo (29%) com diferença estatística dos outros grupos. Nos grupos COVID-19 negativos e controle, a segunda maior frequência (22% e 30%, respectivamente) ocorreu entre os que afirmaram ter concluído o ensino superior. Houve diferença estatística entre os grupos sintomáticos (COVID-19 positivo e negativo) quanto a conclusão de pós-graduação ($p= 0,024$), sendo maior no grupo não-COVID-19.

Ao avaliar as comorbidades apresentadas entre os investigados, observou-se que o grupo controle possuíam uma menor prevalência de comorbidades (87%), enquanto entre os

grupos dos indivíduos sintomáticos não diferiu em relação ao número de comorbidades. A doença preexistente mais comum a todos os grupos foi a hipertensão, seguida de tabagismo nos grupos dos participantes negativos para COVID-19 e controles.

Tabela 1: Características sociais e epidemiológicas dos participantes do estudo.

Características	Todos (N = 278)	COVID-19 (+) (N = 137)	COVID-19 (-) (N = 88)	CONTROLE (N=53)
Idade (Anos)	39 ± 0,8	40 ± 1,5	37 ± 1,5	38 ± 1,5
Sexo Masculino – n° (%)	113 (41)	54 (39)	26 (29)	33 (62)*
Escolaridade – n° (%)				
1. Fundamental completo	60 (22)	40 (29)*	15 (17)	5 (9)
2. Ensino médio completo	132 (47)	57 (42)	46 (52)	29 (55)
3. Ensino Superior completo	61 (22)	26 (19)	19 (22)	16 (30)
4. Pós-graduação completa	11 (4)	2 (2)*	6 (7)*	3 (6)
5. Não informado	14 (5)	12 (9)	2 (2)	0
N° de Comorbidades - n° (%)				
Nenhuma	204 (73)	93 (68)	59 (66)	46 (87)
Uma	60 (22)	31 (23)	22 (24)	7 (13)
Duas ou mais	19 (7)	13 (9)	6 (7)	0
Comorbidades – n° (%)				
Hipertensão	43 (15)	27 (20)	11 (12)	5 (8)
Diabetes mellitus tipo 2	20 (7)	13 (9)	7 (8)	0
Fumante (Tabagismo)	18 (6)	8 (6)	8 (9)	2 (3)
Asma	15 (5)	8 (6)	6 (7)	1 (2)
Doenças cardíacas	7 (2)	5 (4)	2 (2)	0
Câncer	3 (1)	1 (1)	2 (2)	0

A idade está descrita em média ± SD. A porcentagem pode não totalizar 100 devido ao arredondamento. qPCR positivo por CT < 37. Testes estatísticos utilizados: Teste de *Kruskal-Wallis* ou teste *Chi-Square test Likelihood Ratio*. O “*” indica $p \leq 0,05$ em relação aos outros grupos ou entre os grupos marcados com esse sinal.

As características clínicas dos participantes sintomáticos são descritas na **Tabela 2**. Todos que buscaram atendimento ambulatorial apresentaram manifestações típicas gripais, características da SARS-CoV-2, embora a gravidade diferisse entre doença leve a moderada. Uma maior proporção de pacientes com febre ($\geq 37,8^\circ\text{C}$) 61% (83/137), anosmia / disosmia

39% (53/137), ageusia / disgeusia 38% (52/137) e mialgia 77% (105/137) esteve presente nos participantes COVID-19 positivos quando comparados aos sintomáticos negativos.

Tabela 2. Sinais e sintomas clínicos leves a moderados dos participantes sintomáticos.

Sinais e Sintomas Clínicos N° (%)	Participantes		p	
	Todos N = 225	COVID-19 (+) N = 137		COVID-19 (-) N = 88
Dor de Cabeça	184 (82)	116 (85)	68 (76)	0,161
Mialgia	160 (71)	105 (77)	55 (62)	0,025
Coriza	158 (70)	89 (65)	69 (77)	0,062
Tosse	157 (70)	93 (68)	64 (71)	0,521
Dor de Garganta	153 (68)	84 (61)	69 (77)	0,007
Fraqueza	147 (65)	93 (68)	54 (60)	0,316
Febre ($\geq 37^{\circ}\text{C}$)	118 (52)	83 (61)	34 (38)	0,002
Ageusia	68 (30)	52 (38)	16 (18)	0,002
Anosmia	67 (30)	53 (39)	14 (16)	0,001
Dispneia	34 (15)	20 (15)	14 (16)	0,751
Mais de um sinal / sintomas	221 (98)	135 (98)	86 (98)	1,00
Tempo médio (IQR) dos sintomas – dias	4 (3-5)	4 (3-5)	4 (3-5)	-
Total n° de sinais e sintomas- mediana (IQR)	6 (4-7)	6 (4-7)	5 (4-7)	-

Testes estatísticos utilizados: *Chi-Square test Likelihood Ratio*. Os valores em negrito apresentaram resultado significativo ($p < 0,05$). O grupo controle (saudáveis) não estão apresentados na tabela por não apresentarem sinais / sintomas clínicos de síndrome gripal. IQR – Intervalo interquartil.

Entre os indivíduos sintomáticos negativos para COVID-19, houve maior prevalência de dor de garganta 77% (69/88) quando comparado ao grupo COVID-19 positivos.

O tempo médio e quantidade de sinais e sintomas (mediana) não diferiram entre os grupos analisados. Os participantes sintomáticos (positivos e negativos para SARS-CoV-2) foram tratados com as medicações fornecidas pelo estudo, conforme descrito na seção 4.1 da metodologia, porém os tratamentos avaliados não demonstraram impacto nos desfechos apresentados (ARRUDA et al., 2021).

Todos os 83 participantes com sintomas de síndrome gripal que procuraram atendimento ambulatorial com sintomas leves a moderados, mas com diagnóstico negativo para COVID-19, foram testados para Influenza (A e B) e para o Vírus Sincicial Respiratório (VSR). Apenas 5% (4/83) apresentaram resultado positivo para VSR, e nenhum testou positivo para Influenza A ou B.

A **Tabela 3** resume os dados dos biomarcadores de atividade pró e anti-inflamatória e fatores de crescimento celular IL-1 β , IL-1RA, IL-6, MCP-1, MCP-3, IL-1 β , IL-10, IFN- γ , G-CSF, TNF- α nas amostras de soro dos participantes avaliados nesse trabalho. Os valores são referentes a primeira visita dos pacientes do ensaio clínico e a visita única do grupo controle. O marcador de septicemia procalcitonina (PCT) foi avaliada em apenas 74 dos sintomáticos, sendo 40 COVID-19 positivos e 34 COVID-19 negativos.

Tabela 3. Níveis séricos dos biomarcadores analisados nos participantes do estudo.

Biomarcadores pG/μL (IQR)	Todos	COVID-19 (+)	COVID-19 (-)	CONTROLE
IL-10	3,02(0-7,24)	4,83 ^a (0-10)	3,17 (0-6,75)	1,25 ^a (0-2,7)
IL-1 β	2,67(0-7,84)	4,66 (0,62-9,34)	3,32 (0-8,18)	0,75 ^b (0-0,39)
IL-6	2,11(0-3,22)	2,74 ^a (0-3,95)	2,18 (0-3,16)	0,69 ^a (0,3-1,6)
IL-1RA	4,58(0-6,7)	4,95 (0,1-6,88)	3,70 (0-6)	-
G-CSF	2,40 (0-21)	9,97(0-30,43)	3,72 (0-20)	1,79 ^b (1,2-2,4)
IFN- γ	18,1(0-94,5)	18,07 (0-107,8)	11,87 (0-70,6)	-
IP-10	106(26-297)	131(27,9-392)	66,52 (22-205)	-
MCP-1	302(94-657)	351(96,3-736)	203 (92-473)	-
MCP-3	5,45(1,31-30)	28,57 (2,11-31,88)	27,06 (2,2-31)	1,31 ^b (1,2-1,9)
TNF- α	9,72(0-19)	16,27 (0-23,23)	14,54 (0-20,7)	0,76 ^b (0-0,56)
Procalcitonina	10 (0-58,6)	18 ^c (0-115)	10 (0-33,4)	

Os valores de medida dos biomarcadores apresentados na tabela correspondem à coleta de sangue do primeiro dia de atendimento (Visita 01). Os valores estão expressos em mediana (Intervalo interquartil-IQR). Resultados inconclusivos foram retirados da análise. O número de pacientes avaliados para a PCT foi de 40 COVID-19 positivos e 34 negativos. O grupo controle foi avaliado para 6 dos 11 biomarcadores. **a** = diferença estatística entre o grupo COVID-19 positivo e o grupo controle. **b**= diferença estatística entre o grupo controle e os grupos sintomáticos (COVID-19 positivos e negativos). **c**= diferença estatística entre os grupos positivo e negativo para COVID-19.

Avaliamos que os biomarcadores IL1-RA, IFN- γ , MCP-1, IP-10 não apresentaram resultados relevantes ao estudo e optamos por não realizar a análise desses biomarcadores

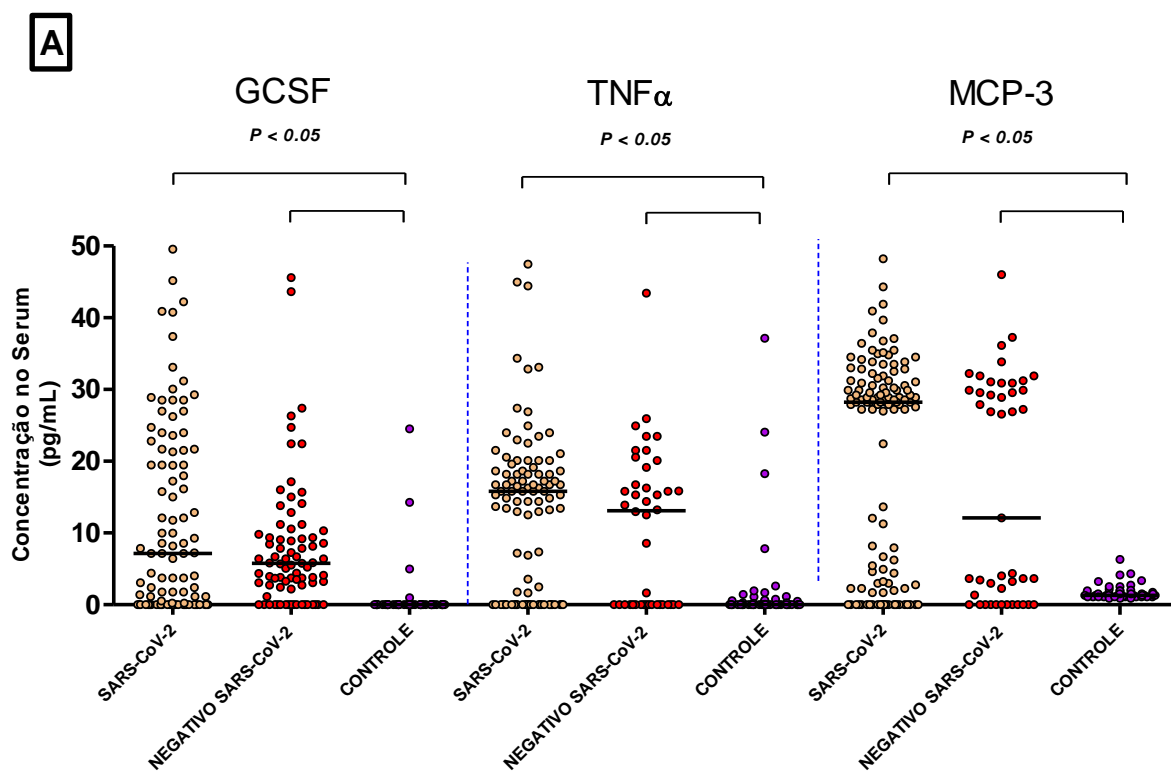
nas amostras dos indivíduos assintomáticos.

Como resultado, verificou-se que o perfil de citocinas pró-inflamatórias avaliadas no grupo controle, IL-6, IL-1 β , MCP-3 e TNF- α , além do G-CSF e IL-10, apresentaram-se diminuídas em relação aos pacientes com síndromes respiratórias agudas leves a moderadas (SRALM) em participantes que testaram positivo para SARS-CoV-2. Entre os indivíduos com SRALM não-COVID-19, apenas as citocinas IL-6 e IL-10 não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle.

A **Figura 7 (A e B)** destaca os biomarcadores com diferenças significativas entre os participantes com SRALM positivos e negativos para SARS-CoV-2 e os do grupo controle.

Os níveis dos biomarcadores dos participantes positivos para COVID-19 apresentam-se mais elevados em relação aos negativos para SARS-CoV-2 e controles. Da mesma forma, os níveis dos biomarcadores dos pacientes SRALM não-COVID encontram-se mais elevados que o grupo controle, com exceção do IL-10 e do IL-6 onde a diferença não foi significativa.

Em algumas amostras, devido ao baixo perfil de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento celular apresentados, os valores de quantificação foi inferior ao limite de detecção do método escolhido (Luminex), sendo assim consideramos o primeiro ponto da curva para cada analito (**ANEXO A**).



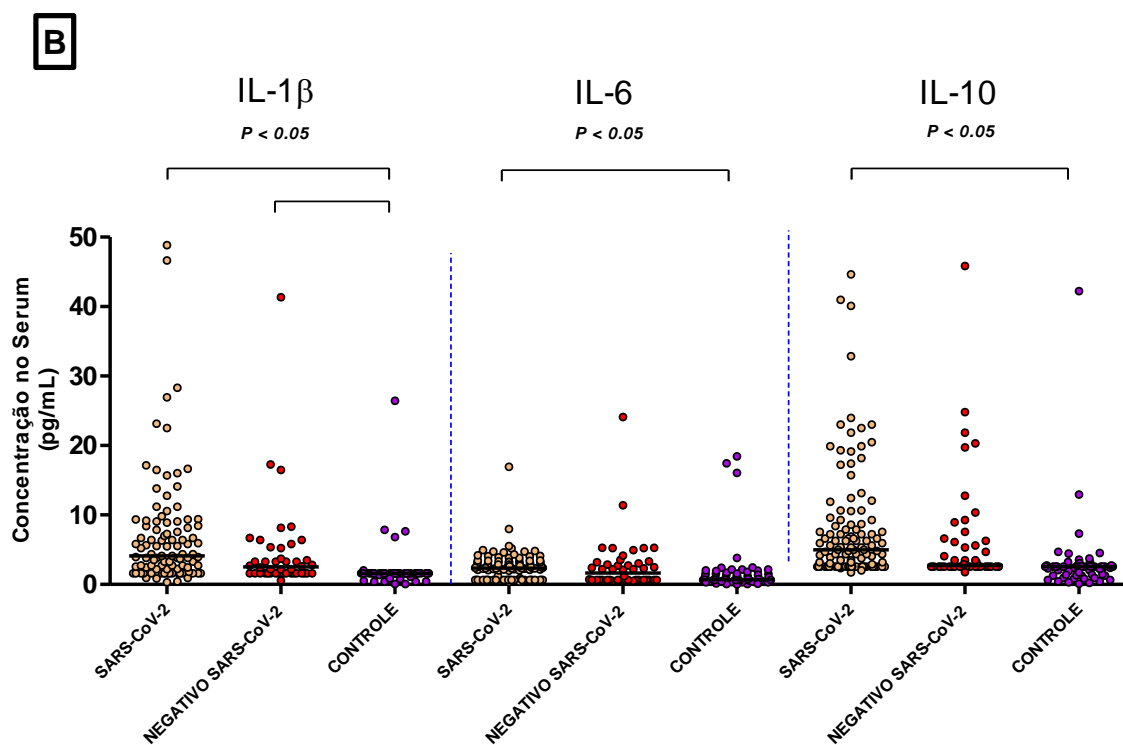


Figura 7 A e B. Comparativo das concentrações plasmáticas dos biomarcadores G-CSF, TNF- α , MPC-3, IL-1 β , IL-6 e IL-10 entre os participantes sintomáticos (SRALM) na presença ($n=113$) ou ausência do SARS-CoV-2 ($n=58$) em relação aos controles ($n=53$), realizados na coleta da visita 1. O teste utilizado foi o *Kruskal Wallis*, sendo considerado estatístico $p < 0,05$, entre os grupos de um mesmo biomarcador.

Outro parâmetro analisado nos indivíduos sintomáticos do estudo foram exames de sangue complementares como descritos na **Tabela 4**. Nas amostras do grupo controle não foram realizadas essas análises devido a não demonstrarem grandes diferenças entre os resultados dos grupos sintomáticos.

Menores níveis de hemoglobina e hematócrito estavam associados ao grupo sintomático que testou negativo para COVID-19 quando comparados aos COVID-19 positivos ($p=0,031$ e $p=0,039$, respectivamente). Com exceção da contagem de neutrófilos e eosinófilos, todas as outras células sanguíneas apresentaram medianas inferiores nos indivíduos sintomáticos negativos em comparação aos positivos.

Exames bioquímicos de avaliação das funções hepáticas e renais não apresentaram diferenças estatísticas em seus resultados (teste *Mann-Whitney U*) comparando os grupos do estudo. Além disso, encontravam-se dentro das margens dos valores de referência [TGO - transaminase oxalacética: entre 5 e 40 unidades por litro de soro; TGP - transaminase

pirúvica: entre 7 e 56 unidades por litro de soro; Creatinina: entre 0,7 e 1,3mg/dl (homens) e entre 0,6 e 1,2mg/dl (mulheres)].

Tabela 4. Exames Complementares dos grupos sintomáticos analisados.

Exames Complementares g/dL (IQR)	Todos (N = 183)	COVID-19 (+) (N = 115)	COVID-19 (-) (N = 64)
Hemograma			
Hemácias	4,9 (4,5-5,2)	4,9 (4,6-5,2)	4,8 (4,5-5)
Hemoglobina	14,1 (13-15,2)	14,4*(13,3-15,2)	13,9 (13-14,7)
Hematócrito	41,9 (38,7-45,1)	42,6*(39,6-45,1)	41,7 (38,7-43,2)
Leucócitos	6.800 (4.580-8.500)	6.800 (5.400-8.500)	6.450 (4.580-8.175)
Neutrófilos	3.968 (2.938-5.174)	3.904 (3.074-5.174)	4.013,5(2.938-4.971)
Eosinófilos	102 (42,7-190)	96 (58-153)	107,5 (42,7-190)
Basófilos	14 (0-45)	16 (0-45)	9 (0-39)
Linfócitos	1.827 (1.265-2.414)	1.913 (1.278-2.414)	1.617,5 (1.265-2.280)
Monócitos	545 (403-747)	585 (445-747)	511,5 (403-670)
Plaquetas	236.000 (181.750-289.000)	243.000 (198.000-289.000)	221.000 (181.750-273.250)
Exames Bioquímicos			
TGO	21 (17-26,25)	21 (17-26,25)	21,5 (16-27)
TGP	22,5 (16-34)	22,5 (16-34)	22 (15,25-31)
Creatinina	0,8 (0,7-0,9)	0,8 (0,7-0,9)	0,8 (0,625-0,9)

Os resultados estão expressos em mediana, referente a coleta da visita 1. Os “*” indicam resultados significativos ($p < 0,05$) por teste *Mann-Whitney U*. Foram descritos na tabela apenas os exames que possuíam resultados para mais de 50% dos indivíduos analisados. TGO: transaminase oxalacética. TGP: transaminase pirúvica. IQR – Intervalo interquartil.

Por fim, realizou-se a quantificação dos níveis séricos das imunoglobulinas humanas IgM e IgG, entre os indivíduos sintomáticos. A concentração de IgM permaneceu semelhante nos períodos avaliados, porém a concentração de IgG aumentou significativamente no 28º dia (Visita 4) em relação ao 7º dia (Visita 2) ($p < 0,05$; teste *Wilcoxon*) nos grupos analisados, conforme demonstrado na **Tabela 5**.

Tabela 5. Avaliação do nível de IgM / IgG COVID-19 dos participantes sintomáticos.

Imunoglobulinas U/mL (IQR)	Dia[#]	COVID-19 (+)	COVID-19 (-)
IgM	7°	0,4 (0,2-0,8)	0,4 (0,1-.7)
	28°	0,3 (0,2-1)	0,3 (0,2-0,9)
IgG	7°	8,5* (3,8-57,9)	7,6* (3,8-75,15)
	28°	49,4 (7-124,5)	67,2 (5,5-200,5)

O dia se refere ao dia da coleta da amostra de sangue em relação ao primeiro dia de busca de atendimento ambulatorial no HSJ. O n° de amostras analisadas foram: COVID-19 (+), IgG 7° (N=111), 28° (N= 57); IgM 7°(N=111) 28° (N= 51); COVID-19 (-), IgG 7°(N=61) 28° (N= 56); IgM 7° (N=41), 28° (N= 39). * $p < 0,05$ para IgG no 7° dia de visita versus 28° dia para todos os grupos avaliados (Teste de *Wilcoxon*). IQR – Intervalo interquartil.

Por verificação posterior, pudemos constatar que apenas 10 haviam sido vacinados até o momento do recrutamento ou durante o período do acompanhamento do estudo, sendo eles 6 do grupo COVID-19 positivos e 4 do grupo não-COVID-19. O nosso estudo não encontrou relação entre a quantidade expressa de biomarcadores e as comorbidades relacionadas, tempo de doença ou de início de sintomas, exames complementares e níveis de imunoglobulinas.

6 DISCUSSÃO

Uma grande proporção de pacientes com infecção por SARS-CoV-2 apresenta a doença respiratória de forma leve a moderada. Porém, as informações sobre características epidemiológicas, patobiologia e respostas imunológicas neste subconjunto de pacientes são escassas. Para uma melhor compreensão dos fatores do hospedeiro que modulam o curso da infecção em indivíduos com SARS-CoV-2, comparamos os níveis de citocinas plasmáticas, quimiocinas e fatores de crescimento em 3 grupos de participantes: (1) indivíduos que procuraram atendimento ambulatorial com sintomas leves a moderados e diagnóstico positivo para COVID-19; (2) indivíduos que procuraram atendimento ambulatorial com sintomas leves a moderados porém com diagnóstico negativo para COVID-19; (3) participantes assintomáticos (grupo controle).

Quanto as características da população do nosso estudo, o sexo masculino apresentou-se em maior número no grupo controle, com diferença significativa entre este e os grupos sintomáticos. Essa diferença pode ser justificada pelos locais onde ocorreram as coletas das amostras dos grupos. Enquanto as amostras dos participantes sintomáticos ocorreram em ambiente hospitalar. Como citado, as mulheres são a maioria da população que busca esse tipo de atendimento. A coleta das amostras dos participantes do grupo controle foi realizada em um banco de sangue. A população brasileira tem um perfil doador jovem entre 18 e 29 anos, e entre a população doadora o sexo predominante é o masculino atingindo mais de 60% das doações (BRASIL, 2006).

Características pessoais como idade avançada, tabagismo, doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e câncer apresentam alto risco para COVID-19 grave e desfechos adversos associados, levando a um aumento de cinco vezes no risco de óbitos pela doença em comparação aos pacientes sem essas condições (THAKUR et al., 2021; HAMMOND et al., 2022). Porém a mortalidade entre idosos pode ser maior do que entre pessoas com condições coexistentes pré-especificadas (DOCHERTY et al., 2020; KIM et al., 2021; WU Z et al., 2020). Alguns fatores de risco para hospitalização incluem idade superior a 60 anos, sexo masculino, obesidade, fumantes e condições subjacentes incluindo hipertensão, doenças cardiovasculares, diabetes e doenças respiratórias crônicas (LIPWORTH et al., 2020).

Com relação a idade dos indivíduos recrutados pelo estudo, o grupo sintomático positivo para COVID-19 apresentou idade levemente superior (40 anos) em relação aos

outros grupos. O grupo sintomático não-COVID-19 foi o que revelou menor mediana de idade (33 anos), porém sem diferença estatística quando comparado aos outros dois grupos.

Em todos os grupos, a ausência de comorbidades foi superior a 65%, com média de 67% entre os grupos sintomáticos, fato que pode ter contribuído para a ocorrência de sintomas leves a moderada do quadro de síndrome gripal.

Doenças subjacentes podem ser fatores de risco para pacientes graves em comparação com pacientes não graves. Outros estudos mostram que doenças preexistentes estão associadas a um pior prognóstico e a uma maior chance de agravamento da doença causada pelo Coronavírus, bem como risco aumentado de morte (YANG J et al., 2020; NAGHASHPOUR et al., 2021). A hipertensão foi a comorbidade mais encontrada entre os participantes do grupo positivo para COVID-19, seguida por diabetes do tipo 2. Yang J et al., (2020) em sua revisão sistemática e metanálise relataram que as comorbidades mais prevalentes em 1.576 pacientes infectados pela COVID-19 foram hipertensão e diabetes, o que está de acordo com nossos resultados. Da mesma forma, Guan et al., (2020) apresentaram resultados semelhantes em sua população de estudo (1.590 casos de COVID-19) com a maior prevalência de hipertensão, seguida de diabetes. O perfil traçado pelo Ministério da Saúde em relação as doenças crônicas revelaram 25% de hipertensão, 20% obesidade e 7,4% de diabetes incidentes entre os brasileiros em geral. A obesidade, nos últimos anos, foi a que apresentou maior aumento, subindo de 12% em 2006 para 20% em 2019 - uma elevação de 72% ((BRASIL/UNA-SUS, 2019).

Os indivíduos sintomáticos que testaram negativo para COVID-19, assim como os participantes do grupo controle, também apresentaram a hipertensão como comorbidade mais prevalente. Porém, nessa população observou-se o tabagismo em segundo lugar. Este último é conhecidamente um dos fatores de risco para o desenvolvimento e agravamento de múltiplas doenças respiratórias, incluindo infecções por outros agentes (BRAKE et al., 2020; LEWIS et al., 2020). O tabagismo, em particular, é um dos principais contribuintes para a ocorrência de doenças respiratórias que incluem doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e câncer de pulmão (SIAFAKAS et al., 1995; MILNER, 2004). Fumar também é um fator de risco independente para a PAC devido à interrupção na reparação do epitélio respiratório e redução da depuração de bactérias nas vias aéreas (ALMIRALL et al., 2008; MÜLLEROVA et al., 2012). Apesar de hipertensão e diabetes apresentarem uma tendência de alta entre os grupos sintomáticos em relação aos participantes do grupo controle, nenhuma comorbidade apresentou relevância estatística significativa entre os grupos analisados.

Quando comparamos os sinais e sintomas clínicos dos participantes que testaram positivo e negativo para COVID-19 encontramos poucas diferenças entre os grupos, o que era esperado pela presença de indivíduos que buscaram atendimento ambulatorial nos estágios iniciais da doença (leve/moderado). No geral, foram relatados sintomas clássicos de síndrome gripal em ambos os grupos, com a dor de garganta apresentando maior prevalência entre os participantes com SRALM não-COVID-19 em comparação aos positivos. No caso dos indivíduos SRALM positivos para SARS-CoV-2, os sintomas de mialgia, febre, ageusia e anosmia, foram os mais observados quando comparados ao grupo dos participantes sintomáticos com testes negativos para SARS-CoV-2.

Assim como no nosso achado, um estudo de vigilância realizado com pessoas que testaram negativo para COVID-19 em Ontário, Canadá, relatou que entre os sintomas mais comuns dessa população constava a dor de garganta (MURTI et al., 2020). Em comparação, menos de 14% dos 55.924 casos confirmados para COVID-19 na China relataram dor de garganta (OMS, 2020). Ao longo do ano, vírus respiratórios sazonais comuns circulam na comunidade, o que pode explicar a prevalência de dor de garganta e fornecer um diagnóstico alternativo para esses indivíduos (OAHP, 2020).

Alguns estudos realizados no Brasil já revelam o perfil sintomático dos indivíduos com SRALM que testaram positivo para COVID-19, como um estudo realizado em Minas Gerais, com 162 adultos não vacinados que descreveu entre as manifestações clínicas mais frequentes a febre (67,3%), seguida de mialgia (62,4%) (FREIRE et al., 2022). Outros estudos de investigação epidemiológica realizados em profissionais da saúde, na China, apresentam a febre como principal primeiro sintoma da COVID-19, seguida de fadiga e mialgia (MENG et al., 2020).

Sabe-se que o SARS-CoV-2 invade as células humanas via enzima ECA-2 e que a captação viral é facilitada por uma protease de iniciação, TMPRSS2. HOFFMANN et al., (2020) e BILINSKA et al., (2020) mostraram em um modelo animal que tanto a proteína ECA-2 quanto a TMPRSS2 são bem expressas nas células sustentaculares do epitélio olfativo e, com menor frequência, na maioria dos neurônios receptores olfativos. Esses dados sugerem que as células sustentaculares estão envolvidas na entrada do vírus SARS-CoV-2 e no comprometimento do sentido de olfato em pacientes com COVID-19, visto que essas células desempenham papéis fundamentais no metabolismo do neurônio olfativo e a detecção de odor (HEYDEL et al., 2013). Células com alta expressão de ECA-2 e TMPRSS2 têm capacidade de promover forte ligação ao vírus, aumentando a suscetibilidade à infecção (BARILLARI et al., 2021).

Alguns resultados enfatizam que pacientes que relatam distúrbios do olfato e paladar, mesmo na ausência de outros sintomas típicos respiratórios ou gerais (tosse e febre), podem ser altamente suspeitos para infecção por COVID-19. Esses sintomas podem representar uma importante ferramenta clínica para monitorar todos os pacientes paucissintomáticos que podem não ser objetivamente testados para SARS-CoV-2 (BARILLARI et al., 2021). Recentemente, Paderno et al., (2020) observaram que a anosmia e a ageusia são mais prevalentes em indivíduos em quarentena domiciliar do que em indivíduos hospitalizados, e confirmaram que a ausência de olfato está fortemente correlacionada com a ausência de paladar, mas não com outros sintomas sugestivos de infecção das vias aéreas superiores.

Um período médio de incubação é estimado em 5 dias após exposição ao vírus, com um intervalo relatado de 2 a 14 dias do início dos sintomas (CONTINI et al., 2020; MEO et al., 2020). No nosso estudo, o tempo médio entre o aparecimento dos sintomas e a busca por atendimento ambulatorial entre os indivíduos sintomáticos, foi 4 dias, assim como as publicações anteriores.

Apesar de 88 participantes sintomáticos testarem negativos para COVID-19, não obtivemos muito sucesso em encontrar o perfil viral do agente causador da infecção dentre os vírus avaliados. Apenas 4 indivíduos testaram positivos para VSR e nenhum para Influenza A ou B. Os agentes causadores da síndrome gripal, entretanto, podem ser distintos. A gripe, além de provocada pelos vírus da família Influenza, pode ser confundida também com os sintomas do resfriado comum, geralmente causados por Rinovírus, Adenovírus e Parainfluenza, entre outros (JUVEN et al., 2000). De um total de 3.070 amostras de aspirados nasofaríngeos coletados de crianças com sintomas respiratórios agudos em hospital infantil na cidade de Fortaleza/CE, vírus respiratórios foram detectados em 976 casos (31,8%), nessa seguinte ordem de frequência: VSR, influenza A, HPIV-3 e Adenovírus (FÉ et al., 2008).

Evidências recentes mostraram que a proteína acessória codificada pela ORF7a do SARS-CoV-2 é responsável por ativar o fator de transcrição NF- κ B que é associada à expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias incluindo IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e IFN- γ (SU et al., 2021). O presente trabalho mostra uma elevação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas como IL-1 β , IL-6 e G-CSF, além de um aumento do TNF- α e IL-10 associado a infecções respiratórias leves a moderadas causadas por SARS-CoV-2, quando comparadas ao grupo controle, sugerindo uma ativação do sistema imunológico em resposta a COVID-19. Os participantes SRALM não-COVID-19 também apresentaram os biomarcadores avaliados aumentados em relação aos do grupo controle, com exceção das IL-6 e IL-10. Outros estudos também descobriram que muitas citocinas não eram diferentes

ou eram significativamente menos elevadas em COVID-19 versus Influenza (MUDD et al., 2020; KARABA et al., 2021), principalmente no perfil dos nossos participantes que se tratavam de sintomas leves a moderados.

Um recente estudo comparando o perfil de citocinas e quimiocinas em pacientes com COVID-19 e Influenza, mostraram resultados semelhantes de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em ambas as patologias, mesmo em casos de COVID-19 grave (KARABA et al., 2021). Uma sugestão de modelo para patologia da infecção respiratória leve a moderada por SARS-CoV-2 em humanos é mostrada na **Figura 8**.

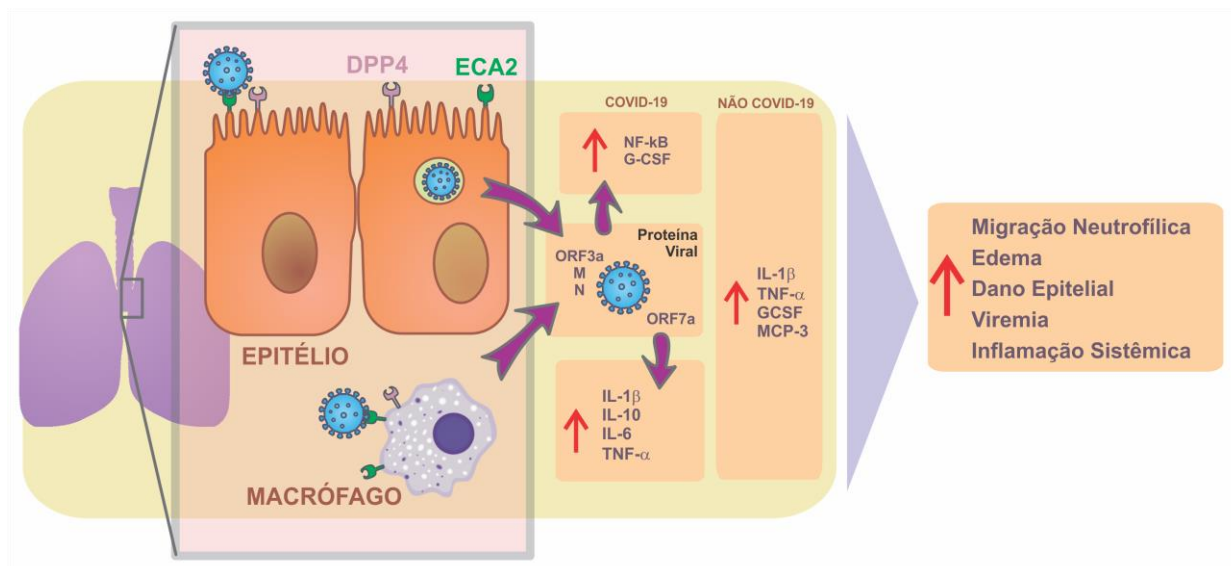


Figura 8. Modelo da patobiologia da infecção humana respiratória leve a moderada por SARS-CoV-2 e outros vírus respiratórios. Adaptado de ARRUDA et al., 2021.

Recentemente relatou-se clara correlação entre DPP4/CD26 (dipeptidil peptidase-4) e ECA-2, indicando que ambas as proteínas de membrana estão envolvidas na patogênese da entrada do vírus na célula hospedeira. Essa co-expressão como pico de receptores de glicoproteína pode assumir que diferentes Coronavírus têm como alvo diferentes tecidos humanos, explicando as características clínicas semelhantes em pacientes com diferentes níveis de infecções. Em outro caso, foi demonstrado que o DPP4 atua no co-receptor para SARS-CoV, indicando que o potencial mecanismo de entrada do SARS-CoV-2 é semelhante (SOLERTE et al., 2020).

As citocinas mais elevadas no grupo COVID-19 (+) são produzidas principalmente por macrófagos e caracterizam a síndrome de ativação macrófágica (SAM) (ARANGO et al. 2014, SCHULERT et al., 2015), enquanto interferons e citocinas envolvidos na ativação de células T são normalmente regulados positivamente na gripe. Macrófagos são as

principais fontes de citocinas inflamatórias também em outras infecções virais (MANTOVANI et al., 2019, KURIAKOSE et al., 2017, CHATTERGOON et al., 2014). A infecção por Coronavírus resulta na ativação de monócitos, macrófagos e células dendríticas, levando à secreção de citocinas pró-inflamatórias proeminentes, como IL-6, junto com outras citocinas inflamatórias. A IL-6 elevada pode ativar a sinalização cis clássica ou trans sinalização, levando à síndrome de liberação de citocinas / tempestade de citocinas (CHATTERJEE et al., 2020). Entende-se que o tempo de ativação da IL-6 é crítica, pois é necessária para a resposta precoce do sistema imunológico no combate ao SARS-CoV-2 e outras infecções virais. Níveis baixos de IL-6 nos estágios iniciais da infecção podem resultar em replicação viral descontrolada. Assim, ao invés de bloquear a liberação de IL-6, seria ideal a sua regulação (SHIRAZI et al., 2020). A IL-6 alta é uma das citocinas mais distintivas na COVID-19 (KARABA et al., 2021).

O tratamento da tempestade de citocina tornou-se uma parte fundamental na recuperação de pacientes graves com COVID-19. Para este propósito, o antagonista IL-6R Tocilizumabe foi sugerido como um biofármaco importante para o manejo dos pacientes (ZHANG C et al., 2020). Os níveis mais baixos de IL-6 nos indivíduos recuperados podem ser usados como um marcador de recuperação, associado com os efeitos benéficos relatados da terapia com bloqueio da IL-6 (XIONG Y et al., 2020). No entanto, os níveis de IL-6 nos pacientes com COVID-19 vêm se apresentando inferiores aos valores medianos normalmente relatados na SRAG (SINHA et al. 2020, KOX et al. 2020), e outros determinantes não identificados podem ser responsáveis por definir a gravidade da doença. Os níveis de expressão de citocinas relatados em estudos de pacientes com COVID-19, embora aumentados em indivíduos com doença grave, são elevados apenas marginalmente - menos de duas vezes acima dos observados em indivíduos não criticamente doentes (HUANG C et al., 2020). Além disso, poucos estudos comparam as respostas inflamatórias da COVID-19 às observadas em outras doenças virais que levam à insuficiência respiratória aguda (LEE et al., 2020).

O G-CSF é um importante regulador extracelular da hemopoiese e do sistema imunológico inato. Nomeado por sua estimulação relativamente específica do crescimento de células progenitoras de neutrófilos, *in vitro*, em culturas semissólidas (NICOLA et al., 1980 e 1983), o G-CSF influencia a sobrevivência, a proliferação e a diferenciação de todas as células na linhagem de neutrófilos, de células-tronco hematopoiéticas até neutrófilos maduros. Além disso, esse biomarcador é bem reconhecido como um potente mobilizador de células-tronco hematopoiéticas da medula óssea para o sangue e como um regulador das

respostas imunes (ROBERTS et al., 2005).

Vários estudos relatam que o G-CSF sistêmico pode exacerbar a lesão pulmonar. Wang et al., (2019.1, 2019) relataram que o bloqueio do receptor G-CSF em modelos de infecção e asma em camundongos, reduziram infiltração e inflamação mediada por neutrófilos. Na COVID-19, o aumento mais rápido da neutrofilia com NLR (razão neutrófilo/linfócito) > 5 pode pressagiar a deterioração respiratória, especialmente naqueles pacientes que têm mais de 50 anos e comorbidades (LAZARUS et al., 2021). Os níveis de G-CSF nos pacientes sintomáticos do nosso estudo apresentam-se com diferenças significativas entre os controles, mesmo quando comparados com as visitas 3 e 4 (14° e 28° dias após o recrutamento), contudo aconteceram reduções significativas entre os volumes iniciais e finais desse fator.

A infecção por SARS-CoV-2 está associada ao esgotamento de defesas antivirais, bem como a produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias (COSTELA-RUIZ et al., 2020). Alguns estudos já relataram cenário semelhante, com regulação negativa de citocinas antivirais e níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias (TRIPATHY et al., 2021). Em estudo realizado na população chinesa, demonstrou-se que IFN- γ , IL-12 e os fatores inflamatório IL-1 β e IL-6 podem induzir resposta inflamatória hiperinata devido à invasão do trato respiratório por SARS-CoV, levando à ativação de células mediadas por Th1, através da estimulação de células NK e linfócitos T citotóxicos (CTLs) (WONG et al., 2004). Pacientes de outro estudo apresentaram aumento nos níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , que se normalizaram durante a fase de recuperação com a ativação do controle a resposta (TRIPATHY et al., 2021). Esse mesmo perfil foi verificado no nosso acompanhamento dos participantes sintomáticos, onde os biomarcadores IL-1 β , IL-6 e TNF- α apresentaram-se mais elevados na visita 1, com diferenças estatísticas em relação ao grupo controle e posteriormente tiveram um decréscimo nas suas concentrações. Porém, ainda mantendo a diferença significativa com o grupo controle.

IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF são citocinas pró-inflamatórias ditadas pelo NF- κ B e são hiperproduzidas na COVID-19. Essas citocinas pró-inflamatórias estão ligadas à tempestade de citocinas, implicando as associações positivas com o desfecho da doença grave (LUCAS et al. 2020). Como a IL-1 β é em parte responsável pela tempestade de citocinas por SARS-CoV-1 e MERS-CoV (CHEUNG et al., 2005; CHU et al., 2016), a ORF7a pode desempenhar um papel significativo na gravidade clínica da COVID-19. Além das citocinas inflamatórias mediadas por NF- κ B, ORF7a também induz uma variedade de interleucinas e quimiocinas, e o aumento destas também foi relatado para pacientes com COVID-19

(LUCAS et al., 2020), o que é favorável e consistente com nossos achados.

Alguns estudos relataram que a elevação da IL-10 pode ser considerada um mecanismo de feedback negativo, com objetivo de suprimir a inflamação. A ineficiente eliminação viral em qualquer estágio da doença é uma marca registrada da COVID-19 (NAGHASHPOUR et al., 2021; LU L et al., 2021). A gravidade da doença está associada a aumentos nas citocinas do sangue periférico. Entre elas, a IL-10 aumenta particularmente de forma precoce e independentemente da idade, o que não é observado em infecções ativas por SARS-CoV-1, assim como também não foi verificado entre os nossos participantes negativos para SARS-CoV-2. O conhecido papel regulador imunológico multifacetado da IL-10 na proteção de lesões pulmonares e na defesa contra infecções, bem como sua potencial fonte celular, deve ser considerada. Embora a ausência de uma resposta de IL-10 na SARS-CoV-1 contribua para a deterioração precoce, espera-se que a IL-10 proteja os pulmões desde o início dos danos imunomediados e interfira na depuração viral da COVID-19 (LINDNER et al., 2021).

A concentração plasmática da IL-10, assim como a da IL-6, apresentaram-se positivamente correlacionados ao grupo dos positivos para COVID-19. IL-6 e IL-10 são as principais interleucinas pleiotrópicas envolvidas em potentes reações inflamatórias observadas durante qualquer infecção. Entre essas duas citocinas, a IL-6 ajuda a conduzir reações imunes de fase aguda ao recrutar células imunes na área afetada, mas em excesso podem ser responsáveis pelo choque anafilático ou tempestade de citocinas. Este fenômeno gerará maiores danos ao invés de levar a eliminação do(s) agente(s) infeccioso(s). Por outro lado, a IL-10 é responsável por manter o equilíbrio homeostático no sistema imunológico exercendo ações anti-inflamatórias. Este sistema pode controlar ou inibir a inflamação grave quando o corpo começa a se recuperar através de um mecanismo homeostático. Um resultado grave é muitas vezes sinônimo da perda de *feedback* negativo sobre a resposta imune; além disso, a secreção de citocinas gera *feedback* positivo em outras células imunes e recruta mais células imunes para os locais de inflamação, resultando em danos a diferentes órgãos. Tanto a IL-6 quanto a IL-10 estão intimamente envolvidas na patogênese da COVID-19 (JAFRIN et al., 2022; HAN et al., 2020).

Houve ainda um aumento na concentração sérica de IL-10 durante o período de acompanhamento do estudo nas visitas 3 e 4. Avaliamos que isso possa ocorrer devido ao aumento na secreção da IL-10 pelo sistema imune, na tentativa de induzir a apoptose das células de defesa em excesso. Assim, reforça o seu papel no *feedback* negativo, a fim de evitar danos aos seus tecidos normais na fase tardia da inflamação.

Encontra-se descrito que uma maior expressão dos três ligantes de CCR-2 MCP-1, MCP-2 e MPC-3 foi associada à progressão da doença. Níveis plasmáticos mais altos de MCP-3 já demonstraram ser elevados em pacientes infectados com SARS-CoV-2 com doença grave (YANGY et al., 2020). A associação ampla do transcriptoma no tecido pulmonar mostrou que a maior expressão do receptor quimiotático de monócitos-macrófagos (CCR2), o receptor para MCP-1 e MCP-3, está associado a COVID-19 grave (PAIRO-CASTINEIRA et al., 2021). No entanto, também observamos que esses ligantes de CCR2 estão associados a resultados virológicos e imunológicos positivos, incluindo carga viral orofaríngea reduzida e aumento de células T específicas de SARS-CoV-2 e níveis de IgG de ligação à proteína S. Consistente com um potencial papel benéfico, estudos em murinos descobriram que o CCR2 é essencial para a sobrevivência de camundongos após o desafio do patógeno (LIM et al., 2011; PAMER, 2009; KURIHARA et al., 1997). Em conjunto, esses resultados demonstraram o papel complexo da sinalização CCR2 na regulação das respostas imunes. Embora essencial para uma resposta imune eficaz, a superexpressão pode levar a sintomas graves e danos nos tecidos. Estratégias terapêuticas para equilibrar os efeitos positivos e negativos da sinalização CCR2 podem beneficiar o manejo de pacientes com COVID-19 (HU et al., 2022).

IP-10 pode ser expressa em uma variedade de células, e nas células epiteliais brônquicas humanas primárias é induzida especificamente por IFN- γ (SAUTY et al., 1999; DUFOUR et al., 2002). Um estudo relatou que IFN- γ encontra-se elevado no plasma de pacientes com SARS-CoV-1 no início da doença (WONG et al., 2004). No entanto, não foi possível detectar um aumento de IFN- γ no sangue ou nos pulmões de pacientes com SARS-CoV-1 em estudos anteriores (JONES et al., 2004). Outros resultados sugerem fortemente que IP-10 é produzido nas células epiteliais do pulmão, bem como nas células do sistema imunológico, por um mecanismo independente de IFN- γ , após infecção por SARS-CoV-1 (JIANG et al., 2005). No entanto, entre os sintomáticos do nosso estudo, não conseguimos verificar diferenças entre os valores de IFN- γ e IP-10, demonstrando uma fraca possibilidade dos seus usos como marcadores da infecção por SARS-CoV-2. Dessa forma, optamos por não realizar suas avaliações no grupo controle, assim como para os biomarcadores MCP-1 e IL-RA.

No nosso estudo, a PCT foi analisada pela metodologia de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Trata-se de teste sorológico imunoenzimático que se baseia na ligação antígeno-anticorpo, que se tornam detectáveis através de reações enzimáticas. Em literaturas anteriores, a PCT tem demonstrado boa sensibilidade e especificidade,

principalmente no diagnóstico de infecções bacterianas secundárias a infecção viral. No nosso estudo houve diferença significativa ($p=0,016$) entre os grupos sintomáticos COVID-19 positivos em relação aos sintomáticos negativos, apesar de um número reduzido de participantes. Um estudo retrospectivo em pacientes com COVID-19 havia mostrado que a dosagem da PCT diminuiu o uso de antibióticos sem impactar nos desfechos estudados (WILLIAMS EJ et al., 2021). Nossos achados reforçam a necessidade de avaliação multifatorial do paciente com síndrome gripal por COVID-19. Mesmo que inicialmente a busca pela unidade hospitalar tenha sido pela presença de sintomas leves a moderados, fatores inicialmente considerados como marcadores de doenças bacterianas podem estar elevados, diferindo de muito o que está descrito na literatura para pacientes mais graves.

O estudo de Jiang et al., (2005) revelou que a maioria dos pacientes negativos para SARS-CoV-1, mas com sintomas clínicos semelhantes, poderiam ser excluídos pela detecção de perfil único de citocinas / quimiocinas durante a fase inicial de doença. Assim, as medições precoces de alguns biomarcadores no sangue poderiam ser usadas como um marcador de diagnóstico alternativo para SARS-CoV-2, servindo como um complemento eficaz para os métodos baseados na detecção de anticorpos específicos, que levam de 2 a 3 semanas para fornecerem resultados sensíveis (HSUEH et al., 2003). Por outro lado, a mudança imediata no perfil de citocinas / quimiocinas no sangue de pacientes poderia ser usada como um índice de infecção secundária. No nosso estudo, a reação imunológica desencadeada por infecção com SARS-CoV-2 foi principalmente de caráter pró-inflamatório, e pode ter sido devido a uma redução da resposta antiviral de citocinas em um contexto de suprarregulação de quimiocinas.

Vale destacar que no estudo clínico de onde foram provenientes as amostras dos sintomáticos (ARTAN C-19), a intervenção farmacológica com TDF ou TDF combinado com FTC não alterou o escore de sinais e sintomas clínicos nem carga viral dos participantes em relação ao grupo placebo. Além disso, houve apenas 5 casos que apresentaram evento adverso grave (EAG), prontamente suspensos do ensaio clínico.

A coleta de sangue para análise dos biomarcadores dos sintomáticos foi realizada nas visitas 1, 3 e 4; ou seja, no ato do recrutamento e após 14 ± 3 e 28 ± 3 dias do primeiro atendimento. Esse acompanhamento não foi realizado com o grupo controle, devido a coleta para avaliação dos seus biomarcadores ter ocorrido em apenas 1 dia e sem acompanhamento posterior.

Quanto ao perfil encontrado nos exames complementares dos nossos participantes, apesar dos resultados entre os grupos analisados parecerem semelhantes, houve diferenças

significativas nos valores de hemoglobina e hematócrito, com leve superioridade nos grupos COVID-19 positivos. Com exceção dos neutrófilos e eosinófilos, todas as outras contagens de células sanguíneas apresentaram medianas inferiores nos participantes sintomáticos negativos em comparação aos positivos para SARS-CoV-2, sem significância estatística. Todos os resultados apresentados encontravam-se dentro dos valores de referência tanto para homens quanto para mulheres nos parâmetros analisados.

O hemograma é facilmente mensurável, disponível, econômico e confiável, o que pode ser muito útil para estabelecer o risco de mortalidade na admissão hospitalar e orientar decisões terapêuticas em pacientes com COVID-19. A análise das proporções obtidas das células sanguíneas no hemograma fornecem mais informações do que poderiam ser extraídas *a priori* avaliando os parâmetros isoladamente. Mais estudos são necessários para determinar quão úteis são esses exames de sangue e futuras pontuações de prognóstico, demonstrando sua utilidade na orientação das decisões de tratamento (LÓPEZ-ESCOBAR et al., 2021).

O teste utilizado na determinação quantitativa de anticorpos IgG/IgM teve como alvo as proteínas S1 e S2 do SARS-CoV-2 em amostras de soro, sem reações cruzadas com os demais Coronavírus humanos circulantes (HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 e HCoV- HKU). Já foi demonstrado que o ensaio está correlacionado com o teste de neutralização, sugerindo que ele identifique anticorpos neutralizantes e, portanto, representando uma ferramenta importante para estudar a resposta imune contra SARS-CoV-2. A presença destes anticorpos é geralmente considerada como um sinal de proteção contra um patógeno, apesar dessa proteção ainda não ter sido totalmente esclarecida para a SARS-CoV-2.

Estudos demonstram que a sensibilidade do teste antes do oitavo dia após o início dos sintomas apresenta-se inferior a 50%; nos dias 9-10, no entanto, pode se obter uma sensibilidade superior a 80% para IgM e IgG. Após 15 dias ou mais do início dos sintomas, o teste IgG para SARS-CoV-2 pode apresentar sensibilidade de 100%. Esses resultados sugerem que considerar o tempo desde o início da doença pode permitir com que os testes de anticorpos sejam muito úteis para o diagnóstico de COVID-19 e doenças semelhantes (NAKANO et al., 2021).

No presente estudo, o período de coleta para o teste IgG/IgM ocorreu primeiramente na 2ª visita (7±3 dias do dia do recrutamento). A média desde o início dos sintomas até a busca por atendimento médico ocorreu em torno de 4 dias, dentro da faixa considerada de sensibilidade superior a 80%. No entanto, identificamos uma baixa expressão de anticorpos

(IgG/IgM) nesse período inicial. O teste IgG/IgM foi realizado apenas com os grupos de sintomáticos do estudo.

O segundo momento de coleta ocorreu no 28° (± 3) dia de sintomas. Constatou-se um aumento significativo nos níveis séricos de IgG, com diferenças estatísticas entre a primeira e a segunda coleta. No entanto, esse mesmo padrão aconteceu entre participantes sintomáticos positivos e negativos para COVID-19, que pode ter ocorrido devido a infecções subclínicas ou prévias dos indivíduos negativos. Este fato já foi inclusive relatado em outros estudos (LONG et al., 2020), porém mais estudos são necessários para estabelecer se a memória específica persiste e por quanto tempo entre os grupos.

Recentemente foi sugerido que os anticorpos naturais podem explicar por que a maioria dos casos pediátricos, com diagnóstico laboratorial de infecção confirmada por SARS-CoV-2, não tem ou teve sintomas leves e se recuperaram em 1-2 semanas (CARSETTI et al., 2020). Reação cruzada de anticorpos encontrados em crianças e adultos nunca expostos ao SARS-CoV-2 (SELVA et al., 2020) podem corresponder a anticorpos naturais. Além disso, IgG isolados de pacientes com COVID-19 podem ter nenhuma ou pouquíssimas mutações somáticas (SEYDOUX et al., 2020), sugerindo assim que o repertório pré-imune ou inato pode já conter especificidades para SARS-CoV-2 (NIELSEN et al., 2020).

É importante ressaltar que o número de vacinados entre os indivíduos sintomáticos foi pequeno - apenas 10. O período da coleta dos sintomáticos ocorreu no início da fase da vacinação, quando ainda não havia disponibilidade do imunizante para a população em geral. Já entre os participantes do grupo controle, apenas 2 relataram não ter tomado nenhuma dose da vacina. O período de coleta deste grupo ocorreu posteriormente, quando grande parte da população já tinha pleno acesso a vacinação, inclusive com doses de reforço.

A COVID-19 se manifesta de várias maneiras, desde a falta de sintomas até síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) caracterizada por insuficiência respiratória e dano alveolar difuso (SCHIJNS & LAVELLE, 2020). Embora a maioria dos pacientes com distúrbios respiratórios graves se recupere com sucesso, um número substancial morre de insuficiência respiratória e/ou complicações sistêmicas. Determinar quais indivíduos têm o maior risco de desfechos adversos, incluindo a identificação de supostos fatores de risco e/ou biomarcadores para doenças graves, seria ideal para otimizar o gerenciamento médico intensivo da COVID-19. A maioria dos casos de COVID-19 permanece leve e os pacientes se recuperam do sistema imunológico natural totalmente ativo, mas 14% dos pacientes

enfrentam sintomas graves que levam à SDRA, choque séptico e falência múltipla de órgãos (HAN et al., 2020).

Uma melhor avaliação da morbidade e mortalidade associadas a essa doença fornece informações sobre biomarcadores sistêmicos que podem ser incorporados à prática para fornecer cuidados mais abrangentes aos pacientes com COVID-19, principalmente entre os hospitalizados.

Inicialmente no *screening* do nosso estudo foram recrutados 309 participantes sintomáticos. Porém, ao receberem o resultado do PCR negativo para SARS-CoV-2, muitos declinavam a permanecer no estudo e concluir as visitas subsequentes propostas. Conseguiu-se reduzir essas saídas precoces com a conscientização da importância das análises das outras causas não-COVID-19, como Influenza A/B e VSR, e assim avaliar todos os perfis de participantes com SRALM que buscaram atendimento ambulatorial no local do estudo - HSJ.

Outra limitação do nosso trabalho inclui a rapidez com que as informações mudam em relação a COVID-19, com o surgimento praticamente diário de novas publicações e dados sobre medicações aprovadas / suspensas, novas vacinas, reações adversas, tornando os registros rapidamente desatualizados. Ainda, a análise da PCT ocorreu em um grupo menor de participantes já que tivemos muita dificuldade em relação a logística de entrega dos kits devido à alta demanda ocasionada pela pandemia. Outro ponto a destacar foi que a coleta do grupo controle ocorreu posteriormente ao período da coleta dos sintomáticos, porém ainda dentro da fase pandêmica da COVID-19. Outros dados, se coletados, teriam sido úteis na nossa análise como peso / altura, para cálculo do IMC (índice de massa corpórea). Contudo, mesmo com o grande volume de publicações dos últimos anos sobre o assunto, os perfis dos pacientes com a doença leve a moderada têm sido pouco descritas. Este grupo é particularmente difícil de ser inserido nos estudos, uma vez que existe a recomendação de se evitar a procura por unidades de saúde em tal situação clínica. Dessa forma os nossos dados possibilitam a compreensão da influência das alterações biológicas da clínica da COVID-19 nesse perfil de pacientes.

7 CONCLUSÃO

Em resumo, revelamos que os níveis séricos de IL-1 β , TNF α , MCP-3 e G-CSF em pacientes com sintomas leve a moderado por COVID-19 encontravam-se mais elevados quando comparados aos pacientes assintomáticos. As citocinas pró- e anti-inflamatórias IL-6 e IL-10 foram correlacionadas positivamente com o grupo com SRALM COVID-19. A presença dos sintomas mialgia, febre, anosmia, ageusia foram associados aos pacientes COVID-19 positivos, enquanto a dor de garganta foi associada aos pacientes negativos para SARS-CoV-2.

Para monitorar a progressão da infecção por SARS-CoV-2, IL-6 e IL-10, devem ser considerados como potenciais biomarcadores para detecção de gravidade e mortalidade na COVID-19, além de auxílio na identificação de alvos terapêuticos e monitoramento de efeitos dos tratamentos autorizados. De toda forma, mais estudos ainda são necessários.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M. COVID-19 immunopathology and its clinical implications. **Arq Asma Alerg Immunol**, 4(2) :172-80. 2020.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Citocinas. In: **Imunologia celular e molecular**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, pp.253-276. 1998.
- ALMIRALL, J.; BOLIBAR, I.; SERRA-PRAT, M.; ROIG, J.; CARANDELL, E.; *et al.* New evidence of risk factors for community-acquired pneumonia: a population-based study. **Eur Respir J**, 1274–1284. 2008.
- APOSTOLOPOULOS, I. D.; AZNAOURIDIS, S. I.; TZANI, M. A. Extracting possibly representative COVID-19 biomarkers from X-ray images with deep learning approach and image data related to pulmonary diseases. **J Med Biol Eng**, 40:462-469. 2020.
- ARANGO, D. G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. **Front Immunol**, 5. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4188125/>. Acesso em: 14/12/2021.
- AREND, W. P.; GUTHRIDGE, C. J. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. **Annals of the Rheumatic Diseases**, 59: 60-64. 2000.
- AREND, W. P.; MALYAK, M.; GUTHRIDGE, C. J.; GABAY, C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. **Annu Rev Immunol**, 16:27–55. 1998. DOI 10.1146/annurev.immunol.16.1.27.
- ARMAH, H. B.; WILSON, N. O.; SARFO, B. Y.; POWELL, M. D.; BOND, V. C.; ANDERSON, W.; *et al.* Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. **Malar J**, 6:147. 2007.
- ARRUDA, E. A. G.; PIRES-NETO, R. J.; MEDEIROS, M. S.; *et al.* Clinical, Pathobiology, Efficacy, and Toxicity of Tenofovir Disoproxil Fumarate and Emtricitabine for Mild to Moderate SARS-CoV-2 Infections. **Eur J of Resp Med**, 3(3): 238 - 248. 2021. DOI 10.31488/EJRM.122.
- AZIZ, M.; FATIMA, R.; ASSALY, R. Elevated interleukin-6 and severe COVID-19: A meta-analysis. **J Med Virol**, 92(11):2283-2285. 2020. DOI 10.1002/jmv.25948.
- AZZURRI, A.; SOW, O. Y.; AMEDEI, A.; BAH, B.; DIALLO, S.; PERI, G.; *et al.* IFN-gamma-inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in Mycobacterium tuberculosis infection. **Microbes Infect**, 7:1–8. 2005.
- BACH, E. A.; AGUET, M.; SCHREIBER, R. D. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. **Annu Rev Immunol**, 15, 563–591. 1997.
- BACHELERIE, F.; BEN-BARUCH A.; BURKHARDT, A. M.; *et al.* International union of basic and clinical pharmacology. [Corrected]. LXXXIX. update on the extended family

of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. **Pharmacol Rev**, 66(1):1–79. 2014.

BARREDA, D. R.; HANINGTON, P. C.; BELOSEVIC, M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. **Dev Comp Immunol**, 28(5): 509–554, May 3. 2004.

BARILLARI, M. R.; BASTIANI, L.; LECHIEN, J. R.; *et al.* A structural equation model to examine the clinical features of mild-to-moderate COVID-19: A multicenter Italian study. **J Med Virol**, 93:983–994. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jmv.26354>. Acesso em: 13/12/2021.

BARNES, B. J.; ADROVER, J. M.; BAXTER-STOLTZFUS, A.; *et al.* Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. **J Exp Med**, 217: e20200652. 2020.

BAZAN, J. F. Shared architecture of hormone binding domains in type I and II interferon receptors. **Cell**, 61, 5 (753–754). 1990.

BEGLEY, C. G.; *et al.* Purified Porfie factors enhance the survival of human neutrophils and eosinophils in vitro: a rapid and sensitive assay for colony-stimulating factors. **Blood**, 68: 162-166. 1986.

BENEDICT, C. A. Viruses and the TNF-related cytokines, an evolving battle. **Cytokine Growth Factor Rev**, 14(3-4):349–357. 2003. DOI 10.1016/S1359-6101(03)00030-3.

BILINSKA, K.; JAKUBOWSKA, P.; VON BARTHELD, C.; BUTOWT, R. Expression of the SARS-CoV-2 entry proteins, ACE2 and TMPRSS2, in cells of the olfactory epithelium: identification of cell types and trends with age. **ACS Chem Neurosci**, 11(11): 1555-1562. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.0c00210>. Acesso em: 08/11/2021.

BLANCO-MELO, D.; NILSSON-PAYANT, B. E.; LIU, W. C.; *et al.* Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. **Cell**, S009286742030489X. 2020.

BODNAR, R. J.; YATES, C. C.; WELLS, A. IP-10 blocks vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and tube formation via inhibition of calpain. **Circ Res**, 98(5): 617–25. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Pesquisa revela o perfil de doadores e não-doadores de sangue. **Notícias da Anvisa**, Brasília, 11 jan. 2006. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2006/110106_1.htm. Acesso em: 22/02/2022.

BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil (MS). Coronavírus. **SUS**, Brasília. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus>. Acesso em: 21/02/2022.

BRASIL / UNA-SUS. Diabetes, hipertensão e obesidade avançam entre os brasileiros. **UNA-SUS**, Brasília. 2020. Disponível em: <https://www.unasus.gov.br/noticia/diabetes-hipertensao-e-obesidade-avancam-entre-os-brasileiros>. Acesso em: 10/07/2022.

- BRAKE, S. J.; BARNESLEY, K.; LU, W.; MCALINDEN, K. D.; EAPEN, M. S.; *et al.* Smoking upregulates angiotensin-converting enzyme-2 receptor: a potential adhesion site for novel coronavirus SARS-CoV-2 (Covid-19). **J Clin Med**, 841–848. 2020.
- BROGGI, A.; GHOSH, S.; SPOSITO, B.; *et al.* Type III interferons disrupt the lung epithelial barrier upon viral recognition. **Science**, 369:706–712. 2020.
- BROXMEYER, H. E.; SHERRY, B.; LU, L.; COOPER, S.; CAROW, C.; WOLPE, S. D.; *et al.* Myelopoietic enhancing effects of murine macrophage inflammatory proteins 1 and 2 on colony formation in vitro by murine and human bone marrow granulocyte/macrophage progenitor cells. **J Exp Med**, 170(5):1583-94. 1989.
- CALLAGHAN, E. Diagnostic accuracy and reliability remain key in SARS-CoV-2 testing. **MLO: Med Lab Obs**, 52:18-21. 2020.
- CALIFF, R. M. Biomarker definitions and their applications. **Exp Biol Med**, 243:213-221. 2018.
- CAMPBELL, J. D.; GANGUR, V.; SIMONS, F. E.; HAYGLASS, K. T. Allergic humans are hyporesponsive to a CXCR3 ligand-mediated Th1 immunity-promoting loop. **FASEB J**, 18:329–31. 2004.
- CARINCI, F. CoV-19: preparedness, decentralisation, and the hunt for patient zero. **BMJ**, 368:bmj.m799. 2020.
- CARNAUD, C.; LEE, D.; DONNARS, O.; PARK, S. H.; BEAVIS, A.; *et al.* Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. **J Immunol**, 163, 4647–4650. 1999.
- CARSETTI, R.; QUINTARELLI, C.; QUINTI, I.; PIANO MORTARI, E.; ZUMLA, A.; *et al.* The immune system of children: the key to understanding SARS-CoV-2 susceptibility? **Lancet Child Adolesc Heal**, 4:414–6. 2020. DOI 10.1016/S2352-4642(20)30135-8.
- CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. **Proc Natl Acad Sci USA**, 72:3666. 1975.
- CASIANO-COLON, A. E.; HULBERT, B. B.; MAYER, T. K.; WALSH, E. E.; FALSEY, A. R. Lack of sensitivity of rapid antigen tests for the diagnosis of respiratory syncytial virus infection in adults. **J Clin Virol**, 28:169–174. 2003.
- CDC. Central de Controle e Prevenção de Doença. CDC-006-00019, Revision: 03. **CDC**, 2022. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/134922/download>. Acesso em: 02/02/2022.
- CDC. Central de Controle e Prevenção de Doenças. Research Use Only 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR Primers and Probes. **CDC**, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>. Acesso em: 19/06/2022.

CEARÁ. INTEGRASUS, Indicadores / SESA – COVID-19. Informe Semanal, 12/07/2022 **Boletim epidemiológico**, Ceará. 2022. Disponível em: <https://coronavirus.fortaleza.ce.gov.br/boletim-epidemiologico.html>. Acesso em: 13/07/22.

CHATTERGOON, M.A.; LATANICH, R.; QUINN, J.; *et al.* HIV and HCV Activate the Inflammasome in Monocytes and Macrophages via Endosomal Toll-Like Receptors without Induction of Type 1 Interferon. **PLoS Pathog**, 10:e1004082-12. 2014.

CHATTERGOON, M. A.; LEVINE, J. S.; LATANICH, R.; OSBURN, W.O.; THOMAS, D. L.; COX, A. L. High plasma interleukin-18 levels mark the acute phase of hepatitis C virus infection. **J Infect Dis**, 204:1730–1740. 2011.

CHATTERJEE, S. K.; SAHA, S.; MUNOZ, M. M. Molecular pathogenesis, immunopathogenesis and novel therapeutic strategy against COVID-19. **Front Mol Biosci**, 7: 196. 2020.

CHEN, N.; ZHOU, M.; DONG, X.; *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **Lancet**, 395:507–13. 2020.

CHEN, J.; SUBBARAO, K. The immunobiology of SARS. **Annu Rev Immunol**, 25: 443–72. 2007.

CHENG, Z. J.; SHAN, J. 2019 novel coronavirus: where we are and what we know. **Infection**, 1–9. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01401-y>. Acesso em: 04/05/2022.

CHEUNG, C. Y.; *et al.* Cytokine responses in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected macrophages in vitro: Possible relevance to pathogenesis. **J Virol**, 79:7819–7826. 2005. DOI 10.1128/JVI.79.12.7819-7826. 2005.

CHI Y.; *et al.* Serum cytokine and chemokine profile in relation to the severity of coronavirus disease 2019 in China. **J Infect Dis**, 222(5):746–754. 2020.

CHOUDHURY, A.; MUKHERJEE, S. In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. **J Med Virol**, 92(10):2105-13. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25987>. Acesso em: 05/-1/2022.

CHU, H.; *et al.* Middle east respiratory syndrome coronavirus efficiently infects human primary T lymphocytes and activates the extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. **J Infect Dis**, 213: 904–914. 2016. DOI 10.1093/infdis/jiv380.

CHU, H.; CHAN, J. F.; WANG, Y.; *et al.* Comparative replication and immune activation profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in human lungs: an ex vivo study with implications for the pathogenesis of COVID-19. **Clin Infect Dis**, 12;71(6):1400-1409. 2020. DOI 10.1093/cid/ciaa410.

CLELAND, D. A.; ERANKI, A. P. Procalcitonin. In: **StatPearls** [Internet]. Publishing; Jan 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539794/>. Acesso em: 12/02/2022.

CONTI, P.; *et al.* Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVID-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies. **J Biol Regul Homeost Agents**, 34(2):327–331 5. 2020.

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

CONTINI, C.; DI NUZZO, M.; BARP, N.; BONAZZA, A.; DE GIORGIO, R.; *et al.* The novel zoonotic COVID-19 pandemic: na expected global health concern. **J Infect Dev Ctries**, 14: 254-64. 2020.

COPERCHINI, F.; *et al.* The cytokine storm in COVID-19: an overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. **Cytokine Growth Factor Rev**, 53: 25–32. 2020.

COSTELA-RUIZ, V. J.; *et al.* SARS-CoV-2 infection: the role of cytokines in COVID-19 disease. **Cytokine Growth Factor Rev**, 54:62–75. 2020.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **J Immunol**, 180(9):5771-7. 2008. DOI 10.4049/jimmunol.180.9.5771.

DANZI, G. B.; LOFFI, M.; GALEAZZI, G.; GHERBESI, E. Acute pulmonary embolism and COVID-19 pneumonia: a random association? **European Heart Journal**, 41, 19 (1858). 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa254>. Acesso em: 04/02/2022.

DEBBIA, E. A.; SCHITO, G. C.; ZORATTI, A.; GUALCO, L.; TONOLI, E.; MARCHESE, A. Epidemiology of major respiratory pathogens. **J Chemother**, 13: 205–210. 2001.

DESHMANE, S. L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **J Interferon Cytokine Res**, 29(6):313–26. 2009.

DIENZ, O.; *et al.* Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung. **Mucosal Immunol**, 5(3):258–266. 2012. DOI 10.1038/mi.2012.2.

DE SORDI, L. S.; MAGALHÃES, I. O.; CASSELHAS, D. A.; ANDRADE, M. C. The Role of Innate Immunity in COVID-19. **Health Sciences Journal**, 10(3), 5-8. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21876/rcshci.v10i3.997>. Acesso em: 14/03/2022.

DINARELLO, C. A. The IL-1 family of cytokines and receptors in rheumatic diseases. **Nat Rev Rheumatol**, 15(10):612-632. 2019.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1. **Cytokine Growth Factor Rev**, 8(4):253-65. 1997. DOI 10.1016/s1359-6101(97)00023-3.

DINARELLO, C. A.; CONTI, P.; MIER, J. W. Effects of human interleukin-1 on natural killer cell activity: is fever a host defense mechanism for tumor killing? **Yale J Biol Med**, 59(2): 97-106. 1986.

DOCHERTY, A. B.; HARRISON, E. M.; GREEN, C. A.; *et al.* Features of 20133 UK patients in hospital with Covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: prospective observational cohort study. **BMJ**, 369:m1985-m1985. 2020.

DOS SANTOS, G.; KUTUZOV, M. A.; RIDGE, K. M. The inflammasome in lung diseases. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 303(8):L627-33. 2012. DOI 10.1152/ajplung.00225.2012.

DUFOUR, J. H.; DZIEJMAN, M.; LIU, M. T.; LEUNG, J.H.; LANE, T. E.; LUSTER, A. D. IFN- γ inducible protein 10 (IP-10, CXCL10) - deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. **J Immunol**, 168:3195–3204. 2002.

DYER, K. D.; PERCOPO, C. M.; FISCHER, E. R.; GABRYSZEWSKI, S. J.; ROSENBERG, H. F. Pneumoviruses infect eosinophils and elicit MyD88-dependent release of chemoattractant cytokines and interleukin-6. **Blood**, 114:2649–56. 2009.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. SARS-CoV-2 variants of concern as of 30 June 2022. **ECDC**. 2022. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu>. Acesso em: 04/07/ 2022.

EGUCHI, K.; MANABE, I. Toll-Like receptor, lipotoxicity and chronic inflammation: the pathological link between obesity and cardiometabolic disease. **J Atheroscler Thromb**, 21(7):629-39. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5551/jat.22533>. Acesso em: 04/05/ 2022.

ENDERLIN, M.; KLEINMANN, E. V.; STRUYF, S.; BURACCHI, C.; VECCHI, A.; *et al.* TNF-alpha and the IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10/CXCL-10) delivered by parvoviral vectors act in synergy to induce antitumor effects in mouse glioblastoma. **Cancer Gene Ther**, 16:149–60. 2009.

FAJGENBAUM, D. C.; JUNE, C. H. Cytokine storm. **N Engl J Med**, 383:2255-2273. 2020.

FÉ, M. M.; MONTEIRO, A. J.; MOURA, F. A. Parainfluenza virus infections in a tropical city: clinical and epidemiological aspects. **Brazilian J of Infect Diseases**, v. 12, n. 3, pp. 192-197. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-86702008000300006>. Acesso em: 17/08/2022.

FERNANDEZ-NIETO, D.; JIMENEZ-CAUHE, J.; SUAREZ-VALLE, A.; MORENO-ARRONES, O. M.; SACEDA-CORRALO, D.; *et al.* Characterization of Acute Acral Skin Lesions in Nonhospitalized Patients: A Case Series of 132 Patients during the COVID-19 Outbreak. **J Am Acad Dermatol**, 83, e61–e63. 2020. DOI10.1016/j.jaad.2020.04.093.

FERNANDEZ-SABE, N.; CARRATALA, J.; ROSON, B.; DORCA, J.; VERDAGUER, R.; *et al.* Community-acquired pneumonia in very elderly patients: causative organisms, clinical characteristics, and outcomes. **Medicine**, Baltimore, 82:159–169. 2003.

FERRERO-MILIANI, L.; NIELSEN, O. H.; ANDERSEN, O. S.; GIRARDIN, S. E. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1² generation.

Review. British Society for Immunology, **Clinical and Experimental Immunology**, 147: 227-235. 2006.

FERRONATO, A. E.; GILIO, A. E.; FERRARO, A. A.; PAULIS, M.; VIEIRA, S. E. Etiological diagnosis reduces the use of antibiotics in infants with bronchiolitis. **Clinics**, Sao Paulo, Brazil, 67, 1001–1006. 2012.

FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med**, 170(6): 2081-95. 1989. DOI 10.1084/jem.170.6.2081.

FLAISHON, L.; HERSHKOVIZ, R.; LANTNER, F.; LIDER, O.; ALON, R.; *et al.* Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells. **J Exp Med**, 192, 1381– 1388. 2000.

FOX, S. E.; AKMATBEKOV, A.; HARBERT, J. L.; *et al.* Pulmonary and cardiac pathology in Covid-19: the first autopsy series from New Orleans. **Lancet Resp Med**, 8: P681–6. 2021.

FREIRE, M. L.; ALVES, L. L.; DE SOUZA, C. S.; SALIBA, J. W.; FARIA, V.; *et al.* Performance differences among commercially available antigen rapid tests for COVID-19 in Brazil. **PLoS One**, 17(6):e0269997. Jun 16, 2022. DOI 10.1371/journal.pone.0269997.

FRUCHT, D. M.; FUKAO, T.; BOGDAN, C.; SCHINDLER, H.; O'SHEA, J. J.; KOYASU, S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. **Trends Immunol**, 22, 556– 560. 2001.

GANESH, B.; RAJAKUMAR, T.; MALATHI, M.; MANIKANDAN, N.; NAGARAJ, J.; *et al.* Epidemiology and pathobiology of SARS-CoV-2 (COVID-19) in comparison with SARS, MERS: An updated overview of current knowledge and future perspectives. **Clinical Epidemiology and Global Health**, 10,100694. 2021. ISSN 2213-3984. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cegh.2020.100694>. Acesso em: 24/05/2022.

GARCIA-GARCIA, M. L.; CALVO, C.; POZO, F.; VILLADANGOS, P. A.; PEREZ-BRENA, P.; CASAS, I. Spectrum of respiratory viruses in children with community-acquired pneumonia. **Pediatric Infect Dis J**, 31, 808–813. 2012.

GESSANI, S.; BELARDELLI, F. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. **Cytokine Growth Factor Rev**, 9, 117– 123. 1998.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; NETEA, M. G.; ROVINA, N.; KOULOURIS, N.; GOGOS, C.; KOUTSOUKOU, A. Complex immune dysregulation in COVID19 patients with severe respiratory failure. **Cell Host & Microbe**, 27:1-9. 2020.

GONZÁLEZ-CALLE, D.; EIROS, R.; SÁNCHEZ, P. L. Corazón y SARS-CoV-2. **Med Clin**, Barcelona. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2022.07.002>. Acesso em: 23/06/2022.

GRIFFITH, J. W.; SOKOL, C. L.; LUSTER, A. D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annu Rev Immunol**, 32:659-702. 2014.

- GRUNIG, G.; CORRY, D. B.; LEACH, M. W.; SEYMOUR, B. W.; KURUP, V. P.; RENNICK, D. M. Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. **J Exp Med**, 185: 1089-1099. 1997.
- GUAN, W. J.; *et al.* Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: a nationwide analysis. **Eur Respir J**, 55(5). 2020.
- GUZIK, T. J.; MOHIDDIN, S. A.; DIMARCO, A.; PATEL, V.; SAVVATIS, K.; MARELLI-BERG, F. M.; *et al.* COVID-19 and the cardiovascular system: implications for risk assessment, diagnosis, and treatment options. **Cardiovasc Res**, 116:1666–87. 2020.
- HAEBERLE, H. A.; KUZIEL, W. A.; DIETERICH, H. J.; CASOLA, A.; GATALICA, Z.; GAROFALO, R. P. Inducible expression of inflammatory chemokines in respiratory syncytial virus-infected mice: role of MIP-1alpha in lung pathology. **J Virol**, 75(2):878-90. 2001. DOI 10.1128/JVI.75.2.878-890.
- HAMADE, B.; HUANG, D. T. Procalcitonin: where are we now? **Crit Care Clin**, 36(1):23-40. 2020. DOI 10.1016/j.ccc.2019.08.003.
- HAMMOND, J.; LEISTER-TEBBE, H.; GARDNER, A.; ABREU, P.; BAO, W.; *et al.* Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19. **New England J of medicine**, 10.1056/NEJMoa2118542. 2022. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2118542>. Acesso em: 23/04/2022.
- HAN, H.; *et al.* Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. **Emerg Microbes Infect**, 9(1): 1123-1130. 2020.
- HARRIS, D. P.; HAYNES, L.; SAYLES, P. C.; DUSO, D. K.; EATON, S. M.; *et al.* Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. **Nat Immunol**, 1, 475– 482. 2000.
- HARTUNG, T. Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor. **Curr Opin Hematol**, 5(3):221-5. 1998.1.
- HARTUNG, T.; AULOCK, S. V.; WENDEL, A. Role of granulocyte colony-stimulating factor in infection and inflammation. **Med Microbiol Immunol**, 187(2):61–69. 1998.2.
- HE, F.; DENG, Y.; LI, W. Coronavirus disease 2019: what we know? **J Med Virol**, 92: 719–725. 2020.
- HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochem J**, 265(3):621-636. 1990.
- HEYDEL, J. M.; COELHO, A.; THIEBAUD, N.; *et al.* Odorant-binding proteins and xenobiotic metabolizing enzymes: implications in olfactory perireceptor events. **Anat Rec**, 296(9): 1333-1345. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ar.22735>. Acesso em: 07/07/2022.

HOFFMANN, K. F.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **J Immunol**, 164: 6406-6416. 2000.

HOFFMANN, M.; KLEINE-WEBER, H.; SCHROEDER, S.; *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **Cell**, 181(2):271-280. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>. Acesso em: 07/05/2022.

HSIEH, Y. H.; CHEN, C. W.; SCHMITZ, S. F.; KING, C. C.; CHEN, W. J.; WU, Y. C.; *et al.* Candidate genes associated with susceptibility for SARS-coronavirus. **Bull Math Biol**, 72:122–32. 2009.

HSUEH, P. R.; HSIAO, C. H.; YEH, S. H.; WANG, W. K.; CHEN, P. J.; *et al.* SARS Research Group of National Taiwan University College of Medicine and National Taiwan. Microbiologic characteristics, serologic responses, and clinical manifestations in severe acute respiratory syndrome. **Emerg Infect Dis**, Taiwan, 9:1163–1167. 2003.

HU, B.; YASUI, K. Effects of colony stimulating factors (CSFs) on neutrophil apoptosis: possible roles at inflammations site. **Int J Hematolog**, 66:179-88. 5. 2003.

HU, Z.; VAN DER PLOEG, K.; CHAKRABORTY, S.; ARUNACHALAM, P.; MORI, D.; *et al.* Early immune responses have long-term associations with clinical, virologic, and immunologic outcomes in patients with COVID-19. **Res Sq**, [Preprint], rs.3.rs-847082. Feb 2, 2022. DOI 10.21203/rs.3.rs-847082/v1.

HUANG, C.; WANG, Y.; LI, X.; *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**, 395(10223):497–506. 2020.

HUANG, I.; PRANATA, R.; LIM, M. A.; OEHADIAN, A.; ALISJAHBANA, B. C-reactive protein, procalcitonin, D-dimer, and ferritin in severe coronavirus disease-2019: a meta-analysis. **Ther Adv Respir Dis**, 14:1753466620937175. 2020.

HUANG, P.; LIU, T.; HUANG, L.; *et al.* Use of chest CT in combination with negative RT-PCR assay for the 2019 novel coronavirus but high clinical suspicion. **Radiology**. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1148/radiol.2020200330>. Acesso em: 14/07/2022.

HUIJSKENS, E. G.; BIESMANS, R. C.; BUITING, A. G.; OBIHARA, C. C.; ROSSEN, J. W. Diagnostic value of respiratory virus detection in symptomatic children using real-time pcr. **Virol J**, 9, 276. 2012.

ISAACS, A.; LINDERMAN, J. Virus interference. I. The interferon. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. **Sci**, 147, 258–267. 1957.

IWASAKI, A.; PILLAI, P. S. Innate immunity to influenza virus infection. **Nat Rev Immunol**, 14(5): 315–328. 2014. DOI 10.1038/nri3665.

JAIN, S.; SELF, W. H.; WUNDERINK, R. G.; FAKHRAN, S.; BALK, R.; *et al.* Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among US. Adults. **N Engl J Med**, 373, 415–427. 2015.

- JAIN, V.; ARMAH, H. B.; TONGREN, J. E.; NED, R. M.; WILSON, N. O.; CRAWFORD, S.; *et al.* Plasma IP-10, apoptotic and angiogenic factors associated with fatal cerebral malária in India. **Malar J**, 7:83. 2008.
- JAFRIN, S.; AZIZ, M. A.; ISLAM, M. S. Elevated Levels of Pleiotropic Interleukin-6 (IL-6) and Interleukin-10 (IL-10) are Critically Involved With the Severity and Mortality of COVID-19: An Updated Longitudinal Meta-Analysis and Systematic Review on 147 Studies. **Biomark Insights**, 17: 11772719221106600. Jun 16, 2022. DOI 10.1177/11772719221106600.
- JIANG, Y.; *et al.* Characterization of cytokine/chemokine profiles of severe acute respiratory syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, 171(8):850–857. 2005.
- JIANG Y.; BELLER, D. I.; FRENDEL, G.; GRAVES, D. T. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. **J Immunol**, 148(8):2423-8. 1992.
- JIANG, Y.; VALENTE, A. J.; WILLIAMSON, M. J.; ZHANG, L.; GRAVES, D. T. Post-translational modification of a monocyte-specific chemoattractant synthesized by glioma, osteosarcoma, and vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem**, 265(30): 18318-21. 1990.
- JONES, B. M.; MA, E. S.; PEIRIS, J. S.; WONG, P. C.; HO, J. C.; *et al.* Prolonged disturbances of in vitro cytokine production in patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) treated with ribavirin and steroids. **Clin Exp Immunol**, 135:467–473. 2004.
- JOSEPHSON, K.; LOGSDON, N. J.; WALTER, M. R. Crystal Structure of the IL-10/IL-10R1 Complex Reveals a Shared Receptor Binding Site. **Immunity**, 14 (35 – 46). 2001.
- JOSS, A.; AKDIS, M.; FAITH, A.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. **Eur J Immunol**, 30: 1683-1690. 2000.
- JULKUNEN, I.; MELEN, K.; NYQVIST, M.; PIRHONEN, J.; SARENEVA, T.; MATIKAINEN, S. Inflammatory responses in influenza A virus infection. **Vaccine**, 19: S32–S37. 2000.
- JUVEN, T.; MERTSOLA, J.; WARIS, M.; LEINONEN, M.; MEURMAN, O.; *et al.* Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. **Pediatr Infect Dis J**, 19: 293-298. 2000.
- KARABA, A. H.; ZHOU, W.; HSIEH, L. L.; *et al.* Differential Cytokine Signatures of SARS-CoV-2 and Influenza Infection Highlight Key Differences in Pathobiology. **Clin Infect Dis**, ciab376. 2021.
- KEDDIE, S.; ZIFF, O.; CHOU, M. L.; *et al.* Laboratory biomarkers associated with COVID-19 severity and management. **Clin Immunol**, 221:108614. 2020.
- KERMALI, M.; KHALSA, R. K.; PILLAI, K.; ISMAIL, Z.; HARKY, A. The role of biomarkers in diagnosis of COVID-19 - a systematic review. **Life Sci**, 254:117788. 2020.

- KIM, L.; GARG, S.; O'HALLORAN, A.; *et al.* Risk factors for intensive care unit admission and in-hospital mortality among hospitalized adults identified through the US Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) – Associated Hospitalization Surveillance Network (COVID-NET). **Clin Infect Dis**, 72(9):e206-e214. 2021.
- KIP, M.A.; VAN OERS, J. A.; SHAJIEI, A.; BEISHUIZEN, A.; BERGHUIS, A. S.; *et al.* Cost-effectiveness of procalcitonin testing to guide antibiotic treatment duration in critically ill patients: results from a randomised controlled multicentre trial in the Netherlands. **Crit Care**, 22(1):293. 2018. DOI 10.1186/s13054-018-2234-3.
- KOTFIS, K.; *et al.* COVID-19: ICU delirium management during SARS-CoV-2 pandemic. **Crit. Care**, 24, 176. 2020.
- KOX, M.; WAALDERS, N. B.; KOOISTRA, E. J.; GERRETSEN, J. & PICKKERS, P. Cytokine levels in critically ill patients with COVID-19 and other conditions. **JAMA**. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.17052>. Acesso em: 14/03/2022.
- KRITAS, S. K.; RONCONI, G.; CARAFFA, A.; GALLENGA, C. E.; ROSS, R.; CONTI, P. Mast cells contribute to coronavirus-induced inflammation: new anti-inflammatory strategy. **J Biol Regul Homeost Agents**, 34(1). 2020. DOI 10.23812/20-Editorial-Kritas.
- KURIAKOSE, T.; KANNEGANTI, T. D. Regulation and functions of NLRP3 inflammasome during influenza virus infection. **Mol Immunol**, 86:56–64. 2017.
- KURIHARA, T.; WARR, G.; LOY, J. & BRAVO, R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. **J Exp Med**, 186, 1757–1762. 1997.
- LAM, C. W.; CHAN, M. H.; WONG, C. K. Severe acute respiratory syndrome: clinical and laboratory manifestations. **Clin Biochem Ver**, 25:121–32. 2004.
- LAZARUS, H. M.; GALE, R. P. Is G-CSF Dangerous in COVID-19: Why Not Use GM-CSF? **Acta Haematol**, 144(3):350-351. 2021. DOI 10.1159/000512574.
- LEE, J. S.; PARK, S.; JEONG, H. W.; AHN, J. Y.; CHOI, S. J.; *et al.* Immunophenotyping of COVID-19 and influenza highlights the role of type I interferons in development of severe COVID-19. **Sci Immunol**, 5, eabd1554. 2020.
- LEE, S. T.; CHU, K.; JUNG, K. H.; KO, S. Y.; KIM, E. H.; SINN, D. I.; *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor enhances angiogenesis after focal cerebral ischemia. **Brain Res**, 1058(1-2):120-8. 2005.
- LEGG, J. P.; WARNER, J. A.; JOHNSTON, S. L.; WARNER, J. O. Frequency of detection of picornaviruses and seven other respiratory pathogens in infants. **Pediatr Infect Dis J**, 24: 611-616. 2005.
- LEISMAN, D. E.; DEUTSCHMAN, C. S.; LEGRAND, M. Facing COVID-19 in the ICU: Vascular Dysfunction, Thrombosis, and Dysregulated Inflammation. **Intensive Care Med**, 46, 1105–1108. 2020. DOI 10.1007/s00134-020-06059-6.

- LEWIS, T. Smoking or vaping may increase the risk of a severe coronavirus infection. **Sci Am**, 1–4. 2020.
- LI, C. C.; WANG, L.; ENG, H. L.; YOU, H. L.; CHANG, L. S.; *et al.* Correlation of pandemic (H1N1) 2009 viral load with disease severity and prolonged viral shedding in children. **Emerg Infect Dis**, 16: 1265-1272. 2010.
- LI, G.; FAN, Y.; LAI, Y.; HAN, T.; LI, Z.; *et al.* Coronavirus infections and immune responses. **Journal of Medical Virology**, 92(4), 424-432. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jmv.25685>. Acesso em: 14/03/2022.
- LIBBY, P.; LÜSCHER, T. COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. **Eur Heart J**, 41:3038–44. 2020.
- LIENHARDT, C.; AZZURRI, A.; AMEDEI, A.; FIELDING, K.; SILLAH, J.; SOW, O. Y.; *et al.* Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. **Eur J Immunol**, 32:1605–13. 2002.
- LIM, J. K.; *et al.* Chemokine receptor Ccr2 is critical for monocyte accumulation and survival in West Nile virus encephalitis. **J Immunol**, 186, 471–478. 2011.
- LIN, L.; LU, L.; CAO, W.; *et al.* Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection-a review of immune changes in patients with viral pneumonia. **Emerg Microbes Infect**, 9(1):727–32. 2020.
- LINDNER, H. A.; *et al.* Lung Protection vs. Infection Resolution: Interleukin 10 Suspected of Double-Dealing in COVID-19. **Front Immunol**, 12: 602130. 2021.
- LIPWORTH, B.; CHAN, R.; LIPWORTH, S.; RUIWEN KUO, C. Weathering the cytokine storm in susceptible patients with severe SARS-CoV-2 infection. **J Allergy Clin Immunol Pract**, 8:1798-801. 2020.
- LIU, Y.; DU, X.; CHEN, J.; JIN, Y.; PENG, L.; *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. **Journal of Infection**. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.002>. Acesso em: 23/05/2022.
- LIU, L.; CALLAHAN, M. K.; HUANG, D.; RANSOHOFF, R. M. Chemokine receptor CXCR3: na unexpected enigma. **Curr Top Dev Biol**, 68:149–81. 2005.
- LIU, M.; GUO, S.; HIBBERT, J. M.; JAIN, V.; SINGH, N.; *et al.* CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. **Cytokine & growth factor reviews**, 22(3), 121-130. 2011.
- LO, B. K.; YU, M.; ZLOTY, D.; COWAN, B.; SHAPIRO, J.; MCELWEE, K. J. CXCR3/ligands are significantly involved in the tumorigenesis of basal cell carcinomas. **Am J Pathol**, 12. 2010.
- LOETSCHER, M.; GERBER, B.; LOETSCHER, P.; JONES, S. A.; PIALI, L.; *et al.* Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. **J Exp Med**, 184:963–9. 1996.

LONG, Q. X.; LIU, B. Z.; DENG, H. J.; WU, G. C.; DENG, K.; *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. **Nat Med**, Jun; 26(6):845-848. 2020. DOI 10.1038/s41591-020-0897-1.

LÓPEZ-ESCOBAR, A.; MADURGA, R.; CASTELLANO, J. M.; RUIZ DE AGUIAR, S.; VELÁZQUEZ, S.; *et al.* Hemogram as marker of in-hospital mortality in COVID-19. **J Investig Med**, 69(5):962-969. 2021. DOI 10.1136/jim-2021-001810.

LU, L.; *et al.* A Potential Role of Interleukin 10 in COVID-19 Pathogenesis. **Trends Immunol**, 42(1): 3-5. 2021.

LU, Q.; ZHU, Z.; TAN, C.; ZHOU, H.; HU, Y.; *et al.* Changes of serum IL-10, IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α , IP-10 and IL-4 in COVID-19 patients. **Int J Clin Pract**, 75(9):e14462. 2021. DOI 10.1111/ijcp.14462.

LUCAS, C.; WONG, P.; KLEIN, J.; *et al.* Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature**. 2020. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41586-020-2588-y>. Acesso em: 22/06/2022.

LUO, L.; XU, M.; DU, M.; *et al.* Early coagulation tests predict risk stratification and prognosis of COVID-19. **Aging**, 12:15918-15937. 2020.

LUSTER, A. D. Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N Engl J Med**, 338:436–444. 1998.

LUSTER, A. D.; RAVETCH, J. V. Biochemical characterization of a gamma interferon inducible cytokine (IP-10). **J Exp Med**, 166:1084–97. 1987.

MACINTYRE, C. R.; CAUCHEMEZ, S.; DWYER, D. E.; SEALE, H.; CHEUNG, P.; *et al.* Face mask use and control of respiratory virus transmission in households. **Emerg Infect Dis**, 15(2):233–41. 2009.

MAHAJAN, K.; CHAND NEGI, P.; GANJU, N.; ASOTRA, S. Cardiac biomarker-based risk stratification algorithm in patients with severe COVID-19. **Diabetes Metab Syndr**, 14:929-931. 2020.

MANTLO, E.; BUKREYEVA, N.; MARUYAMA, J.; PAESSLER, S.; HUANG, C. Antiviral activities of type I interferons to SARS-CoV-2 infection. **Antivir Res**, 179: 104811. 2020.

MANTOVANI, A.; DINARELLO, C. A.; MOLGORA, M.; GARLANDA, C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. **Immunity**, 50:778– 795. 2019.

MAO, L.; *et al.* Neurologic manifestations of hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. **JAMA Neurol**, 77, 683–690. 2020.

MARQUES, R. E.; MARQUES, P. E.; GUABIRABA, R.; TEIXEIRA, M. M. Exploring the homeostatic and sensory roles of the immune system. **Front Immunol**, 7:125. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2016.00125>. Acesso em: 13/02/2022.

MARTIN, E. T.; KUYPERS, J.; WALD, A.; ENGLUND, J. A. Multiple versus single virus respiratory infections: viral load and clinical disease severity in hospitalized children. **Influenza Other Respi Viruses**, 6: 71-77. 2012.

MARZANO, A. V.; GENOVESE, G.; FABBROCINI, G.; PIGATTO, P.; MONFRECOLA, G.; *et al.* Varicella-like Exanthem as a Specific COVID-19-Associated Skin Manifestation: Multicenter Case Series of 22 Patients. **J Am Acad Dermatol**, 83, 280–285. 2020. DOI 10.1016/j.jaad.2020.04.044.

MCELVANEY, O. J.; *et al.* Characterization of the Inflammatory Response to Severe COVID-19 Illness. **Am J Respir Crit Care Med**, 202, 812–821. 2020.

MCDONOUGH, E. A.; BARROZO, C. P.; RUSSELL, K. L.; METZGAR, D. A multiplex PCR for detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, and *Bordetella pertussis* in clinical specimens. **Mol Cell Probes**, 19: 314–322. 2005.

MCGONAGLE, D.; SHARIF, K.; O'REGAN, A.; BRIDGEWOOD, C. The role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease. **Autoimmun Ver**, 19(6): 102537. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102537>. Acesso em: 11/02/2022.

MEHTA, P.; MCAULEY, D. F.; BROWN, M.; SANCHEZ, E.; TATTERSALL, R. S.; MANSON, J. J. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. **Lancet**, 395(10229): 1033-4. 2020. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0). Acesso em: 02/04/2022.

MEISTER, T. L.; DREISMEIER, M.; BLANCO, E. V.; BRÜGGEMANN, Y.; HEINEN, N.; KAMPF, G.; *et al.* Low risk of SARS-CoV-2 transmission by fomites - a clinical observational study in highly infectious COVID-19 patients. **J Infect Dis**, May 5:jiac170. 2022. DOI 10.1093/infdis/jiac170.

MENG, L.; MA, B.; CHENG, Y.; BIAN, Z. Epidemiological Investigation of OHCWs with COVID-19. **J Dent Res**, Dec; 99(13):1444-1452. 2020. DOI 10.1177/0022034520962087.

MEO, S. A.; ALHOWIKAN, A. M.; AL-KHLAIWI, T.; MEO, I. M.; HALEPOTO, D. M.; *et al.* Novel coronavirus 2019-nCoV: prevalence, biological and clinical characteristics comparison with SARS-CoV and MERS-CoV. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 24:2012-9. 2020.

METCALF, D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. **Blood**, 67(2):257–267. 1986.

MILNER, D. The physiological effects of smoking on the respiratory system, **Nurs Times**, 56–59. 2004.

MOLAEI, S.; DADKHAH, M.; ASGHARIAZAR, V.; KARAMI, C.; SAFARZADEH E. The immune response and immune evasion characteristics in SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2: Vaccine design strategies. **International immunopharmacology**,

107051. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107051>. Acesso em: 01/02/2022.

MOORE, K. W.; *et al.* INTERLEUKIN-10 AND THE INTERLEUKIN-10 RECEPTOR. **Annual review of immunology**, 19 (683–765). 2001.

MORIYAMA, M.; HUGENTOBLER, W. J.; IWASAKI, A. Seasonality of Respiratory Viral Infections. **Annual Review of Virology** 7:1, 83-101. 2020.

MORROW, A.; GRAY, S. R.; BAYES, H. K.; SYKES, R.; MCGARRY, E.; *et al.* Prevention and early treatment of the long-term physical effects of COVID-19 in adults: design of a randomised controlled trial of resistance exercise—CISCO-21. **Trials**, 23:660. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13063-022-06632-y>. Acesso em: 12/07/2020.

MUDD, P. A.; CRAWFORD, J. C.; TURNER, J. S.; *et al.* Distinct inflammatory profiles distinguish COVID-19 from influenza with limited contributions from cytokine storm. **Science Advances**, eabe3024. 2020.

MÜLLEROVA, H.; CHIGBO, C.; HAGAN, G. W.; WOODHEAD, M. A.; MIRAVITLLES, M.; *et al.* Wedzicha, The natural history of community-acquired pneumonia in COPD patients: a population database analysis. **Respir Med**, 1124–1133. 2012.

MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**, 95(10):3032-43. 2000. *Review*.

MURTI, M.; WHELAN, M.; SAUNDERS, A.; HOHENADEL, K.; GUBBAY, J.; *et al.* Surveillance of persons-who tested negative for COVID-19 in Ontario, January 22-February 22, 2020. **Can Commun Dis Rep**, 46(5):150-154. 2020. DOI 10.14745/ccdr.v46i05a08.

NAGHASHPOUR, M.; GHIASSIAN, H.; MOBARAK, S.; ADELIPOUR, M.; PIRI, M.; *et al.* Profiling serum levels of glutathione reductase and interleukin-10 in positive and negative-PCR COVID-19 outpatients: a comparative study from South western Iran. **J Med Virol**. 2021. DOI 10.1002/jmv.27464.

NAKANO, Y.; KURANO, M.; MORITA, Y.; *et al.* Time course of the sensitivity and specificity of anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies for symptomatic COVID-19 in Japan. **Sci Rep**, 11, 2776. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82428-5>. Acesso em: 22/05/2022.

NALBANDIAN, A.; *et al.* Post-acute COVID-19 syndrome. **Nat. Med**, 27, 601–615. 2021.

NEVILLE, L. F.; MATHIAK, G.; BAGASRA, O. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kDa (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C–X–C chemokine superfamily. **Cytokine Growth Factor Rev**, 8:207–19. 1997.

NG, P. C.; LAM, C. W.; LI, A. M.; WONG, C. K.; CHENG, F. W.; *et al.* Inflammatory cytokine profile in children with severe acute respiratory syndrome. **Pediatrics**, 113: e7–e14. 2004.

- NG, P. C.; LI, K.; WONG, R. P.; CHUI, K.; WONG, E.; *et al.* Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, 88:F209–F213. 2003.
- NICOLA, N. A.; BURGESS, A. W.; STABER, F. G.; JOHNSON, G. R.; METCALF, D.; *et al.* Differential expression of lectin receptors during hemopoietic differentiation: enrichment for granulocyte-macrophage progenitor cells. **J Cell Physiol**, 103(2):217-37. 1980. DOI 10.1002/jcp.1041030207.
- NICOLA, N. A.; METCALF, D.; MATSUMOTO, M.; JOHNSON, G. R. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. **J Biol Chem**, 258(14):9017-23. 1983.
- NIELSEN, S. A.; YANG F.; JACKSON, K. L.; HOH, R. A.; RÖLTGEN, K.; *et al.* Human B Cell Clonal Expansion and Convergent Antibody Responses to SARS-CoV-2. **Cell Host Microbe**, 28(4):516–25. 2020. DOI 10.1016/j.chom.2020.09.002.
- OLEKSOWICZ, L.; DUTCHER, J. P. A Review of the New Cytokines: IL-4, IL-6, IL-11, and IL-12. **Am J Ther**, 1(2):107–115. 1994. DOI 10.1097/00045391-199408000-00002.
- OMS. Organização Mundial de Saúde. SARS-CoV-2 variants. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. Acesso em: 10/02/2022.
- OMS. Organização Mundial de Saúde. Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus [nCoV] infection is suspected. 2022. Disponível em: [https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novelcoronavirus-\[ncov\]-infection-is-suspected](https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novelcoronavirus-[ncov]-infection-is-suspected). Acesso em: 09/02/ 2022.
- OMS. Organização Mundial de Saúde. Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Geneva, Switzerland: **WHO**; 2020. Disponível em: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-oncovid-19-final-report.pdf>. Acesso em: 13/12/2022.
- OAHP. Ontario Agency For Health Protection And Promotion (Public Health Ontario). Ontario Respiratory Pathogen Bulletin. Toronto, ON: **Queen's Printer for Ontario**; 2020.
- OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/brasil>. Acesso em: 12/01/2022.
- OPDENAKKER, G.; FROYEN, G.; FITEN, P.; PROOST, P.; VAN DAMME, J. Human monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3): molecular cloning of the cDNA and comparison with other chemokines. **Biochem Biophys Res Commun**, 191(2):535-42. 1993.
- OPENSHAW, P. J. What does the peripheral blood tell you in SARS? **Clin Exp Immunol**, 136:11–12. 2004.
- PADERNO, A.; SCHREIBER, A.; GRAMMATICA, A.; *et al.* Smell and taste alterations in covid-19: a cross-sectional analysis of different cohorts. **Int Forum Allergy Rhinol**. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/alr.22610>. Acesso em: 10/03/2022.

- PAIRO-CASTINEIRA, E.; *et al.* Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. **Nature**, 591, 92–98. 2021.
- PAMER, E. G. Tipping the balance in favor of protective immunity during influenza virus infection. **Proc Natl Acad Sci**, EUA, 106, 4961–4962. 2009.
- PANDA, S. K.; COLONNA, M. Innate lymphoid cells in mucosal immunity. **Front Immunol**, 10:861. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.00861>. Acesso em: 09/09/2021.
- PARK, A.; IWASAKI, A. Type I and Type III Interferons - Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. **Cell Host Microbe**, 27(6):870-878. 2020. DOI 10.1016/j.chom.2020.05.008.
- PONS, S.; FODIL, S.; AZOULAY, E.; ZAFRANI, L. The vascular endothelium: The cornerstone of organ dysfunction in severe SARS-CoV-2 infection. **Critical Care**, 24, 116 (353). 2020.
- PONTI, G.; MACCAFERRI, M.; RUINI, C.; TOMASI, A.; OZBEN, T. Biomarkers associated with COVID-19 disease progression. **Crit Rev Clin Lab Sci**, 57: 389-399. 2020.
- QU, R.; LING, Y.; ZHANG, Y. Z.; *et al.* Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19. **J Med Virol**, 92:1533–41. 2020.
- REZAIE, R.; MCGAHAN, A. M.; FREW, S. E.; DAAR, A. S.; SINGER, P. A. Emergence of biopharmaceutical innovators in China, India, Brazil, and South Africa as global competitors and collaborators. **Health Res Policy Syst**, 10:18. 2012.
- RICHMAN, D. D.; WHITLEY, R. J.; HAYDEN, F. G. Clinical Virology, 4th ed. Washington: **ASM Press**. 2016.
- ROBERTS, A. W. G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! **Growth Factors**, 23(1):33-41. 2005. DOI 10.1080/08977190500055836.
- ROCHA, A. S.; PINHEIRO, J. R.; NAKAMURA, T. C.; *et al.* Fomites and the environment did not have an important role in COVID-19 transmission in a Brazilian mid-sized city. **Sci Rep**, 11, 15960. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95479-5>. Acesso em: 22/02/2022.
- ROJAS, J. M.; *et al.* IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. **J Immunol Res**, 6104054. 2017.
- ROLLINS, B. J.; MORRISON, E. D.; STILES, C. D. Cloning and expression of JE, a gene inducible by platelet-derived growth factor and whose product has cytokine-like properties. **Proc Natl Acad Sci**, EUA, 85(11):3738-42. 1988.
- ROTHER, C.; SCHUNK, M.; SOTHMANN, P.; *et al.* Transmission of 2019-nCoV infection from an asymptomatic contact in Germany. **N Engl J Med**. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMc2001468>. Acesso em: 11/04/2022.

ROTHERWELL, N. J. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. **Trends Pharmacol Sci**, 12:430-436. 1991.

RUUSKANEN, O.; LAHTI, E.; JENNINGS, L. C.; MURDOCH, D. R. Viral pneumonia. **Lancet**, 377, 1264–1275. 2011.

SABAKA, P.; KOŠČÁLOVÁ, A.; STRAKA, I.; HODOSY, J.; LIPTÁK, R.; *et al.* Role of interleukin 6 as a predictive factor for a severe course of Covid-19: retrospective data analysis of patients from a long-term care facility during Covid-19 outbreak. **BMC Infect Dis**, 21(1):308. 2021. DOI 10.1186/s12879-021-05945-8.

SAGHAZADEH, A.; REZAEI, N. Immune-epidemiological parameters of the novel coronavirus: a perspective. **Expert Rev Clin Immunol**, 16(5):465-70. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/1744666X.2020.1750954>. Acesso em: 12/12/2021.

SALLUSTO, F.; LENIG, D.; MACKAY, C. R.; LANZAVECCHIA, A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. **J Exp Med**, 187:875–83. 1998.

SATTAR, N.; HO, F. K.; GILL, J. R.; GHOURI, N.; GRAY, S. R.; CELIS-MORALES, C. A.; *et al.* BMI and future risk for COVID-19 infection and death across sex, age and ethnicity: preliminary findings from UK biobank. **Diabetes Metab Syndr**, 14:1149– 51. 2020.

SAUTY, A.; DZIEJMAN, M.; TAHA, R. A.; IAROSSO, A. S.; NEOTE, K.; *et al.* The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells. **J Immunol**, 162:3549–3558. 1999.

SCHANDENE, L.; ALONSO-VEJA, C.; WILLEMS, F.; GERARD, C.; DELVAUX, A.; *et al.* B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. **J Immunol**, 152: 4368-4374. 1994.

SCHEINBERG, M. A. Uma nova interleucina no tratamento das artrites: anti-interleucina-6. **Einstein**, 7(1 Pt 1):108-11. 2009.

SCHIJS, V. & LAVELLE, E. C. Prevention and treatment of COVID-19 disease by controlled modulation of innate immunity. **Eur J Immunol**, 50, 932–938. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/eji.202048693>. Acesso em: 30/03/2022.

SCHNEIDER, A.; KRUGER, C.; STEIGLEDER, T.; *et al.* The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. **The J of Clinical Investigation**, 115(8);2083-98. 2005.

SCHNEIDER, M. The Role of Biomarkers in Hospitalized COVID-19 Patients With Systemic Manifestations. **Biomark Insights**, 17: 11772719221108909. Jun 26, 2022. DOI 10.1177/11772719221108909.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **J of Leukocyte Biology**, 75. 2004.

- SCHUETZ, P.; ALBRICH, W.; MUELLER, B. Procalcitonin for diagnosis of infection and guide to antibiotic decisions: past, present and future. **BMC Med**, 9:107. 2011. DOI 10.1186/1741-7015-9-107 .
- SCHULERT, G. S.; GROM, A. A. Pathogenesis of macrophage activation syndrome and potential for cytokine- directed therapies. **Annu Rev Med**, 66:145–159. 2015.
- SELVA, K. J.; VAN DE SANDT, C. E.; LEMKE, M. M.; LEE, C. Y.; SHOFFNER, S. K.; *et al.* Distinct systems serology features in children, elderly and COVID patients. **MedRxiv**. 2020. DOI 10.1101/2020.05.11.20098459.
- SESA. Secretária Estadual de Saúde do Estado do Ceará. Boletim Influenza 18/12/2017. **SESA**, Ceará. 2017. Disponível em: https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2018/06/boletim_influenza_18_12_2017.pdf. Acesso em: 17/08/2022.
- SEYDOUX, E.; HOMAD, L. J.; MACCAMY, A. J.; PARKS, K. R.; HURLBURT, N. K.; *et al.* Analysis of a SARS-CoV-2 infected individual reveals development of potent neutralizing antibodies to distinct epitopes with limited somatic mutation. **Immunity**, 3(1): 98 – 105. 2020. DOI 10.1016/j.immuni.2020.06.001.
- SHI, Y.; WANG, Y.; SHAO, C.; HUANG, J.; GAN, J.; *et al.* COVID-19 Infection: the Perspectives on Immune Responses. **Cell Death Differ**, 27 (5), 1451–1454. 2020. DOI 10.1038/s41418-020-0530-3.
- SHIRAKI, Y.; ISHIBASHI, Y.; HIRUMA, M.; NISHIKAWA, A.; IKEDA, S. Candida albicans abrogates the expression of interferon-gamma-inducible protein-10 in human keratinocytes. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 54:122–8. 2008.
- SHIRAZI, J.; *et al.* Significant unresolved questions and opportunities for bioengineering in understanding and treating COVID-19 disease progression. **Cell Mol Bioeng**, 13(4):1–26. 2020.
- SIAFAKAS, N.; VERMEIRE, P.; PRIDE, N. A.; PAOLETTI, P.; GIBSON, J.; *et al.* Postma, Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The European Respiratory Society Task Force, **Eur Respir J**, 1398–1420. 1995.
- SINGHAL, T. A review of coronavirus disease-2019 (COVID-19). **Indian J Pediatr**, 87, 4, 281-286. 2020.
- SINHA, P.; MATTHAY, M. A.; CALFEE, C. S. Is a “Cytokine Storm” relevant to COVID-19? **JAMA Intern. Med**. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.3313>. Acesso em: 11/03/2022.
- SOLERTE, S. B.; DI SABATINO, A.; GALLI, M. E.; FIORINA, P. Inibição da dipeptidil peptidase-4 (DPP4) em COVID-19. **Acta diabetologica**, 57, 779-783. 2020.
- SU, C. M.; WANG, L.; YOO, D. Activation of NF-κB and induction of proinflammatory cytokine expressions mediated by ORF7a protein of SARS-CoV-2. **Sci Rep**, 11(1):13464. 2021.

- SUKLAN, J.; CHEAVEAU, J.; HILL, S.; URWIN, S. G.; GREEN, K.; *et al.* Utility of Routine Laboratory Biomarkers to Detect COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Viruses**, 13, 803. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v13050803>. Acesso em: 03/01/2022.
- TABACHNICK, B. G.; FIDELL, L. S. Using multivariate statistics. 6th ed. New York: **Harper and Row**. 2012.
- TAKEYAMA, A.; HASHIMOTO, K.; SATO, M.; SATO, T.; KANNO, S.; *et al.* Rhinovirus load and disease severity in children with lower respiratory tract infections. **J Med Virol**, 84: 1135-1142. 2012.
- TANDAY, S. Resisting the use of antibiotics for viral infections. **Lancet Respir. Med**, 4, 179. 2016.
- TANG, N.; LI, D.; WANG, X.; SUN, Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. **J of Thrombosis and Haemostasis**, 18, 4 (844-847). 2020. DOI <https://doi.org/10.1111/jth.14768>.
- TAY, M. Z.; POH, C. M.; RÉNIA, L.; MACARY, P. A.; NG, L. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nat Rev Immunol**, 20(6):363-74. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>. Acesso em: 24/03/2022.
- TEIJARO, J. R.; WALSH, K. B.; CAHALAN, S.; FREMGEN, D. M.; ROBERTS, E.; *et al.* Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. **Cell**, 146, 980–991. 2011.
- THAKUR, B.; DUBEY, P.; BENITEZ, J.; *et al.* A systematic review and meta-analysis of geographic differences in comorbidities and associated severity and mortality among individuals with COVID-19. **Sci Rep**, 11:8562-8562. 2021.
- THEOFILOPOULOS, A. N.; BACCALA, R.; BEUTLER, B.; KONO, D. H. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. **Annu Rev Immunol**, 23: 307–336. 2005. DOI 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115843.
- THEOHARIDES, T. C.; TSILIONI, I.; CONTI, P. Mast Cells May Regulate The Anti-Inflammatory Activity of IL-37. **Int J Mol Sci**, 20(15). 2019.
- TORRES, J. P.; GOMEZ, A. M.; KHOKHAR, S.; BHOJ, V. G.; TAGLIABUE, C.; *et al.* Respiratory syncytial virus (RSV) RNA loads in peripheral blood correlates with disease severity in mice. **Respir Res**, 11: 125. 2010.
- TRIPATHY, A. S.; VISHWAKARMA, S.; TRIMBAKE, D.; *et al.* Pro-inflammatory CXCL-10, TNF- α , IL-1 β , and IL-6: biomarkers of SARS-CoV-2 infection. **Archives of Virology**. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05247-z>. 2021. Acesso em: 23/06/2022.
- TRIPP, R. A.; JONES, L.; ANDERSON, L. J. Respiratory syncytial virus G and/or SH glycoproteins modify CC and CXC chemokine mRNA expression in the BALB/c mouse. **J Virol**, 74:6227–9. 2000.

- TUFAN, A.; AVANOĞLU GÜLER, A.; MATUCCI-CERINIC, M. COVID-19, immune system response, hyperinflammation and repurposing antirheumatic drugs. **TURKISH J Med Sci**, 50(SI-1):620-32. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3906/sag-2004-168>. Acesso em: 28/06/2022.
- VAN DEN BORNE, P.; QUAX, P. H.; HOEFER, I. E.; PASTERKAMP, G. The multifaceted functions of CXCL10 in cardiovascular disease. **Biomed Res Int**, 893106. 2014.
- VARATHARAJ, A.; *et al.* CoroNerve Study Group, Neurological and neuropsychiatric complications of COVID-19 in 153 patients: A UK-wide surveillance study. **Lancet Psychiatry**, 7, 875–882. 2020.
- VITALE, R. F.; RIBEIRO, F. R. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Rev Bras Otorrinolaringol**, 73(1):123-7. 2007.
- WANG, C.; XIE, J.; ZHAO, L.; *et al.* Alveolar macrophage dysfunction and cytokine storm in the pathogenesis of two severe COVID-19 patients. **EBioMedicine**, 57:102833. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102833>. Acesso em: 15/02/2022.
- WANG, D.; HU, B.; HU, C.; ZHU, F.; LIU, X.; *et al.* Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, 323(11):1061-1069. 2020. DOI 10.1001/jama. 2020.1585.
- WANG, H.; FITZPATRICK, M.; WILSON, N. J.; ANTHONY, D.; READING, P. C.; *et al.* CSF3R/CD114 mediates infection-dependent transition to severe asthma. **J Allergy Clin Immunol**, 143(2):785–788 e6. 2019.1.
- WANG, H.; ALOE, C.; WILSON, N.; BOZINOVSKI, S. G-CSFR antagonism reduces neutrophilic inflammation during pneumococcal and influenza respiratory infections without compromising clearance. **Sci Rep**, 9(1):17732. 2019.
- WANG, X.; LI, Y.; O'BRIEN, K. L.; MADHI, S. A.; WIDDOWSON, M. A.; BYASS, P.; *et al.* Respiratory Virus Global EpidemiologyNetwork. Global burden of respiratory infections associated with seasonal influenza in children under 5 years in 2018: a systematic review and modelling study. **Lancet Glob Health**, 8:e497–510. 2020. Disponível: [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30545-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30545-5). Acesso em: 28/03/2022.
- WARD, C. L.; DEMPSEY, M. H.; RING, C. J.; KEMPSON, R. E.; ZHANG, L.; *et al.* Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. **J Clin Virol**, 29:179–188. 2004.
- WEIGL, J. A.; PUPPE, W.; BELKE, O.; NEUSUSS, J.; BAGCI, F.; SCHMITT, H. J. The descriptive epidemiology of severe lower respiratory tract infections in children in Kiel, Germany. **Klin PEDIATR**, 217: 259-267. 2005.
- WELTE, K.; PLATZER, E.; LU, L.; GABRILOVE, J. L.; LEVI, E.; MERTELSMANN, R.; *et al.* Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. **Proc Nat Acad Sci**, EUA, 82:1526-30. 1985.

WILLIAMS, P.; *et al.* The dynamics of procalcitonin in COVID-19 patients admitted to intensive care unit – a multi-centre cohort study in the South West of England, UK. **Journal of Infection**. 2021. Disponível: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.03.011>. Acesso em: 04/03/2022.

WILLIAMS, E. J.; MAIR, L.; DE SILVA, T. I.; GREEN, D. J.; HOUSE, P.; *et al.* Evaluation of procalcitonin as a contribution to antimicrobial stewardship in SARS-CoV-2 infection: a retrospective cohort study. **J Hosp Infect**, 110:103-107. Apr, 2021. DOI 10.1016/j.jhin.2021.01.006.

WONG, C. K.; LAM, C. W.; WU, A. K.; IP, W. K.; LEE, N. L.; CHAN, I. H.; *et al.* Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. **Clin Exp Immunol**, 136:95–103. 2004.

WU, C.; CHEN, X.; CAI, Y.; *et al.* Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. **JAMA Intern Med**, 180(7): 934-43. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.0994>. Acesso em:23/06/2022.

WU, D.; YANG, X. O. TH17 responses in cytokine storm of COVID-19: an emerging target of JAK2 inhibitor fedratinib. **J Microbiol Immunol Infect**, 53(3):368–370. 2020.

WU, Z.; MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and important lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. **JAMA**, 323:1239-1242. 2020.

XIONG, X.; *et al.* Haematological and immunological data of Chinese children infected with coronavirus disease 2019. **Data Brief**, 31:105953. 2020.

XIONG, Y.; LIU, Y.; CAO, L.; *et al.* Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. **Emerg Microbes Infect**, 9(1):761–70. 2020.

XU, Z.; SHU, T.; KANG, L.; *et al.* Temporal profiling of plasma cytokines, chemokines and growth factors from mild, severe and fatal COVID-19 patients. **Signal Transduct Target Therapy**, 5:100. 2020.

XU, Z.; SHI, L.; WANG, Y.; *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **Lancet Respir Med**, 8:420–422. 2020.1.

YANG, J.; *et al.* Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. **Int J Infect Dis**, 94:91-95. 2020.

YANG, Y.; SHEN, C.; LI, J.; *et al.* Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. **J Allergy Clin Immunol**, 146(1):119-127.e4. 2020. DOI 10.1016/j.jaci.2020.04.027.

YOSHIMOTO, T.; TAKEDA, K.; TANAKA, T.; OHKUSU, K.; KASHIWAMURA, S.; *et al.* IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. **J Immunol**, 161, 3400– 3407. 1998.

YOUNG, H. A. Regulation of interferon-gamma gene expression. **J Interferon Cytokine Res**, 16, 563– 568. 1996.

ZHANG, C.; *et al.* Cytokine release syndrome in severe COVID19: interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality. **Int J Antimicrob Agents**, 55(5):105954. 2020.

ZHANG, H.; *et al.* Specific ACE2 expression in small intestinal enterocytes may cause gastrointestinal symptoms and injury after 2019-nCoV infection. International journal of infectious diseases: **IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases**, 96 (19–24). 2020.

ZHANG, J.; HAO, Y.; OU, W.; MING, F.; LIANG, G.; *et al.* Serum interleukin-6 is an indicator for severity in 901 patients with SARS-CoV-2 infection: a cohort study. **J Transl Med**, 18(1):406. 2020. DOI 10.1186/s12967-020-02571-x.

ZHAO, Y.; *et al.* Longitudinal COVID-19 profiling associates IL-1RA and IL-10 with disease severity and RANTES with mild disease. **JCI Insight**, 5(13). 2020.

ZHOU, F.; YU, T.; DU, R.; FAN, G.; LIU, Y.; *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A retrospective cohort study. **Lancet** 2020; 395(10229):1038. Erratum in: **Lancet**, 395(10229):1038. 2020.

ZOU, L.; RUAN, F.; HUANG, M.; *et al.* SARS-CoV-2 viral load in Upper respiratory specimens of infected patients. **N Engl J Med**. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMc2001737>. Acesso em: 12/12/20212.

ZUO, Y.; YALAVARTHI, S.; SHI, H.; *et al.* Neutrophil extracellular traps in COVID-19. **JCI Insight**, 5: e138999. 2020.

ANEXOS

ANEXO A - CURVAS PADRÕES DOS BIOMARCADORES ANALISADOS.

1. G-CSF

1.1 Grupo Controle:

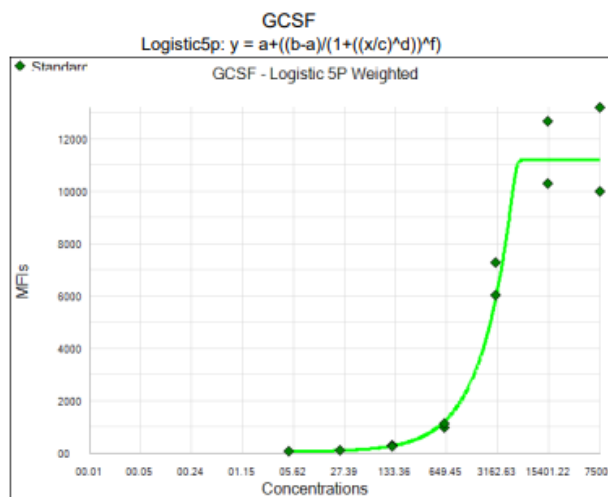
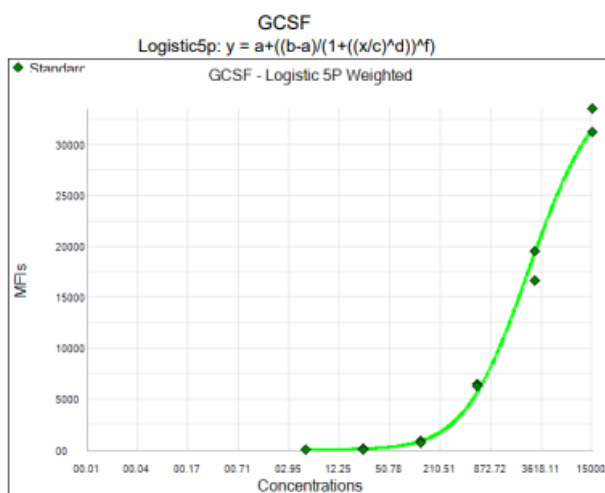


Fig. Curva padrão do grupo controle (assintomáticos) para cálculo da medida de absorvância das amostras. $R^2 = 0,98$. Limite de quantificação = 4,8 pG/uL.

1.2. Participantes Sintomáticos COVID-19 positivos e negativos:

A



B

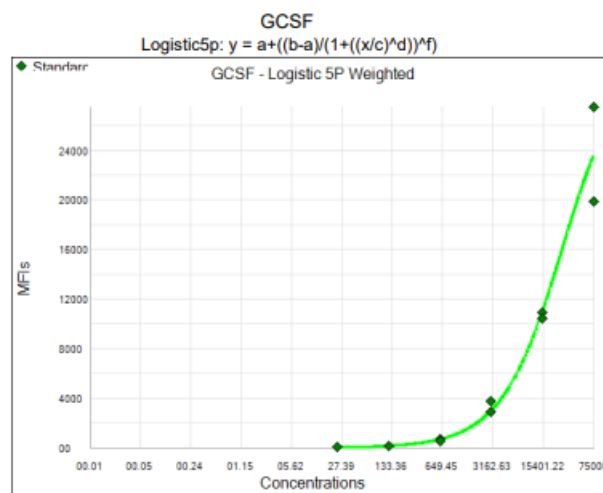


Fig. Curva padrão dos indivíduos sintomáticos do estudo para cálculo da medida de absorvância das amostras. $R^2 = 0,99$ de A e B. Limite de quantificação = 4,8 pG/uL.

2. IL-1 β

2.1. Grupo Controle:

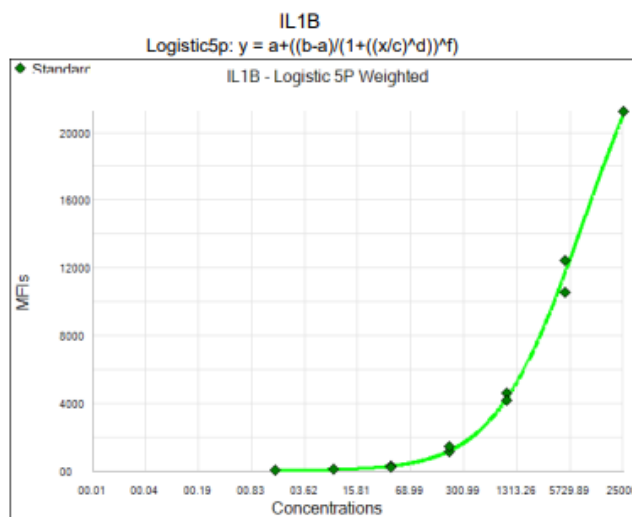
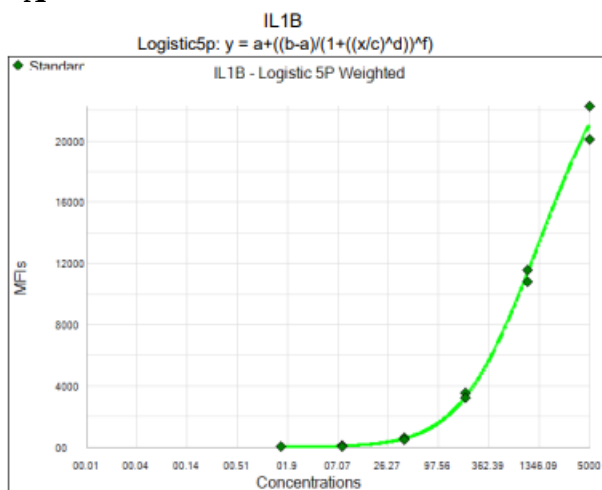


Fig. Curva padrão do grupo controle (assintomáticos) para cálculo da medida de absorvância das amostras. $R^2 = 0,98$. Limite de quantificação = 1,6 pG/uL.

2.2. Participantes Sintomáticos COVID-19 positivos e negativos:

A



B

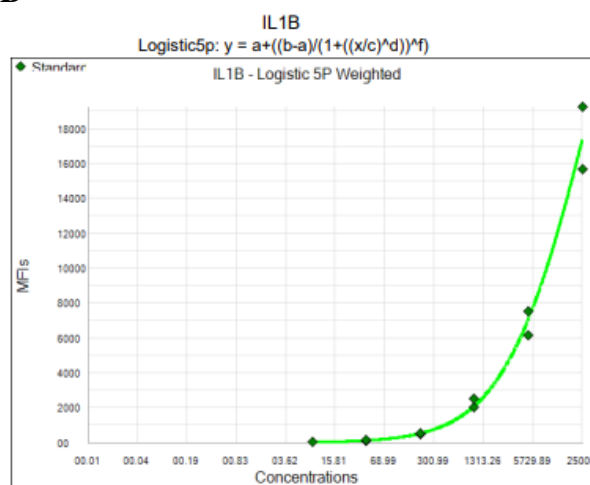


Fig. Curva padrão dos participantes sintomáticos do estudo para cálculo da medida de absorvância das amostras. $R^2 = 0,99$ de A e B. Limite de quantificação = 1,6 pG/uL.

3. IL-6

3.1. Grupo Controle:

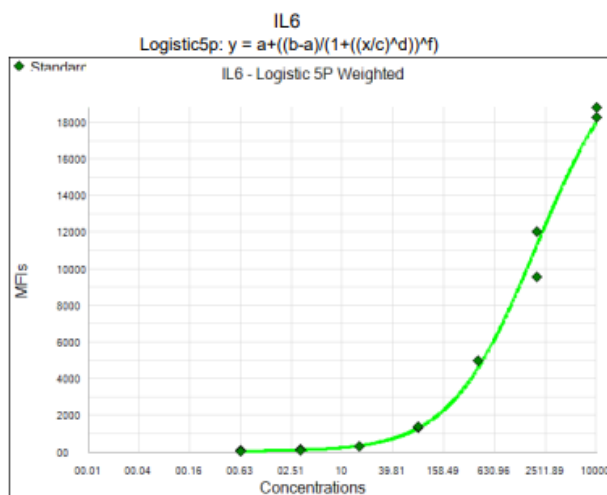
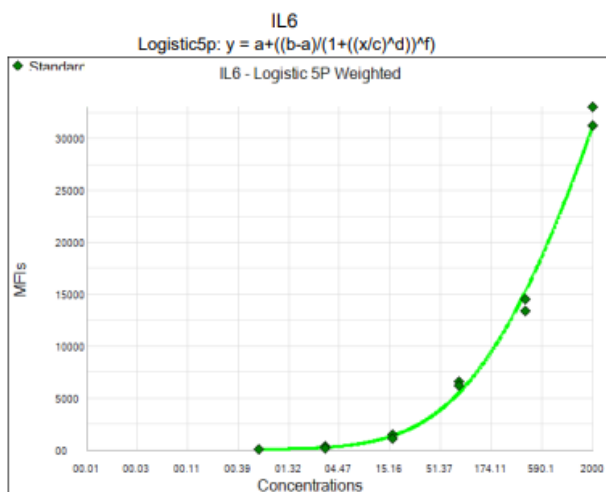


Fig. Curva padrão do grupo controle (assintomáticos) para cálculo da medida de absorvância das amostras. $R^2 = 0,97$. Limite de quantificação = 0,64 pG/uL.

3.2. Participantes Sintomáticos COVID-19 positivos e negativos:

A



B

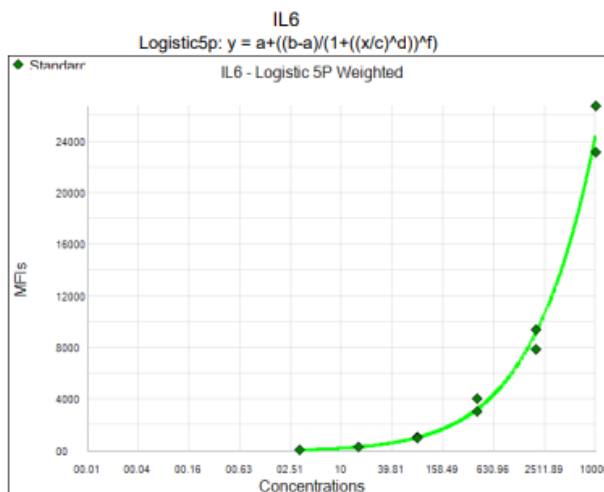


Fig. Curva padrão dos participantes sintomáticos do estudo para cálculo da medida de absorvância das amostras. $R^2 = 0,99$ de A e B. Limite de quantificação = 0,64 pG/uL.

4. IL-10

4.1. Grupo Controle:

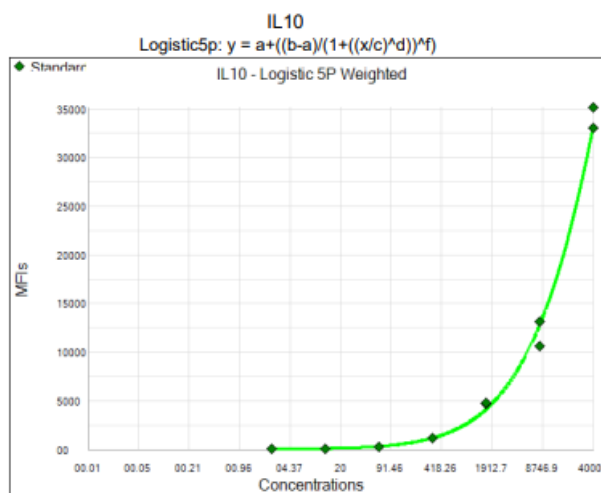
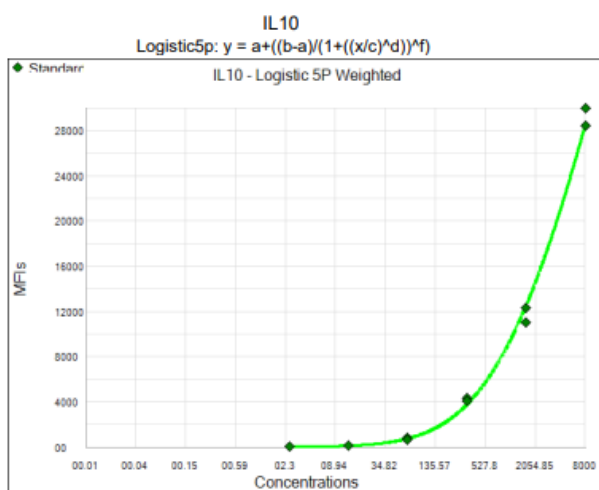


Fig. Curva padrão do grupo controle (assintomáticos) para cálculo da medida de absorvância das amostras. $R^2 = 0,98$. Limite de quantificação = 2,56 pG/uL.

4.2. Participantes Sintomáticos COVID-19 positivos e negativos:

A



B

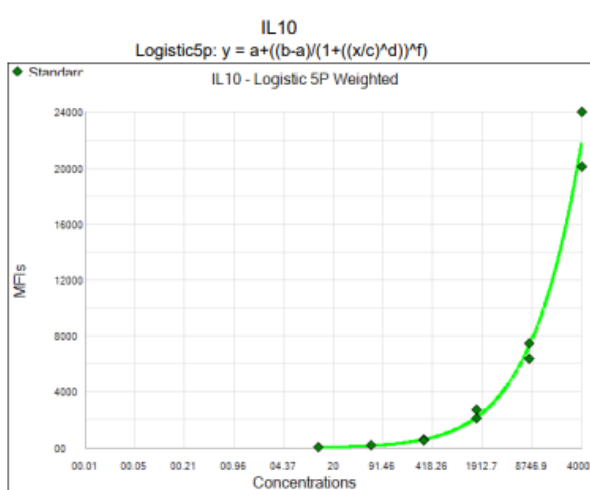


Fig. Curva padrão dos participantes sintomáticos do estudo para cálculo da medida de absorvância das amostras. $R^2 = 0,99$ de A e B. Limite de quantificação = 2,56 pG/uL.

5. MCP-3

5.1 Grupo Controle

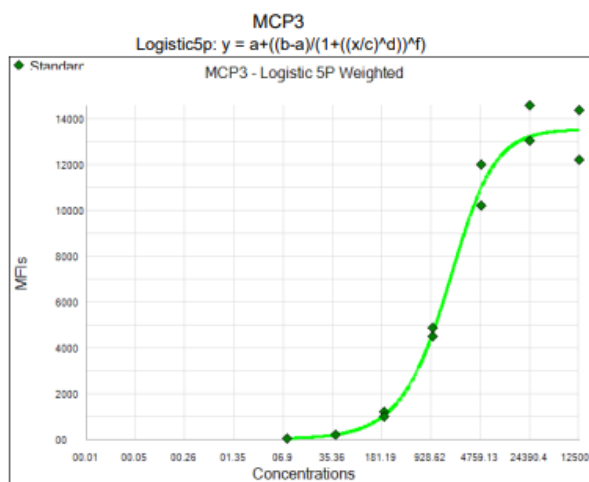
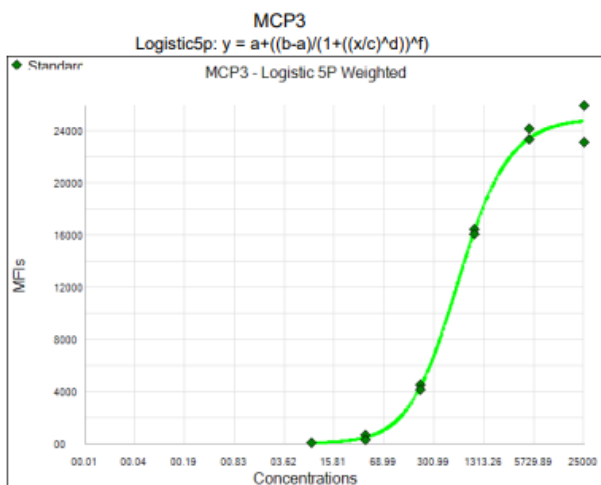


Fig. Curva padrão do grupo controle (assintomáticos) para cálculo da medida de absorvância das amostras. $R^2 = 0,99$. Limite de quantificação = 8 pG/uL.

5.2. Participantes Sintomáticos COVID-19 positivos e negativos:

A



B

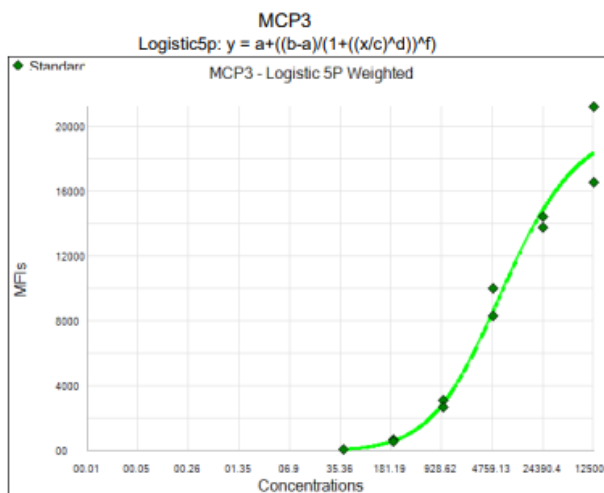


Fig. Curva padrão dos participantes sintomáticos do estudo para cálculo da medida de absorvância das amostras. $R^2 = 0,99$ de A e B. Limite de quantificação = 8 pG/uL.

6. TNF- α

6.1. Grupo Controles

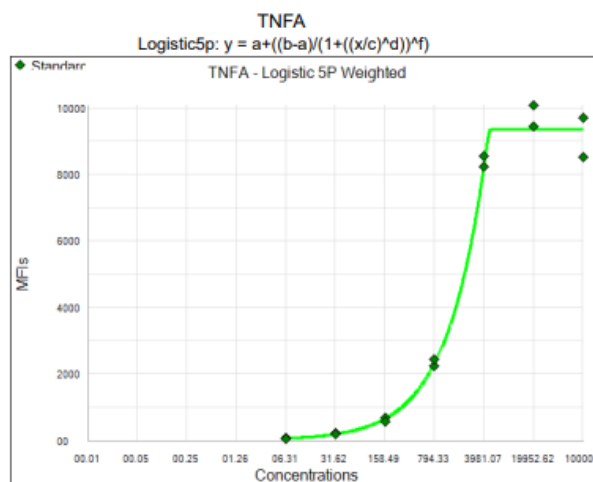
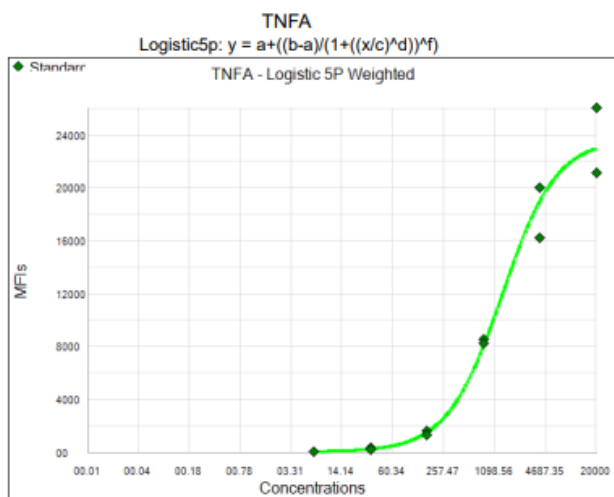


Fig. Curva padrão do grupo controle (assintomáticos) para cálculo da medida de absorvância das amostras. $R^2=0,99$. Limite de quantificação = 6,4 pG/uL.

6.2. Participantes Sintomáticos COVID-19 positivos e negativos:

A



B

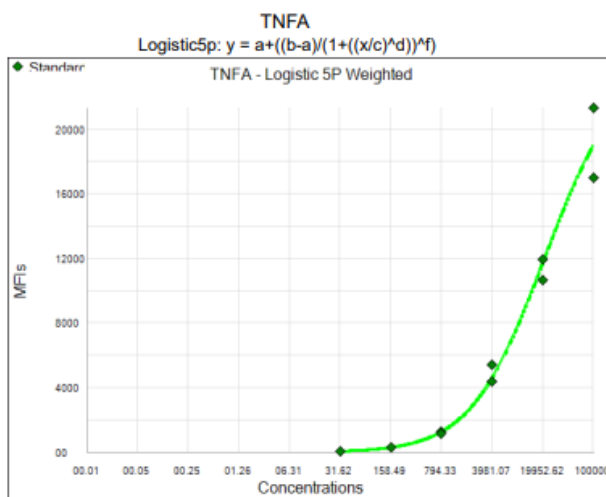
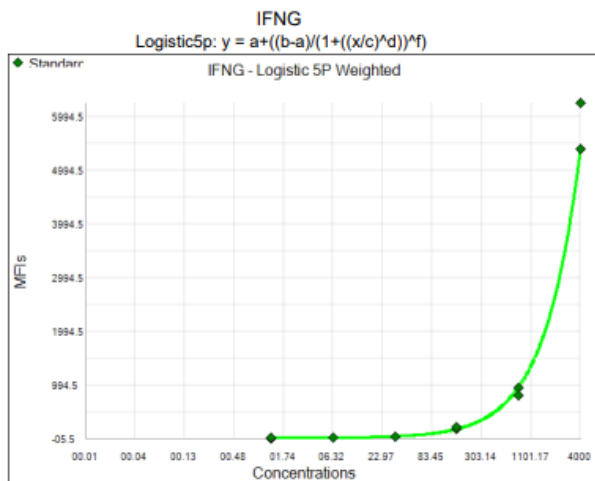


Fig. Curva padrão dos participantes sintomáticos do estudo para cálculo da medida de absorvância das amostras. $R^2=0,99$ de A e B. Limite de quantificação = 6,4 pG/uL.

7. IFN- γ

7.1. Participantes Sintomáticos COVID-19 positivos e negativos:

A



B

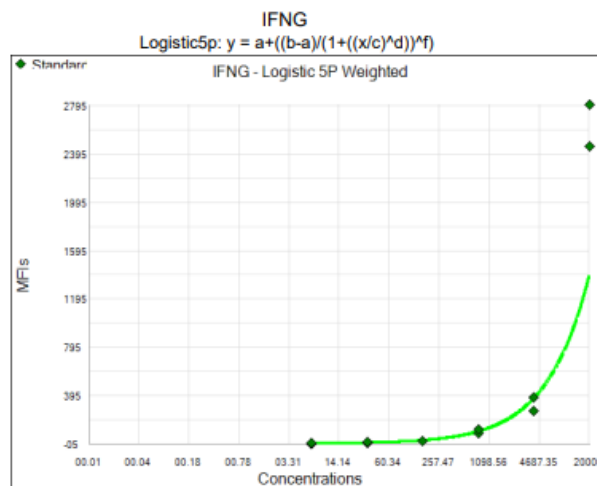
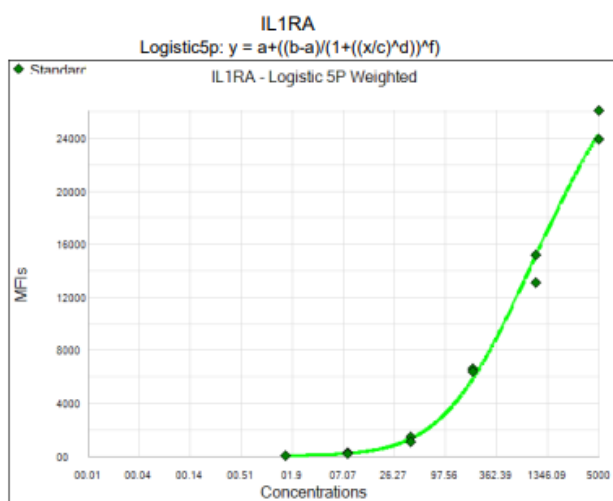


Fig. Curva padrão dos participantes sintomáticos do estudo para cálculo da medida de absorvância das amostras. (A) $R^2= 0,99$ e (B) $R^2= 0,92$. Limite de quantificação = 1,28 pG/uL. IFN- γ não foi avaliado no grupo controle (assintomático).

8. IL-1RA

8.1. Participantes Sintomáticos COVID-19 positivos e negativos:

A



B

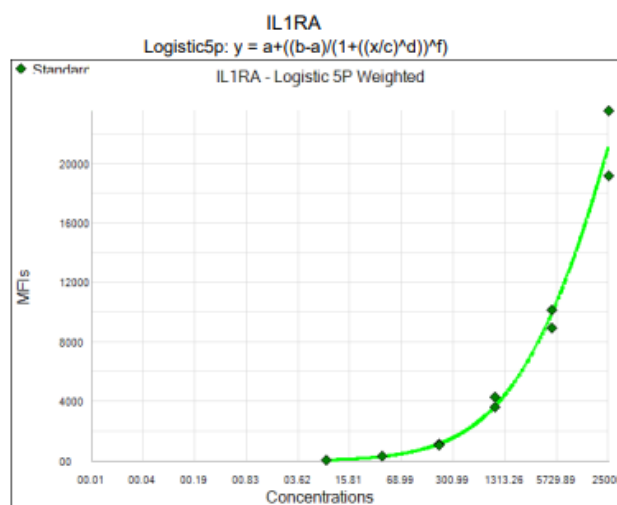
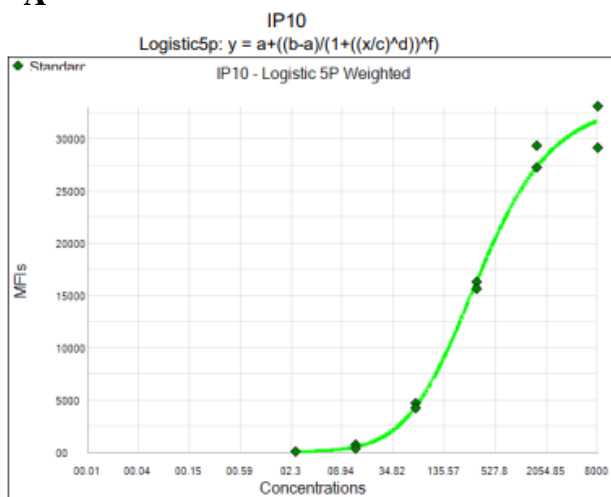


Fig. Curva padrão dos participantes sintomáticos do estudo para cálculo da medida de absorvância das amostras. $R^2= 0,99$ de A e B. Limite de quantificação = 1,6 pG/uL. IL-1RA não foi avaliado no grupo controle (assintomático).

9. IP-10

9.1. Participantes Sintomáticos COVID-19 positivos e negativos:

A



B

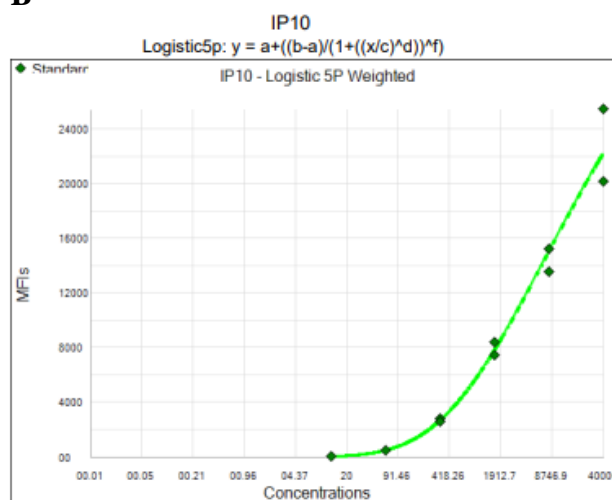
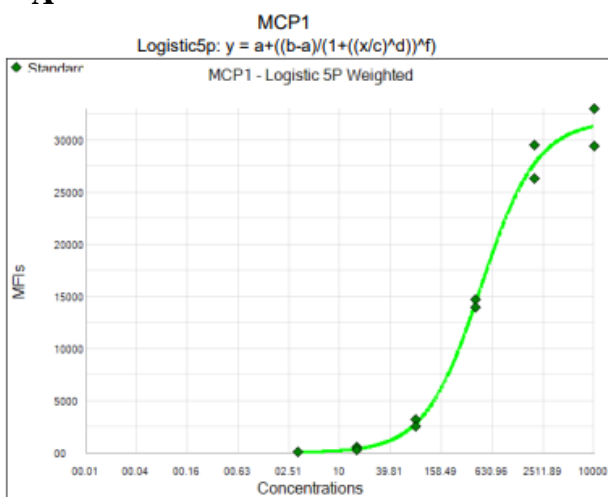


Fig. Curva padrão dos participantes sintomáticos do estudo para cálculo da medida de absorvância das amostras. $R^2 = 0,99$ de A e B. Limite de quantificação = 2,56 pG/uL. IP-10 não foi avaliado no grupo controle (assintomático).

10. MCP-1

10.1. Participantes Sintomáticos COVID-19 positivos e negativos:

A



B

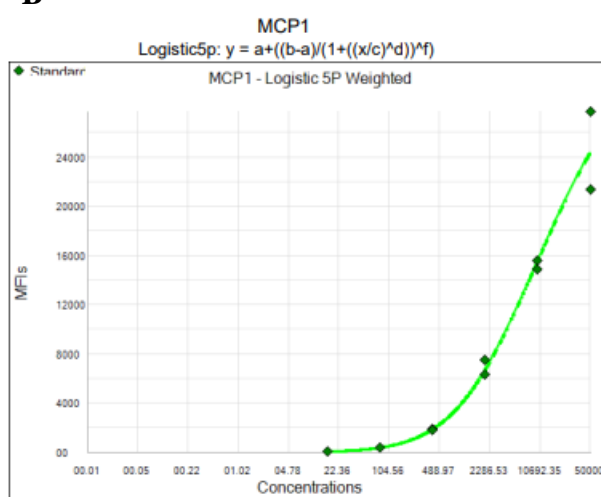
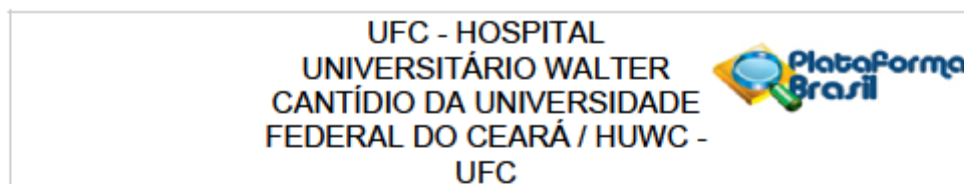


Fig. Curva padrão dos participantes sintomáticos do estudo para cálculo da medida de absorvância das amostras. $R^2 = 0,99$ de A e B. MCP-1 não foi avaliado no grupo controle (assintomático).

ANEXO B – Lista de Publicações nos últimos 5 anos.

1. CLEMENTINO M, CAVALCANTE KF, GONDIM RNDG, ARRUDA E, LIMA AÂM, HAVT A, et al. Detection of SARS-CoV-2 in different human biofluids using the loop-mediated isothermal amplification assay: A prospective diagnostic study in Fortaleza, Brazil. **J Med Virol**. 2022 Sep;94(9):4170-4180. doi: 10.1002/jmv.27842. Epub 2022 May 20. PMID: 35535440.
2. ARRUDA EAG, PIRES-NETO RJ, MEDEIROS MS, GONDIM RNDG, LIMA AAML et al Clinical, Pathobiology, Efficacy, and Toxicity of Tenofovir Disoproxil Fumarate and Emtricitabine for Mild to Moderate SARS-CoV-2 Infections. **Eur J of Resp Med** 2021; 3(3): 238 - 248. doi:10.31488/EJRM.122.
3. PANKOV RC, GONDIM RNDG, PRATA MMG, MEDEIROS PHQS, et al. Rotavirus A Infections in Community Childhood Diarrhea in the Brazilian Semiarid Region During Postvaccination Era. **J Pediatr Gastroenterol Nutr** 2019 Oct;69(4):e91-e98. doi: 10.1097/MPG.0000000000002416. PMID: 31568040.
4. LIMA AAM, OLIVEIRA DB, QUETZ JS, GONDIM RNDG, HAVT A, et al. Etiology and severity of diarrheal diseases in infants at the semiarid region of Brazil: A case-control study. **PLoS Negl Trop Dis** 2019 Feb 8;13(2):e0007154. doi: 10.1371/journal.pntd.0007154. PMID: 30735493; PMCID: PMC6383952.
5. SANTOS AKS, DE MEDEIROS PHQS, BONA MD, PRATA MMG, GONDIM RNDG, et al. Virulence-Related Genes and Coenteropathogens Associated with Clinical Outcomes of Enteropathogenic *Escherichia coli* Infections in Children from the Brazilian Semiarid Region: a Case-Control Study of Diarrhea. **J Clin Microbiol** 2019 Mar 28;57(4):e01777-18. doi: 10.1128/JCM.01777-18. PMID: 30728193; PMCID: PMC6440785.
6. GONDIM RDG, PANKOV RC, PRATA MMG, MEDEIROS PHQS, VERAS HN, SANTOS AKS, MAGALHÃES LMC, et al. Genetic Diversity of Norovirus Infections, Coinfections, and Undernutrition in Children From Brazilian Semiarid Region. **J Pediatr Gastroenterol Nutr** 2018 Dec;67(6):e117-e122. doi: 10.1097/MPG.0000000000002085. PMID: 29985875.

ANEXO C - Parecer consubstanciado de aprovação do CEP projeto ARTAN-C19

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Experimentação clínica, controle, duplo-cego, aleatório com fumarato de tenofovir disoproxila e emtricitabina para Covid-19.

Pesquisador: Aldo Ângelo Moreira Lima

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 5

CAAE: 34182620.0.0000.5045

Instituição Proponente: Universidade Federal do Ceará/HOSPITAL UNIVERSITARIO WALTER

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA, INOVACOES E COMUNICACOES

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.281.908

Apresentação do Projeto:

O presente estudo foi apreciado pela CONEP através do parecer 34182620.0.0000.5045.

Trata-se de um estudo sob financiamento do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Sobcoordenação do prof Aldo Moreira. Orçamento: R\$ 997.158,50; Cronograma: 01/07/2020 a abril/2021. Inclusão de 219 pacientes. Instituições participantes: Instituto de Biomedicina-Núcleo de Biomedicina da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (IBIMED-NUBIMED/UFC), Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, São Paulo; Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) e Laboratórios Central de Saúde Pública (LACENS); Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ), Secretaria de Saúde do Ceará (SESA); e RedeVírus, Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), Brasília, DF. RESUMO: Vários agentes terapêuticos têm sido avaliados para o tratamento da Covid-19, e somente um utilizando um fármaco antiviral denominado remdesivir administrado por via endovenosa tem mostrado eficácia no tempo de duração da doença em 26,7% nos pacientes gravemente enfermos. O remdesivir foi superior ao placebo na redução do tempo de recuperação em adultos hospitalizado com Covid-19 e evidência de infecção do trato respiratório inferior. Os estudos com pacientes infectados com a Covid-19 foram realizados em doentes mais graves e hospitalizado que na pandemia chamam maior atenção por superlotarem o sistema de saúde causando enormes transtornos sociais e econômicos. No

Endereço: Rua Coronel Nunes de Melo, 1142		CEP: 60.430-270
Bairro: Rodolfo Teófilo		
UF: CE	Município: FORTALEZA	
Telefone: (85)3366-8589	Fax: (85)99267-4630	E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

ANEXO D - Parecer consubstanciado de aprovação do CEP da tese

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DOS BIOMARCADORES ASSOCIADOS À PATOBIOLOGIA DO COVID-19
COMPARADO A OUTRAS DOENÇAS RESPIRATÓRIAS E PACIENTES SAUDÁVEIS

Pesquisador: Aldo Ângelo Moreira Lima

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 55952822.1.0000.5054

Instituição Proponente: Universidade Federal do Ceará/ PROPESQ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.462.564

Apresentação do Projeto:

Projeto visa a determinação de padrões de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento em diferentes populações; a saber, pacientes hígidos, com COVID-19 positivo e com síndrome respiratória sem envolvimento com COVID-19, com o intuito de determinar padrões preditivos da gravidade pela COVID-19 ou para direcionar o tratamento para os pacientes acometidos pela COVID-19.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Determinar qual o papel dos biomarcadores de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento celular na infecção por SARS-COV-2, através de uma análise comparativa entre pacientes: (1) com diagnóstico positivo para COVID-19, (2) com sintomas respiratórios causados por outros agentes não-COVID e (3) saudáveis sem sintomas respiratórios.

Objetivos Específicos

- a) Fornecer dados que auxiliem o desenvolvimento de algoritmos de pontuação clínica, importantes para uso em ambientes clínicos que não tenham acesso imediato ao teste laboratorial para COVID-19.
- b) Determinar quais os outros agentes infecciosos estão envolvidos com a sintomatologia de

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br