

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

ISABELA VALIM SARMENTO

**ANÁLISE DO PERFIL DE IMUNOSSENESCÊNCIA EM CÉLULAS T DE
PACIENTES EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA INFECÇÃO POR SARS-COV-2**

VITÓRIA, ES
2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

ISABELA VALIM SARMENTO

**ANÁLISE DO PERFIL DE IMUNOSSENESCÊNCIA EM CÉLULAS T DE
PACIENTES EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA INFECÇÃO POR SARS-COV-2**

Projeto de pesquisa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo como parte do requisito parcial para conclusão do Mestrado em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Daniel C. O. Gomes

VITÓRIA, ES
2022

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia da Universidade Federal do Espírito Santo.

AGRADECIMENTOS

Vamos lá, são tantos agradecimentos que não cabe no papel!

Agradeço a Deus por tudo.

Sou inteiramente grata pela vida, saúde e por conseguir chegar até aqui. Foram anos muito difíceis e dedico essa dissertação a todos aqueles que passaram por essa pandemia da COVID-19.

Agradeço a minha família, aos meus pais que me apoiam em todos os momentos, aos meus irmãos Igor e Camila que sempre estão lá quando preciso.

Agradeço imensamente aos familiares e as pessoas que aceitaram participar da pesquisa e que Deus continue dando forças e confortando a vida de cada um de vocês.

Agradeço aos professores que acreditaram em mim e me concederam a oportunidade de realizar o mestrado. Em especial ao meu orientador professor Daniel, desde o processo seletivo até essa defesa, todos os dias nesses últimos dois anos, sempre orientando de forma sábia, dando conselhos que levarei para vida e sempre alegrando as sextas de happy hour no laboratório. Não tenho espaço para agradecer o quanto sou grata.

Agradeço aos meus amigos de laboratório: Luciana, Renan, Carlos, Pedro, Paola e Thalya. Aí vai desde conselhos, experimentos, conversas etc., minha segunda família que compartilhei muitos momentos.

Carol, amiga, agradeço demais por você existir e fazer parte da minha vida, amo você. Tiago, agradeço por você acreditar e me apoiar mesmo eu achando que tudo vai dar errado.

Agradeço a minha psicóloga Carol por tudo, você também que me acompanhou desde antes desse processo, agora e vai continuar cuidando de mim e da minha saúde mental, sou extremamente grata.

À UFES pelo ensino e pesquisa. Ao PPGDI e ao NDI pela pesquisa, ensino e ciência em que esse trabalho foi desenvolvido, aos hospitais HUCAM, Dório Silva e Jayme em que me deram toda assistência e suporte a pesquisa. Aqui cabe também a Beckman e a Raquel pelo suporte a assistência científica. Agradeço as agências de fomento à pesquisa Capes e FAPES por todo apoio financeiro.

“[...] E eu vou mandar umas flores só pra te dizer
Que a vida tem espinhos, pode machucar
Mas lembre dessas flores sempre que doer
Pra saber que, em meio às dores, vale a pena amar [...]”

Cesar MC - Poesia Acústica #9: Melhor Forma

RESUMO

A COVID-19 é uma doença provocada pelo SARS-CoV-2 que atinge o sistema respiratório, causando danos pulmonares que podem evoluir para um quadro de síndrome respiratória aguda grave (ARDS), aumento agudo de citocinas inflamatórias (*cytokine storm*), danos hepáticos, cardiovasculares e renais. Um ambiente inflamatório exacerbado, como verificado na COVID-19, pode levar a alterações no perfil de diferenciação e funcionalidade das células T. Esses fatores promovem a expansão de células T senescentes, definidas pela perda progressiva de receptores co-estimuladores (CD27 e CD28), danos no DNA, ativação da p38 MAPK e perda da capacidade proliferativa. O acúmulo de células T senescentes tem sido associado a imunopatogênese de muitas doenças, porém, ainda pouco conhecida no contexto da COVID-19. Neste trabalho avaliamos o perfil clínico/laboratorial de pacientes com COVID-19 classificados clinicamente entre oligossintomáticos, moderados e graves. Além disso, avaliamos características de fenótipo senescente nos compartimentos de células T. Nossos resultados demonstraram alterações de diversos parâmetros laboratoriais como leucocitose, neutrofilia, eosinopenia, monocitose, linfopenia, aumentos de DHL, bilirrubina direta, triglicerídeos, proteína C reativa, ureia e creatinina. Além disso, pacientes com COVID-19, em especial os grupos grave e moderado, apresentaram alterações na gasometria com distúrbios no pH e PCO₂ arterial. Nossas análises fenotípicas demonstraram uma diminuição da viabilidade celular nos grupos mais acometidos pela doença (moderado e grave), com alterações das frequências de células T CD4⁺ e T CD8⁺, aumento de danos no DNA identificado pela fosforilação de γ H2Ax, bem como maior expressão da MAPK p38, ligada a senescência. Além disso, comparativamente ao grupo oligossintomático, pacientes graves apresentaram um acúmulo de populações altamente diferenciadas, identificadas pelos subgrupos CD28-CD27⁻ e células de memória terminais (T EMRA). Desse modo pacientes com a forma mais grave da COVID-19 exibem um fenótipo senescente de células T podendo ser um dos agravantes para essa doença.

Palavras-chave: COVID-19; linfócitos T; senescência celular; imunossenescência; SARS-CoV-2.

ABSTRACT

COVID-19 is a disease caused by SARS-CoV-2 that affects the respiratory system, causing lung damage that can progress to severe acute respiratory syndrome (ARDS), acute increase in inflammatory cytokines (cytokine storm), liver damage, and cardiovascular and renal. An exacerbated inflammatory environment, as seen in COVID-19, can lead to changes in T cells' differentiation profile and functionality. These factors promote the expansion of senescent T cells, which is defined by the progressive loss of costimulatory receptors (CD27 and CD28), DNA damage, p38 MAPK activation, and loss of proliferative capacity. The accumulation of senescent T cells has been associated with the immunopathogenesis of many diseases. However, it is still poorly understood in the context of COVID-19. This work evaluated the clinical/laboratory profile of patients with COVID-19, clinically classified between oligosymptomatic, moderate, and severe. In addition, we evaluated senescent phenotype characteristics in T cell compartments. Our results demonstrate alterations in several laboratory parameters such as leukocytosis, neutrophilia, eosinopenia, monocytosis, lymphopenia, increased LDH, direct bilirubin, triglycerides, C-reactive protein, urea, and creatinine. In addition, patients with COVID-19, especially the severe and moderate groups, showed changes in blood gas with disturbances in arterial pH and PCO₂. Our phenotypic analyzes showed a decrease in cell viability in the groups most affected by the disease (moderate and severe), with changes in the frequencies of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, increased DNA damage identified by γ H2Ax phosphorylation, as well as increased expression of MAPK p38 that is linked to senescence. Furthermore, compared to the oligosymptomatic group, critically ill patients showed an accumulation of highly differentiated populations, identified by the CD28-CD27⁻ and terminal memory cells (T EMRA) subgroups. Thus, patients with the most severe form of COVID-19 exhibit a senescent T-cell phenotype, which may be one of the aggravating factors for this disease.

Key-words: COVID-19; T-lymphocytes; cellular senescence; immunosenescence; SARS-CoV-2.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2 / ECA2 – *angiotensin-converting enzyme 2* / enzima conversora da angiotensina 2

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCs – *professional antigen-presenting cells* / células apresentadoras de antígenos profissionais

ARDS ou SRAG – *acute respiratory distress syndrome* / síndrome respiratória aguda grave

AT (1-7) – Angiotensina (1-7)

AT2 – Angiotensina 2

AXL – *tyrosine-protein kinase receptor* UFO

CDC – Centers for Disease Control and Prevention / Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CM – *central memory* / memória central

CMV – citomegalovírus

CoV – coronavírus

COVID-19 – CoronaVirus Infectious Disease

DAMPs – *damage-associated molecular patterns* / padrões moleculares associados a danos

DMSO – dimetilsulfóxido / sulfóxido de dimetilo

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNA-SCARs – *DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence* / segmentos de DNA com alterações de cromatina reforçados pela senescência

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EM – *effector memory* / memória efetora

ES – Espírito Santo

FiO₂ – fração inspirada de oxigênio

FMO – Fluorescence Minus One

HAM/TSP – *HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis* / paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1

HAVCR1 – Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1
HBV – human hepatitis B virus / vírus da hepatite B
HCM – Hemoglobina Corpuscular Média
HCV – human hepatitis C virus / vírus da hepatite C
HDL – High Density Lipoprotein / lipoproteína de alta densidade
HIV – human immunodeficiency virus / vírus da imunodeficiência humana
HPV – human papilloma virus / papiloma vírus humano
HTLV-1 – *human acute T cell leukaemia virus type 1* / vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1
HUCAM – Hospital Universitário Cassiano Moraes
ID – identificação
IFCC – International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
IFN – interferon
IgG – imunoglobulina G
IgM – imunoglobulina M
IL – interleucina
INR – International Normalized Ratio / Razão Normalizada Internacional
KIM-1 – Kidney Injury Molecule-1
KLRG1 – *co-inhibitory receptor killer-cell lectin like receptor G1*
LDH / DHL – desidrogenase láctica / lactato desidrogenase
LDL – Low Density Lipoprotein / lipoproteína de baixa densidade
MAPK – *mitogen-activated protein kinases* / proteína quinase ativada por mitógeno
MDA5 – *melanoma differentiation-associated protein 5*
MFI – Mean Fluorescence Intensity / intensidade média de fluorescência
MHC – *major histocompatibility complex* / complexo principal de histocompatibilidade
NK – células *natural killer*
NKRs – *NK receptors*
NRP1 – Neuropilin 1
NRP2 – Neuropilin 2
NSPs – *non- structural proteins* / proteínas não estruturais
Oligo – oligossintomático
ORFs – Open-Reading Frames

PAMPs – *pathogen-associated molecular patterns* / padrões moleculares associados a patógenos

PaO₂ – pressão parcial de oxigênio

PBMC – *peripheral blood mononuclear cells* / células mononucleares do sangue periférico

PBS – *phosphate buffered saline* / tampão fosfato-salino

PCO₂ – Pressão Parcial de Gás Carbônico

PCR – reação de cadeia da polimerase

pH – potencial Hidrogeniônico

PO₂ – Pressão Parcial de Oxigênio

PRRs – *pattern-recognition receptors* / receptores de reconhecimento de padrões específicos

PTTK – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

RDW – Red Cell Distribution Width / Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos

RIG-I – *retinoic acid-inducible gene 1*

RM – resident memory / memória residente

RNA – ácido ribonucleico

RPMI – Meio Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR – reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase

SARS-CoV-2 – *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

SASP – *senescence associated secretory phenotype* / fenótipo secretor associado à senescência

SBAC – Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

SFB – Soro Fetal Bovino

SG – síndrome gripal

SMS – *senescence-messaging secretome* / secretoma de mensagens de senescência

T EMRA – *effector memory T cells reexpressing CD45RA*

TAP – tempo de protrombina / tempo de atividade da protrombina

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCR – *T cell receptor* ou receptor de células T
TE – terminal effector / efetora terminal
Tfh – *T follicular helper* / células auxiliares foliculares
Th – *T helpers*
TIM-1 – *T-cell immunoglobulin and mucin domain 1*
TLR – *toll-like receptors* / receptores do tipo Toll
TMPRSS2 – *transmembrane protease serine 2*
TNF – fator de necrose tumoral
UFES – Universidade Federal do Espírito Santo
UTI – Unidade de Terapia Intensiva
VCM – Volume Corpuscular Médio
VEB / EBV – Epstein–Barr *virus*
VLDL – Low Density Lipoprotein / lipoproteínas de muito baixa densidade
WHO / OMS - World Health Organization / Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

- FIGURA 1.** Estratégia de análise para definição das populações de células T.....45
- FIGURA 2. A)** Dados de alta, óbitos e outros dos grupos moderado e grave. **B)** Tempo médio de internação do grupo moderado e grave do Hospital Dr. Jayme dos Santos Neves. Moderado (n = 29) e grave (n = 21). Teste de Mann-Whitney, ****p < 0,0001.48
- FIGURA 3.** Níveis de **A)** IgG e **B)** IgM marca Abbot dos pacientes oligossintomáticos do HUCAM nos tempos D15, D30, D45, D60, D90/D120 e D180. Teste de Friedman, post-hoc de FDR Benjamini e Hochberg. * p < 0,05, ** p < 0,02, **** p < 0,0001.53
- FIGURA 4.** Comparação das frequências de células viáveis entre os grupos oligo, moderado e grave. **A)** Frequência em porcentagem nos três grupos (n = 12, cada). Teste de Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg, * p < 0,05, *** p < 0,0005. **B)** Estratégia de análise de células viáveis dos três grupos.....54
- FIGURA 5. A)** Gráfico das frequências totais das células T CD3+, T CD4+ e T CD8+ dos grupos oligo, moderado e grave (n = 12, cada). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg, * p < 0,05, ** p < 0,0098. Estratégia de análise e comparação das frequências de células **B)** T CD4+ e **C)** T CD8+ nos três grupos. .55
- FIGURA 6. A)** Estratégia de análise de células T CD4+ CD57+. **B)** Gráfico das frequências de células T CD4+ CD57+ nos grupos oligo (n = 12), moderado (n = 11) e grave (n = 12) e **C)** gráfico do MFI das células T CD4+ CD57+ nos grupos oligo (n = 11), moderado (n = 11) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg.56
- FIGURA 7. A)** Estratégia de análise de células T CD4+ KLRG1+. **B)** Gráfico da frequência de células T CD4+ KLRG1+ nos grupos oligo, moderado e grave (n = 12, cada) e **C)** gráfico do MFI das células T CD4+ KLRG1+ nos três grupos (n = 12, cada). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg.....57
- FIGURA 8. A)** Estratégia de análise de células T CD8+ CD57+. **B)** Gráfico da frequência de células T CD8+ CD57+ nos três grupos (n = 12, cada) e **C)** gráfico do MFI das células T CD8+ CD57+ nos grupos oligo (n = 11), moderado (n = 11) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg.58
- FIGURA 9. A)** Estratégia de análise de células T CD8+ KLRG1+. **B)** Gráfico da frequência de células T CD8+ KLRG1+ nos grupos oligo, moderado e grave (n = 12, cada) e **C)** gráfico do MFI das células T CD8+ KLRG1+ nos três grupos (n = 12, cada). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg.....58
- FIGURA 10. A)** Gráfico das frequências de células T CD4+ γ H2Ax+ nos grupos oligo (n = 9), moderado (n = 12) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. * p < 0,05, **** p < 0,0001. **B)** Estratégia de análise para

células T CD4+ γ H2Ax nos três grupos. **C)** Gráfico do MFI de células T CD4+ γ H2Ax+ dos grupos oligo (n = 11), moderado (n = 12) e grave (n = 11). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. ** p = 0,0053 e 0,0062. **D)** Comparação do MFI de células T CD4+ γ H2Ax+ nos três grupos.60

FIGURA 11. A) Gráfico das frequências de células T CD4+ p-p38+ dos grupos oligo (n = 5), moderado (n = 12) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. * p < 0,05. **B)** Gráfico do MFI de células T CD4+ p-p38+ dos grupos oligo (n = 10), moderado (n = 12) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. **C)** Estratégia de análise de células T CD4+ p-p38+ em relação ao FMO de Alexa Fluor 647 (AF647) dos três grupos.61

FIGURA 12. A) Gráfico das frequências de células T CD8+ γ H2Ax+ dos grupos oligo (n = 10), moderado (n = 12) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. *** p = 0,0008, **** p < 0,0001. **B)** Estratégia de análise das frequências de células T CD8+ γ H2Ax+ nos três grupos. **C)** Gráfico do MFI de células T CD8+ γ H2Ax+ dos grupos oligo (n = 10), moderado (n = 12) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. ** p = 0,0051, **** p < 0,0001. **D)** Comparação dos MFI de células T CD8+ γ H2Ax+ dos três grupos.....62

FIGURA 13. A) Gráfico das frequências de células T CD8+ p-p38+ dos grupos oligo (n = 9), moderado (n = 12) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. **B)** Gráfico do MFI de células T CD8+ p-p38+ dos grupos oligo (n = 10), moderado (n = 12) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. * p < 0,05. **C)** Comparação do MFI de células T CD8+ p-p38+ nos três grupos.63

FIGURA 14. Estratégia de análise para determinação das populações de memória NAIVE, CM, EM e EMRA de linfócitos T CD4+ e T CD8+.....64

FIGURA 15. A) Gráfico das frequências de T CD4+ NAIVE (n = 12, cada), CM (n = 12, cada), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg, * p < 0,05, ** p = 0,002. **B)** Comparação das populações de memória, principalmente EMRA, de T CD4+ entre os três grupos.65

FIGURA 16. A) Gráfico das frequências de T CD8+ NAIVE (n = 12, cada), CM (n = 12 oligo e moderado, n = 11 grave), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 12, cada) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg, ** p < 0,005, *** p = 0,0004. **B)** Comparação das populações de memória de T CD8+ CM entre os três grupos.66

FIGURA 17. Estratégia de análise para **A)** determinação das populações CD28+CD27-, CD28+CD27+, CD28-CD27+, CD28-CD27- dentro da população de células T CD4+. **B)** Gráfico das frequências de T CD4+ CD28+CD27+ (n = 12, cada), CD28+CD27- (n = 12, cada), CD28-CD27- (n = 9 oligo, n = 12 moderado e grave) e CD28-CD27+ (n = 12 oligo e grave, n = 9 moderado) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg, * p < 0,05, ** p = 0,0054. **C)**

Comparação das populações de células T CD4+ CD28+CD27-, CD28+CD27+, CD28-CD27+, CD28-CD27- entre os três grupos.67

FIGURA 18. Estratégia de análise para **A)** determinação das populações CD28+CD27-, CD28+CD27+, CD28-CD27+, CD28-CD27- dentro da população de células T CD8+. **B)** Gráfico das frequências de T CD8+ CD28+CD27+ (n = 12, cada), CD28-CD27+ (n = 12 oligo e moderado, n = 11 grave), CD28-CD27- (n = 12, cada), CD28+CD27- (n = 12 oligo e moderado, n = 11 grave). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg, * p < 0,05, ** p = 0,0017. **C)** Comparação das populações de células T CD8+ CD28+CD27-, CD28+CD27+, CD28-CD27+, CD28-CD27- entre os três grupos.68

FIGURA 19. Estratégia de análise de **A)** células T CD4+ CD28+CD27+ CD57+, CD28+CD27- CD57+ e CD28-CD27- CD57+. **B)** Gráfico das frequências de células T CD4+ CD28+CD27+ CD57+ (n = 12 oligo e grave, n = 11 moderado), CD28+CD27- CD57+ (n = 12 oligo e grave, n = 11 moderado), CD28-CD27- CD57+ (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. **C)** Gráfico do MFI das células T CD4+ CD28+CD27+ CD57+ (n = 12, cada), CD28+CD27- CD57+ (n = 12 oligo e grave, n = 10 moderado), CD28-CD27- CD57+ (n = 12 oligo e grave, n = 9 moderado). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg.....69

FIGURA 20. Estratégia de análise de **A)** células T CD4+ CD28+CD27+ KLRG1+, CD28+CD27- KLRG1+ e CD28-CD27- KLRG1+. **B)** Gráfico das frequências de células T CD4+ CD28+CD27+ KLRG1+ (n = 10 oligo, n = 12 moderado e grave), CD28+CD27- KLRG1+ (n = 12, cada), CD28-CD27- KLRG1+ (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. **C)** Gráfico do MFI das células T CD4+ CD28+CD27+ KLRG1+ (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave), CD28+CD27- KLRG1+ (n = 12, cada), CD28-CD27- KLRG1+ (n = 12, cada). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg.....70

FIGURA 21. Estratégia de análise de **A)** células T CD8+ CD28+CD27+ CD57+, CD28-CD27+ CD57+ e CD28-CD27- CD57+. **B)** Gráfico das frequências de células T CD8+ CD28+CD27+ CD57+ (n = 12 oligo e grave, n = 11 moderado), CD28-CD27+ CD57+ (n = 12 oligo e moderado, n = 11 grave), CD28-CD27- CD57+ (n = 12, cada) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. **C)** Gráfico do MFI das células T CD8+ CD28+CD27+ CD57+ (n = 12, cada), CD28-CD27+ CD57+ (n = 10 oligo e grave, n = 12 moderado), CD28-CD27- CD57+ (n = 12, cada) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc Benjamini e Hochberg, * p < 0,05. **D)** Comparação de MFI das células T CD8+ CD28-CD27+ CD57+ nos três grupos.71

FIGURA 22. **A)** Gráfico das frequências de células T CD8+ CD28+CD27+ KLRG1+ (n = 12, cada), CD28-CD27+ KLRG1+ (n = 12 oligo e moderado, n = 11 grave), CD28-CD27- KLRG1+ (n = 11 oligo, n = 10 moderado, n = 12 grave) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. * p < 0,05. Comparação das frequências de células **B)** T CD8+ CD28+CD27+ KLRG1+; **C)** T CD8+ CD28-CD27+ KLRG1+ e **D)** T CD8+ CD28-CD27- KLRG1+ nos três grupos.73

FIGURA 23. A) Comparação do MFI de células T CD8+ CD28-CD27+ KLRG1+ nos três grupos. **B)** Gráfico de MFI de células T CD8+ CD28+CD27+ (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave), CD28-CD27+ (n = 12 oligo e moderado, n = 11 grave) e CD28-CD27- KLRG1+ (n = 12, cada) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. * p < 0,05.....74

FIGURA 24. A) Gráfico das frequências de T CD4+ NAIVE (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave), CM (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 12 oligo e grave, n = 9 moderado) CD57+. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg, * p < 0,05, ** p = 0,0077. **B)** Estratégia de análise de células T CD4+ EMRA CD57+ em comparação com FMO BV421. **C)** Comparação de MFI de células T CD4+ EMRA CD57+ nos três grupos. **D)** Gráfico da MFI de células T CD4+ NAIVE (n = 12, cada), CM (n = 12, cada), EM (n = 11 oligo e moderado, n = 12 grave) e EMRA (n = 8 oligo, n = 9 moderado, n = 12 grave) CD57+. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc Benjamini e Hochberg, * p < 0,05.75

FIGURA 25. A) Gráfico das frequências de células T CD4+ NAIVE (n = 10 oligo, n = 12 moderado, n = 11 grave), CM (n = 12, cada), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 12 oligo e grave, n = 11 moderado) KLRG1+. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg, ** p = 0,0038. **B)** Comparação das frequências de células T CD4+ EMRA KLRG1+ em relação ao FMO de APC nos três grupos. **C)** Comparação de MFI de células T CD4+ EMRA KLRG1+ nos três grupos. **D)** Gráfico do MFI de células T CD4+ NAIVE (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave), CM (n = 12, cada), EM (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave) e EMRA (n = 12 oligo e grave, n = 11 moderado) KLRG1+. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg, ** p = 0,0042.76

FIGURA 26. A) Gráfico das frequências das populações de células T CD4+ NAIVE (n = 9 oligo, n = 12 moderado e grave), CM (n = 9 oligo, n = 11 moderado, n = 12 grave), EM (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave) e EMRA (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave) γ H2Ax+ dos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. * p < 0,05, ** p < 0,009, **** p < 0,0001. Comparação das frequências de células **B)** T CD4+ NAIVE γ H2Ax+; **C)** T CD4+ CM γ H2Ax+; **D)** T CD4+ EM γ H2Ax+ e **E)** T CD4+ EMRA γ H2Ax+ entre os três grupos.78

FIGURA 27. A) Gráfico do MFI de células T CD4+ NAIVE (n = 10 oligo, n = 12 moderado, n = 11 grave), CM (n = 11 oligo e grave, n = 12 moderado), EM (n = 9 oligo, n = 10 moderado e n = 12 grave) e EMRA (n = 8 oligo, n = 11 moderado, n = 12 grave) γ H2Ax+ dos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc Benjamini e Hochberg. * p < 0,05, ** p < 0,009, *** p < 0,0003. Comparação do MFI de células **B)** T CD4+ NAIVE γ H2Ax+ e **C)** T CD4+ CM γ H2Ax+ dos grupos oligo, moderado e grave.79

FIGURA 28. A) Gráfico do MFI de células T CD4+ NAIVE (n = 10 oligo, n = 12 moderado, n = 11 grave), CM (n = 11 oligo e grave, n = 12 moderado), EM (n = 9 oligo, n = 10 moderado, n = 12 grave) e EMRA (n = 10 oligo, n = 11 moderado, n = 12 grave) γ H2Ax+ dos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e

Hochberg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,009$, *** $p < 0,003$. Comparação de MFI de células **B)** T CD4+ EM γ H2Ax+ e **C)** T CD4+ EMRA γ H2Ax+ dos grupos oligo, moderado e grave.80

FIGURA 29. Gráfico do MFI de células T CD4+ NAIVE, CM, EM e EMRA p-p38+ dos grupos oligo (n = 10, cada), moderado (n = 12, cada) e grave (n = 12, cada). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg.81

FIGURA 30. A) Gráfico das frequências de células T CD8+ NAIVE (n = 11 oligo e grave, n = 10 moderado), CM (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 11 oligo e moderado, n = 12 grave) CD57+ dos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. **B)** Gráfico do MFI de células T CD8+ NAIVE (n = 10 oligo e moderado, n = 11 grave), CM (n = 11 oligo, n = 12 moderado, n = 9 grave), EM (n = 12 oligo, n = 10 moderado, n = 11 grave) e EMRA (n = 12, cada) CD57+ dos grupos. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. **C)** Comparação das populações de células T CD8+ NAIVE, CM, EM e EMRA CD57+.81

FIGURA 31. A) Gráfico das frequências de células T CD8+ NAIVE (n = 9 oligo, n = 10 moderado, n = 12 grave), CM (n = 12, cada), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 11 oligo e moderado, n = 12 grave) KLRG1+ dos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$. Comparação das frequências de células **B)** T CD8+ CM KLRG1+ **C)** T CD8+ EM KLRG1+ **D)** T CD8+ EMRA KLRG1+ com FMO de APC nos três grupos.83

FIGURA 32. A) Gráfico de MFI das células T CD8+ NAIVE (n = 9 oligo, n = 10 moderado, n = 12 grave), CM (n = 12 oligo e grave, n = 11 moderado), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 12, cada) KLRG1+ dos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. ** $p < 0,005$. Comparação de MFI **B)** de células T CD8+ CM KLRG1+ e **C)** de células T CD8+ EM KLRG1+ dos três grupos.84

FIGURA 33. A) Gráfico das frequências de células T CD8+ NAIVE (n = 10 oligo, n = 12 moderado e grave), CM (n = 10 oligo, n = 12 moderado e grave), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 10 oligo, n = 12 moderado e grave) γ H2Ax+ dos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$. **B)** Comparação das frequências de células T CD8+ NAIVE; **C)** CM; **D)** EM e **E)** EMRA γ H2Ax+ nos três grupos.87

FIGURA 34. A) Gráfico de MFI de células T CD8+ NAIVE (n = 12, cada), CM (n = 10 oligo, n = 11 moderado, n = 12 grave), EM (n = 10 oligo, n = 12 moderado e grave) e EMRA (n = 10 oligo, n = 12 moderado e grave) γ H2Ax+ nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Comparação de MFI **B)** de células T CD8+ NAIVE γ H2Ax+ e **C)** de células T CD8+ CM γ H2Ax nos três grupos.88

FIGURA 35. A) Gráfico de MFI de células T CD8+ NAIVE (n = 12, cada), CM (n = 10 oligo, n = 11 moderado, n = 12 grave), EM (n = 10 oligo, n = 12 moderado e grave) e EMRA (n = 10 oligo, n = 12 moderado e grave) γ H2Ax nos três grupos. Teste

Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Comparação de MFI **B)** de células T CD8+ EM γ H2Ax+ e **C)** de células T CD8+ EMRA γ H2Ax nos três grupos.89

FIGURA 36. Gráfico de MFI de células T CD8+ NAIVE (n = 9 oligo, n = 12 moderado e grave), CM, EM e EMRA p-p38+ nos grupos oligo (n = 10, cada), moderado (n = 12, cada) e grave (n = 12, cada). Teste Kruskal-Wallis, post-hoc FDR Benjamini e Hochberg.....90

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Descrição dos anticorpos usados para marcação da PBMC na citometria de fluxo classificados por fluoróforo conjugado, clone, isotipo, catálogo, marca e diluição.44
- TABELA 2.** Características gerais como sexo biológico e idade dos pacientes do grupo oligo (n = 42) arrolados do HUCAM e dos pacientes dos grupos moderado (n = 40) e grave (n = 26) arrolados do Hospital Dr. Jayme dos Santos Neves e do Hospital Dório Silva.47
- TABELA 3.** Dados laboratoriais de hemograma e componentes dos pacientes moderados e graves do Hospital Estadual Dr. Jayme Santos Neves. VCM = Volume Corpuscular Médio, HCM = Hemoglobina Corpuscular Média. Teste de Mann-Whitney.49
- TABELA 4.** Exames bioquímicos dos pacientes moderados e graves do Hospital Estadual Dr. Jayme Santos Neves. TAP = Tempo de Protrombina, INR = Razão Normalizada Internacional, PTTK = Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. Teste de Mann-Whitney.50
- TABELA 5.** Gasometria arterial dos pacientes moderados e graves do Hospital Estadual Dr. Jayme Santos Neves. PO₂ = Pressão Parcial de Oxigênio. Teste de Mann-Whitney.51
- TABELA 6.** Dados clínicos dos pacientes dos grupos oligo, moderado e grave (n = 12, cada) para as análises de citometria. † = veio a óbito.....53

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	22
1.1 – ASPECTOS GERAIS DO SARS-COV-2 E DA COVID-19.....	22
1.2 – SINTOMAS, MANIFESTAÇÕES, ACHADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA COVID-19	24
1.3 – IMUNOLOGIA DA COVID-19.....	28
1.4 – IMUNOSSENECÊNCIA DE CÉLULAS T	33
1.5 – IMUNOSSENECÊNCIA E PATÓGENESE DE DOENÇAS	37
1.6 – IMUNOSSENECÊNCIA E COVID-19.....	39
2 – OBJETIVOS: GERAL E ESPECÍFICOS.....	41
2.1 – OBJETIVO GERAL:	41
2.1.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	41
3 – MÉTODOS	42
3.1 – ASPECTOS ÉTICOS E SELEÇÃO DE PACIENTES.....	42
3.2 – ANÁLISES DOS PRONTUÁRIOS E EXAMES LABORATORIAIS	43
3.3 – COLETA DE AMOSTRAS E ISOLAMENTO DE CÉLULAS.....	43
3.4 – CITOMETRIA DE FLUXO.....	43
3.4.1 - DETERMINAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS T	45
3.5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4 – RESULTADOS	47
4.1 – DADOS GERAIS DOS PACIENTES.....	47
4.2 – DADOS DE INTERNAÇÃO.....	47
4.3 – EXAMES LABORATORIAIS	48
4.3.1 – HEMOGRAMA E COMPONENTES	48
4.3.2 – BIOQUÍMICOS E GASOMETRIA.....	50
4.3.3 – IMUNOGLOBULINAS	52

4.4 – ESCOLHA DA AMOSTRA PARA EXPERIMENTOS DE CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA	53
4.4.1 – DIMINUIÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS NOS GRUPOS MODERADO E GRAVE.....	54
4.4.2 – CÉLULAS T DOS GRUPOS OLIGO, MODERADO E GRAVE	54
4.4.3 – RECEPTORES DE IMUNOSSENECÊNCIA CD57 E KLRG1 EM CÉLULAS T.....	56
4.4.4 – AVALIAÇÃO DE DANOS NO DNA E EXPRESSÃO DE P38 EM CÉLULAS T.....	59
4.4.5 – ANÁLISE DO PERFIL DE DIFERENCIAÇÃO DOS COMPARTIMENTOS DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA NOS DIFERENTES GRUPOS COM COVID-19	63
4.4.6 – RECEPTORES CO-ESTIMULADORES CD27 E CD28 EM CÉLULAS T	66
4.4.7 – RECEPTORES DE IMUNOSSENECÊNCIA CD57 E KLRG1 NOS subgrupos DE CD28CD27 DE CÉLULAS T.....	69
4.4.8 – RECEPTORES DE IMUNOSSENECÊNCIA CD57 E KLRG1 NOS COMPARTIMENTOS DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA DE CÉLULAS T CD4+ ..	74
4.4.9 – DANOS AO DNA E EXPRESSÃO DE P38 DOS COMPARTIMENTOS DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA DE CÉLULAS T CD4+	77
4.4.10 – RECEPTORES DE IMUNOSSENECÊNCIA CD57 E KLRG1 NOS COMPARTIMENTOS DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA DE CÉLULAS T CD8+ ..	81
4.4.11 – DANOS AO DNA E EXPRESSÃO DE P38 DOS COMPARTIMENTOS DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA DE CÉLULAS T CD8+	85
5 – DISCUSSÃO	91
5.1 – DADOS GERAIS DOS PACIENTES E DE INTERNAÇÃO	91
5.2 – EXAMES LABORATORIAIS: HEMOGRAMA	92
5.3 – EXAMES LABORATORIAIS: BIOQUÍMICOS	96
5.4 – EXAMES LABORATORIAIS: GASOMÉTRICOS	98

5.5 – EXAMES LABORATORIAIS: IMUNOGLOBULINAS	98
5.6 – RESULTADOS DE CITOMETRIA DE CÉLULAS T	99
6 – CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
APÊNDICE A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA	127
APÊNDICE B – MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO.....	130
APÊNDICE C – ARTIGO DA DISSERTAÇÃO	132

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – ASPECTOS GERAIS DO SARS-COV-2 E DA COVID-19

Em janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS ou WHO, sigla do inglês) declarou emergência global de saúde pública de uma nova doença causada por um coronavírus (CoV), que emergiu em 2019 na China (MAXMEN, 2021; XINHUA, 2020). Em março de 2020, essa nova doença tornou-se uma pandemia (WHO, 2020a). Dados da OMS mostram que até a segunda semana de junho de 2022 havia mais de 530 milhões de casos confirmados, com mais de 6 milhões mortes em todo mundo (WHO, 2022b). O Brasil chegou ao terceiro lugar no ranking dos países com mais casos confirmados e ao segundo com maior número de mortes acumuladas (WHO, 2022b).

A OMS e o Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus denominaram esse novo SARS-CoV, do inglês *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, (SARS-CoV-2), causador da doença que nos humanos foi classificada como *CoronaVirus Infectious Disease*, COVID-19 (WHO, 2020c). Os CoV pertencem a subfamília *Coronavirinae*, que apresenta quatro gêneros, dentre o qual o SARS-CoV-2 pertence ao *Betacoronavirus* (CHEN; LIU; GUO, 2020).

O SARS-CoV-2 é um vírus de formato esférico encapsulado tendo o material genético composto por um ácido ribonucleico (RNA) de fita simples e sentido positivo (KAUL, 2020; LIU; KUO; SHIH, 2020). O genoma do vírus codifica proteínas acessórias e/ou funcionais como as Open-Reading Frames (ORFs); proteínas não estruturais (NSPs, sigla do inglês); quatro proteínas estruturais, que são as de membrana (M), envelope (E), núcleo-capsídeo (N) e as proteínas *spike* (S) (CHAN et al., 2020). A proteína S é composta por duas subunidades: S1 e S2, nas quais utiliza para infectar as células humanas e são alvo de terapias e vacinas atualmente (HUANG et al., 2020a).

Um dos mecanismos para infectar que SARS-CoV-2 utiliza é o receptor da enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2 ou ACE2, sigla do inglês), assim consegue fundir-se na membrana das células-alvo e infiltrar material genético (ZHOU et al., 2020a). Uma outra proteína do hospedeiro que medeia a ativação da

proteína S nas células-alvo e a entrada viral inicial é a *transmembrane protease serine 2* (TMPRSS2) (HOFFMANN et al., 2020). Vários tecidos humanos apresentam ACE2 e TMPRSS2, dentre eles o trato respiratório superior e inferior, cardiovascular, tecido do trato gastrointestinal e renal (DONG et al., 2020; HAMMING et al., 2004; ZIEGLER et al., 2020). Por se ligar a ACE2, o vírus desregula a conversão da Angiotensina 2 (AT2) em AT (1-7), fazendo com que AT2 esteja em níveis mais elevados no organismo (FOTUHI et al., 2020; JACKSON et al., 2022). Esse aumento está associado a mecanismos pró-inflamatórios, como também permeabilidade e lesões vasculares, processos de pró-apoptose e ao envelhecimento (FOTUHI et al., 2020).

Um outro mecanismo de infecção é pela via da Neuropilin (NRP1 ou NRP2), um receptor de superfície proteico transmembrana originalmente descrito em neurônios, mas também presente em outras células no organismo como as células endoteliais (CANTUTI-CASTELVETRI et al., 2020; DALY et al., 2020). O NRP1 é capaz de clivar a proteína S em S1 e S2, pela protease *furin*, desse modo aumentando a infectividade do vírus (LI, Z.; BUCK, 2021a). A NRP1 pode ser também considerada como um fator de potencialização de ACE2, quando analisados tecidos com níveis muito baixos de ACE2, as NRP1 e NRP2 estavam mais expressas (CANTUTI-CASTELVETRI et al., 2020).

Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) também denominado Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1 (HAVCR1) nos hepatócitos ou T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) seria outro receptor utilizado pelo SARS-CoV-2 (MORI et al., 2022). KIM-1/TIM-1 pode se ligar e mediar a internalização de nanopartículas lipossomais através da proteína S do vírus, principalmente em tecidos como rins e pulmões (MORI et al., 2022). Outro receptor também associado a infecção viral, é a *tyrosine-protein kinase receptor UFO* (AXL) que em células de linhagem HEK293T promoveu a entrada viral através da fusão do vírus à membrana celular com a interação da proteína S (WANG et al., 2021a). Embora ainda existam outros receptores que o SARS-CoV-2 possa utilizar para infectar as células, o ACE2 é o mais consolidado, detalhamento descrito e estudado até o presente momento (JACKSON et al., 2022).

Há fortes indícios que a transmissão do SARS-CoV-2 se dá predominantemente pelo ar, quando uma pessoa infectada dispersa gotículas e/ou aerossóis ao alcance de outra pessoa, através da fala, tosse e/ou espirro (GREENHALGH et al., 2021). As primeiras células alvo do SARS-CoV-2 provavelmente serão as células da mucosa olfativa nasal ou da mucosa nasofaríngea ou traqueia (KHAN et al., 2021). Deste modo, o novo CoV inicialmente infecta o sistema respiratório superior e posteriormente desce ao longo do sistema respiratório inferior, atingindo os alvéolos (HOU et al., 2020; SUNGNAK et al., 2020). As maneiras como os CoV infectam diferentes células, tecidos e órgãos ou a reação inflamatória desencadeada por ele podem esclarecer algumas questões sobre a sintomatologia da COVID-19.

1.2 – SINTOMAS, MANIFESTAÇÕES, ACHADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA COVID-19

Os contaminados quando positivos para SARS-CoV-2 podem ser assintomáticos, apresentar um estágio leve, moderado, grave/severo ou crítico (BRASIL, 2022, p. 11-12). Os sintomas podem ser diversos e costumam aparecer de 2 a 14 dias após a infecção e incluem desde tosse, febre, coriza, dor de garganta, dificuldade para respirar e até a perda de olfato (anosmia) e/ou paladar (disgeusia) (CDC, 2021b; CHEN et al., 2020). Outros sintomas que também podem surgir são a falta de ar, dores musculares e/ou dores de cabeça, confusão mental, dor no peito, diarreia e dependendo do estágio e da gravidade da doença podem levar a falência de vários órgãos e a morte (CHEN et al., 2020). Pacientes graves evoluem para o quadro de dispneia, hipoxemia e progressivamente para o quadro de síndrome respiratória aguda grave (SRAG ou ARDS, sigla do inglês) (CHEN et al., 2020; HUANG et al., 2020b; ZHOU et al., 2020b).

A ARDS ocorre de forma aguda, dentro de 7 dias de sintomas respiratórios novos ou agravados, caracterizada por hipoxemia e edema pulmonar bilateral devido ao excesso de permeabilidade alvéolo-capilar (MEYER; GATTINONI; CALFEE, 2021; RANIERI et al., 2012). Além de exames clínicos, sanguíneos e de imagem, dois critérios são analisados para determinar se ARDS é leve, moderada ou grave: a

pressão parcial de oxigênio no sangue arterial (PaO₂) e a fração inspirada de oxigênio (FiO₂), assim a razão PaO₂/FiO₂ é utilizada para classificar os acometidos (RANIERI et al., 2012).

No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza que casos suspeitos de ARDS são um quadro em que:

“indivíduo com SG [síndrome gripal] que apresente: dispneia/desconforto respiratório OU pressão ou dor persistente no tórax OU saturação de O₂ menor que 95% em ar ambiente OU coloração azulada (cianose) dos lábios ou rosto” (BRASIL, 2022, p. 22).

Em idosos também devem ser considerados “critérios específicos de agravamento, como síncope, confusão mental, sonolência excessiva, irritabilidade e inapetência” (BRASIL, 2022, p. 22). Assim, além da anamnese médica, exames auxiliares como os exames laboratoriais, exames de imagem e clínicos favorecem a compreensão da ARDS e se necessário o paciente precisar ser internado em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (MEYER; GATTINONI; CALFEE, 2021; RANIERI et al., 2012). É importante saber qual o grau de acometimento pulmonar e de ARDS para melhor manejo hospitalar e se há necessidade de fazer suplementação de oxigenação. A ventilação mecânica não cura a ARDS, mas auxilia o corpo a normalizar as trocas gasosas e a diminuir os efeitos colaterais (MEYER; GATTINONI; CALFEE, 2021).

As manifestações e a mortalidade da COVID-19 também dependem de fatores de risco como idade, gênero, estilo de vida e comorbidades prévias associadas. Assim, dois ou mais desses conjuntos de fatores em um único indivíduo podem determinar o agravamento dos sintomas e o desenvolvimento da forma mais grave/crítica da doença.

Pessoas de qualquer idade podem ser acometidas pela COVID-19, no entanto, a população idosa está mais propensa a adoecer, desenvolver formas mais graves e a morrer (CDC, 2021a). Normalmente, esse grupo etário apresenta doenças crônicas e comorbidades associadas a própria idade como alterações cardiovasculares, renais e metabólicas; assim como alterações do sistema imune (FARHEEN et al., 2021).

Em relação ao sexo biológico, o masculino está mais associado com a forma mais grave da COVID-19 e estão mais propensos a morrer pela doença (JIN et al.,

2020). Quanto aos hábitos de vida, fumantes e pessoas que tiveram histórico de serem fumantes apresentam um risco aumentado para desenvolvimento de formas mais graves e a morrer (REDDY et al., 2021). Pacientes com doenças renais, pulmonares, hepáticas, cardiovasculares, cerebrovasculares, diabetes, sobrepeso e obesidade apresentam um risco aumentado para desenvolvimento de formas mais graves e a morrer de COVID-19 em relação a pacientes sem comorbidades (YIN et al., 2021).

No Brasil houve uma maior taxa de hospitalização para pacientes do sexo masculino e com idade mais avançada de ambos os sexos (SOUZA et al., 2021). A taxa de letalidade foi de 41,3% entre os hospitalizados, principalmente aqueles com mais de 60 anos (SOUZA et al., 2021). Doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, doenças renais, neurológicas e pneumopatias foram as mais prevalentes entre as comorbidades na população brasileira (SOUZA et al., 2021). Já no estado do Espírito Santo (ES), o risco de morte foi maior entre o sexo masculino e aumentou conforme aumentava a idade (MARTINEZ et al., 2021). As comorbidades estavam diretamente associadas à fatalidade, principalmente na população de meia-idade (30 a 59 anos) e em idosos com mais de 90 anos (MARTINEZ et al., 2021).

Os exames clínicos e laboratoriais vão além do diagnóstico direto de detecção e confirmação do vírus (por reação de cadeia da polimerase – PCR, ou imunocromatográficos como detecção de antígenos e anticorpos), como também auxiliam na avaliação clínica, estado de saúde geral e progressão da doença nos pacientes. São marcadores de danos fisiológicos, inflamação ou alterações locais e/ou sistêmicas no organismo humano.

De acordo com a International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) os principais parâmetros laboratoriais que estão alterados em pacientes com COVID-19 são o hemograma (tanto a série branca quanto plaquetas); alterações dos exames gasométricos e aumento de diversos analitos bioquímicos (IFCC, 2022). A Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) também destaca alterações hematológicas e bioquímicas nos pacientes acometidos com COVID-19 (SBAC, 2020).

Analisando a série vermelha do hemograma, indivíduos com COVID-19 podem apresentar concentração diminuída de hemoglobina e hemácias, aumento

dos níveis de amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW, sigla do inglês), além de concentrações aumentadas de ferritina (GUANÍ-GUERRA et al., 2022; MORENO-TORRES et al., 2022; PALLADINO, 2021).

Os exames podem apresentar trombocitopenia ou plaquetopenia (baixa contagem de plaquetas) que se correlaciona com a gravidade da doença indicando presença de uma coagulação de consumo ou coagulação intravascular disseminada (CIVD) (PALLADINO, 2021; WOOL; MILLER, 2021). Além disso, diversos componentes dos glóbulos brancos como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, leucócitos e linfócitos podem apresentar níveis mais baixos ou aumentados que os valores de referência para essas contagens (JERAIBY et al., 2021; PALLADINO, 2021; ZHANG et al., 2021). Esses níveis também dependem se estão associados ou não a infecções secundárias (bacterianas, virais e/ou fúngicas), podendo intervir nos resultados das análises. Quanto aos exames gasométricos, estudos indicam alcalose, alcalemia (pH plasmático > 7,45) e baixa nos níveis de PaO₂ em pacientes com COVID-19, principalmente de indivíduos internados (BEZUIDENHOUT et al., 2021; MONDAL et al., 2021).

Em metanálise de exames bioquímicos, pacientes com COVID-19 obtiveram níveis ligeiramente aumentados para dímero-D e bilirrubina total (QIU et al., 2020). Enquanto a lactato desidrogenase (LDH ou DHL) teve um aumento mediano, nisso a IFCC destaca sendo marcador indicador de dano pulmonar (IFCC, 2022; QIU et al., 2020). Já outros exames obtiveram um aumento significativo como a proteína C reativa, aspartato transaminase, a creatinina sérica e a quinase, em contraste com a albumina plasmática que estava diminuída (QIU et al., 2020). Esses exames indicam danos de órgãos como fígado, rins, além de danos cardiovasculares e coagulopatias (IFCC, 2022). Parece não haver diferença significativa na procalcitonina e tempo de tromboplastina parcial ativada (QIU et al., 2020). Outra metanálise que comparou pacientes moderados e graves apresentou aumento na glicose sérica (VELAVAN; MEYER, 2020).

Por ser uma doença local e sistêmica, o conjunto de exames confirmatórios para o vírus, além dos exames clínicos, laboratoriais e de imagens devem ser levados em consideração para um tratamento efetivo. Não só isso, mas como o

sistema imune do paciente reage é uma das causas do agravamento do indivíduo infectado por SARS-CoV-2 (RAMOS-CASALS; BRITO-ZERÓN; MARIETE, 2021).

1.3 – IMUNOLOGIA DA COVID-19

O SARS-CoV-2 pode reconhecer um receptor e adentrar à célula seja por fusão de seu envelope viral com a membrana celular das células-alvo, seja por internalização e endocitose (BAYATI et al., 2021; JACKSON et al., 2022). Após a entrada, o genoma do SARS-CoV-2 de sentido positivo inicia diretamente a produção de proteínas virais, transcrição, tradução e montagem de novos vírus (CHEN; LIU; GUO, 2020). Desde antes da entrada do vírus na célula até sua replicação e disseminação, o sistema imune dos seres humanos começa a agir.

Um dos reconhecimentos de patógenos se dá por meio de receptores de reconhecimento de padrões específicos (PRRs, sigla do inglês), dentre eles os receptores do tipo Toll (TLR, sigla do inglês) e os sensores citosólicos (MDKHANA et al., 2021; PARK; IWASAKI, 2020; RICCI et al., 2021). Experimentos de cultura celular infectadas com SARS-CoV-2 demonstram que outros PRRs como o *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I); assim como a *melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA5) atuam na resposta antiviral (THORNE et al., 2021; YAMADA, Taisho et al., 2021). A detecção viral dos PRRs leva ao recrutamento de proteínas necessárias para uma cascata de ativação que induzem a transcrição de interferons (IFNs, principalmente do tipo I e III) e citocinas pró-inflamatórias (como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas (ILs), IL-1 β , IL-6, IL-18) (MDKHANA et al., 2021; PARK; IWASAKI, 2020; RICCI et al., 2021). Outro mecanismo da imunidade inata é a via de sinalização GMP-AMP sintase cíclica (cGAS, sigla do inglês) e estimuladora de genes de interferon (STING, sigla do inglês), conhecido como cGAS-STING; é ativada quando reconhece material genético no citoplasma (FRANZ et al., 2018). Esse mecanismo também desencadeia uma cascata de ativação que culmina na expressão de citocinas antivirais ou imunorreguladoras, como os IFNs (DOMIZIO et al., 2022; LI, H.; ZHOU; ZHANG, 2022).

A produção de citocinas (como IL-6, IL-1 β), quimiocinas (CXCL1, CXCL8) e outros fatores das células infectadas irão promover o recrutamento, ativação e

diferenciação das células do sistema imune como neutrófilos, células *natural killer* (NK), células dendríticas e células T para o local da infecção (RICCI et al., 2021; VARDHANA; WOLCHOK, 2020). Macrófagos são ativados, recrutados devidos aos padrões moleculares associados a danos (DAMPs, sigla do inglês) e aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, sigla do inglês) (MDKHANA et al., 2021; RICCI et al., 2021; VARDHANA; WOLCHOK, 2020).

Esse mecanismo antiviral de reconhecimento de PRRs, produção de citocinas, recrutamento e ativação de células imunes está presente em pacientes com sintomas leves e/ou que apresentam resolução da doença, no entanto, os CoV apresentam mecanismos de evasão imunológica (MDKHANA et al., 2021; PARK; IWASAKI, 2020; RICCI et al., 2021). Estudos indicam que respostas de IFN, principalmente os IFNs do tipo I e do tipo III, prejudicadas e/ou retardadas estão associadas ao risco de agravamento da doença (HADJADJ et al., 2020; PARK; IWASAKI, 2020).

Ademais, a infecção pode levar à (super)ativação do sistema imunológico, induzindo uma alta liberação de citocinas pró-inflamatórias fenômeno conhecido como tempestade de citocinas (*cytokine storm*) (FAJGENBAUM; JUNE, 2020; RICCI et al., 2021). Geralmente começa como uma resposta inflamatória localizada, constituída por células do sistema inato, mas depois se espalha sistemicamente, contribuindo para um alto recrutamento e regulação de células imunes para os tecidos infectados (FAJGENBAUM; JUNE, 2020; RICCI et al., 2021).

Células imunes como macrófagos teciduais e mastócitos, além de células endoteliais e epiteliais são as principais fontes iniciais da tempestade de citocinas durante a resposta imune inata (RAGAB et al., 2020). Com essa tempestade de citocinas há um desbalanço da resposta antiviral e agravamento do processo inflamatório (FAJGENBAUM; JUNE, 2020). Na tempestade de citocinas há um aumento agudo abrupto nos níveis de várias interleucinas (na COVID-19 principalmente IL-6), TNF- α , IFN- γ e diversas quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias como GCSF, GMCSF, MCP1, entre outras (HUANG et al., 2020b; RAGAB et al., 2020). Com isso, há influxo de várias células imunes da circulação (macrófagos, neutrófilos, células B e T) para o local da infecção resultando em danos na barreira vascular/capilar, falência múltipla de órgãos e morte

(FAJGENBAUM; JUNE, 2020; MANGALMURTI; HUNTER, 2020; RAGAB et al., 2020). Na COVID-19, a tempestade de citocinas contribui para a lesão pulmonar, consequentemente para insuficiência respiratória e agravamento da ARDS (CHEN et al., 2021).

Embora as respostas inatas sejam capazes de contribuir significativamente no desenvolvimento da tempestades de citocinas (FAJGENBAUM; JUNE, 2020; MANGALMURTI; HUNTER, 2020); as respostas do sistema imune adaptativo com a ativação de células T e sua capacidade de produzir altos níveis de citocinas efetoras também são importantes e devem ser levadas em consideração na COVID-19 (LUO et al., 2021; MANGALMURTI; HUNTER, 2020).

Sabe-se que os seres humanos são capazes de produzir uma resposta específica ao SARS-CoV-2, principalmente através de linfócitos T (GRIFONI et al., 2020; SEKINE et al., 2020). Na COVID-19 essas células são afetadas diretamente quanto aos seus níveis do sistema circulatório. Exames de hemograma demonstraram leucopenia (redução dos níveis de leucócitos) e linfopenia (redução dos níveis de linfócitos) nos pacientes hospitalizados (HUANG et al., 2020b; WEISKOPF et al., 2020). Frequências de linfócitos totais, T CD3+, T CD4+ e T CD8+ diminuíram, principalmente em pacientes com a forma mais grave da COVID-19 (DIAO et al., 2020; MAZZONI et al., 2020; YAO et al., 2020). No entanto, dependendo da análise, a linfopenia pode estar ou não presente na COVID-19.

Para entender o papel dos linfócitos na COVID-19, a doença pode ser classificada em fases aguda e convalescente: a fase aguda mais marcada pela infecção e multiplicação viral, enquanto a fase convalescente mais distinguida pela resposta imune do organismo (NIESSL; SEKINE; BUGGERT, 2021). No entanto, a duração em dias de cada uma das fases depende da análise, ficando a fase aguda logo no início dos sintomas e uma fase convalescente podendo ser de meses a anos após a infecção, geralmente de indivíduos recuperados da COVID-19.

As células T já são observadas desde a fase aguda da infecção por SARS-CoV-2 (WEISKOFF et al., 2020; SEKINE et al., 2020). As frequências relativas e os números absolutos de T CD4+ e T CD8+ foram mais baixos em pacientes moderados e graves em relação aos controles saudáveis (SEKINE et al., 2020). Em pacientes convalescentes de COVID-19, as frequências de T CD3+, T CD4+ e T

CD8+ não mudaram em relação aos controles (GRIFONI et al., 2020). A linfopenia na fase aguda pode estar associada ao maior deslocamento dessas células aos órgãos afetados pela COVID-19, enquanto a proporção dos linfócitos na fase convalescente pode estar ligada a resposta imune do paciente (NIESSL; SEKINE; BUGGERT, 2021; VABRET et al., 2020).

Existe um fenótipo (hiper)ativado através dos receptores CD69, CD38, CD44, HLA-DR altamente expressos em células T CD4+ e CD8+ de pacientes em diferentes estágios da COVID-19 em comparação com indivíduos saudáveis sem a doença (SONG et al., 2020; WANG et al., 2020b; XU et al., 2020; ZHOU et al., 2020c). Além disso, células T CD4+ co-expressando IFN- γ e GM-CSF estavam mais presentes em pacientes com COVID-19 internados em UTI, indicando que elas podem desempenhar um papel crítico nas respostas (hiper)inflamatórias da doença (ZHOU et al., 2020c).

As células T CD4+ (ou T *helpers*, Th sigla do inglês) têm papel fundamental de garantir atividade a outros linfócitos, ademais possuem a capacidade de se diferenciar em uma ampla variedade de tipos de células auxiliares e efectoras (SETTE; CROTTY, 2021; SWAIN; MCKINSTRY; STRUTT, 2012). Além disso, são capazes de instruir as células B à produção de anticorpos, auxiliar as células T CD8+, recrutar células da imunidade inata, facilitar o reparo tecidual e ter atividades antivirais diretas no organismo (SETTE; CROTTY, 2021; SWAIN; MCKINSTRY; STRUTT, 2012).

As células T CD4+ específicas aos antígenos do SARS-CoV-2 expandem-se durante o primeiro mês após a infecção e, em seguida, diminuem gradualmente nos meses subsequentes, tendo uma meia-vida estimada de 207 dias (COHEN et al., 2021). As células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs, sigla do inglês) apresentam peptídeos derivados do vírus em moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, sigla do inglês) de classe II para células T CD4+ naïve, através do receptor de células T (TCR, sigla do inglês) e entregam sinais co-estimulatórios (CD27 ou CD28), conduzindo a ativação (SWAIN; MCKINSTRY; STRUTT, 2012). As células T CD4+ ativadas sofrem extensa divisão e diferenciação celular, dando origem a subconjuntos distintos de células T efectoras (SWAIN; MCKINSTRY; STRUTT, 2012).

A resposta das células T CD4+ na fase aguda de COVID-19 consistem em grande parte em células auxiliares foliculares (Tfh) (MODERBACHER et al., 2020). Pacientes graves/críticos apresentaram frequências mais altas de subpopulações de células Tfh2 e Th2 e frequências mais baixas de subpopulações de células Tfh17.1, Tfh1, Th17.1 e Th1 (GARCIA-GASALLA et al., 2022). Enquanto na fase convalescente, muitas das células T CD4+ exibem uma polifuncionalidade (> 180 dias após o início dos sintomas) (LI, Z.; BUCK, 2021b). Th2, Th17 ou subconjuntos que expressam perforina específicos para SARS-CoV-2 circulantes não foram detectados nos pacientes (COHEN et al., 2021). No entanto, após três semanas de sintomas, há aumento de grânulos citotóxicos como granzima B e perforina nas células T CD4+ de pacientes com a forma grave em relação aos pacientes moderados, indicando nesse caso um perfil mais citotóxico dessas células (KANG et al., 2020).

Após o controle ou eliminação do patógeno, a grande maioria das células T ativadas sofrem apoptose, o restante cerca de 10%, formam uma população de células de memória de longa duração (GRAY; WESTERHOF; MACLEOD, 2018): as células de memória efetora (EM, sigla do inglês), as células de memória central (CM, sigla do inglês) e as células de memória residente (RM, sigla do inglês) (RAPHAEL; JOERN; FORSTHUBER, 2020). As células T de memória aumentam sua capacidade de vigilância imunológica, a probabilidade de um encontro mais rápido do antígeno no local da infecção e facilitam a geração de respostas efetoras mais rápidas e superiores contra os patógenos (RAPHAEL; JOERN; FORSTHUBER, 2020).

As células T CD8+ desempenham um papel essencial no controle da infecção viral, seja eliminando as células infectadas pelo vírus através da citotoxicidade, como também produzindo citocinas efetoras no local da infecção (RHA; SHIN, 2021; ZHANG, N.; BEVAN, 2011). As células T CD8+ específicas aos antígenos do SARS-CoV-2 expandem-se durante o primeiro mês após a infecção e, em seguida, diminuem gradualmente nos meses subsequentes, tendo uma meia-vida estimada de 196 dias (COHEN et al., 2021). Estudos com modelos animais demonstram que as células T CD8+ contribuem para a proteção do agravamento da COVID-19 (MCMAHAN et al., 2021; ZHUANG et al., 2021). Muito embora as células T sejam

extremamente necessárias ao organismo, deve-se levar em consideração o estado funcional dessas células, principalmente na imunopatogênese.

1.4 – IMUNOSSENECÊNCIA DE CÉLULAS T

A imunossenescência é compreendida como um declínio e alterações do sistema imunológico, principalmente devido ao envelhecimento fisiológico, que podem levar um maior risco à infecções, cânceres, doenças crônicas e autoimunes (PAWELEC, 2018; STAHL; BROWN, 2015). A imunossenescência é composta em parte pela senescência celular, como também pelo acúmulo à exposição de antígenos ao longo da vida, estressores/respostas ambientais e relações com patógenos agudos ou latentes/crônicos (STAHL; BROWN, 2015).

As células senescentes são caracterizadas pela parada do ciclo celular associado a alterações fenotípicas e funcionais (GORGOULIS et al., 2019; MUÑOZ-ESPÍN; SERRANO, 2014). Outros fatores são o declínio na diversidade do repertório de TCR, prejuízos na resposta à infecções latentes persistentes e desregulação do *pool* de células de memória conhecida como “*memory inflation*” (inflação de memória) (BUCHHOLZ; NEUENHAHN; BUSCH, 2011; KLENERMAN, 2018). Compreendem não apenas o sistema imune inato, como também o adaptativo (STAHL; BROWN, 2015).

As células senescentes apresentam baixa capacidade proliferativa, mas ainda são metabolicamente ativas e secretam uma ampla gama de mediadores inflamatórios (COPPÉ et al., 2010; GORGOULIS et al., 2019). É esse fenótipo secretor associado à senescência (SASP, sigla do inglês) e/ou secretoma de mensagens de senescência (SMS, sigla do inglês) que desempenha papel importante na patologia relacionada à idade (COPPÉ et al., 2010; KUILMAN; PEEPER, 2009). Esse aumento de mediadores pró-inflamatórios desencadeia um fenômeno conhecido como “*inflamm-aging*” e é acompanhado por um estado de inflamação sistêmica crônica de baixo grau no qual indivíduos começam com um estado de inflamação deficitário antes da infecção/doença subjacente (FULOP et al., 2014; HAZELDINE; LORD, 2020).

Deste modo, um ambiente inflamatório exacerbado pode levar a alterações no perfil de diferenciação e funcionalidade das células imunes, sendo que esses fatores promovem a expansão e/ou acúmulo de células senescentes (COVRE et al., 2020; NEHME et al., 2020). A qualidade e a quantidade das respostas das células T mudam com o envelhecimento fisiológico, trazendo consequências e alterações na eficácia da resposta imune o que pode levar à respostas inadequadas no organismo (AIELLO et al., 2019).

As células T de memória se acumulam durante a vida e podem ser denominadas em T CM, T EM e células T terminalmente diferenciadas (ou efetora terminal, TE sigla do inglês) com base em alguns marcadores como: CD27 e CD45RA (AKBAR; FLETCHER, 2005; FULOP et al., 2014; RODRIGUEZ et al., 2021). CD45 é uma glicoproteína que constitui a membrana celular dos linfócitos e suas diferentes isoformas são geradas por *splicing* alternativo tendo dentre elas o CD45RA e CD45RO (BARASHDI et al., 2021). Outro marcador para determinar essas populações de memória é o receptor de quimiocina CCR7 (KOCH et al., 2008; RODRIGUEZ et al., 2021).

Células T senescentes perdem a expressão dos receptores coestimuladores CD27 e CD28 requeridos para ativação dessas células, sendo o CD28 considerado um bom marcador de senescência celular (AIELLO et al., 2019; GATTINONI et al., 2017; GORONZY; WEYAND, 2013). As células T CD4+ diferenciam-se pela perda primeiramente do receptor CD27- e posteriormente o CD28-, tendo os *subsets* (subconjuntos) ou subpopulações CD27+CD28+, CD27-CD28+ e CD27-CD28- (AMYES et al., 2003). Enquanto as células T CD8+ à medida que se diferenciam para um fenótipo efetor perdem a expressão de CD28 e subsequentemente CD27, passando para um fenótipo senescente (APPAY et al., 2002).

Assim, as células T naïve expressam os receptores CCR7+, CD45RA+ e CD27+, as células T CM expressam CCR7+, CD27+ e passam a não expressar o receptor CD45RA-, as células T EM não expressam os três receptores CCR7-, CD27- e CD45RA- (AKBAR; FLETCHER, 2005; GATTINONI et al., 2017; RODRIGUEZ et al., 2021). As frequências dessas células mudam conforme o envelhecimento fisiológico, como também na presença de infecções prévias,

concomitantes ou secundárias (CZESNIKIEWICZ-GUZIK et al., 2008; KOCH et al., 2008).

A capacidade reduzida de responder a novos antígenos está ligada ao número reduzido de células T naïve periféricas (KOCH et al., 2008). Essas células são abundantes na juventude, mas podem ir se “esgotando” por exposições a microrganismos ao longo da vida (além de poderem diminuir devido a involução do timo e de outros órgãos linfoides), diferenciando-se em subconjuntos de memória (AIELLO et al., 2019).

As células terminalmente diferenciadas voltam a re-expressar CD45RA (T EMRA, sigla do inglês) e não expressam os receptores co-estimulatórios como CD27- e CD28- e também não expressam CCR7- (AKBAR; FLETCHER, 2005; KOCH et al., 2008). As T EMRA se acumulam com o envelhecimento fisiológico e após algumas infecções como por citomegalovírus (CMV) (KOCH et al., 2008; LIBRI et al., 2011). No mais, as T EMRA são associadas diretamente a imunossenescência, todavia precisam apresentar mais marcadores que condizem ao fenótipo senescente (HENSON; RIDDELL; AKBAR, 2012).

Células T senescentes podem apresentar um fenótipo semelhante à células da imunidade inata como de células NK, tendo receptores que originalmente são expressos nessas células (COVRE et al., 2020). Assim é encontrado em células T senescentes um aumento da expressão do receptor CD57 (também conhecido por HNK-1, LEU-7 ou L2), originalmente descrito em células NK (KARED et al., 2016). Outro é o *co-inhibitory receptor killer-cell lectin like receptor G1* (KLRG1), também originalmente descrito em células NK (HENSON; AKBAR, 2009). A expressão de KLRG1 não aumenta apenas com a senescência, mas também com fatores conhecidos por induzir a ativação e diferenciação de células T, como diante de patógenos e de células cancerígenas (HENSON; AKBAR, 2009; KARED et al., 2016). CD57 e KLRG1 são comumente usados como marcadores de diferenciação celular para um fenótipo senescente.

As células senescentes apresentam danos persistentes no DNA nuclear que podem ser denominados DNA-SCARSs (segmentos de DNA com alterações de cromatina reforçados pela senescência) (GORGOU LIS et al., 2019; HUMPHREYS; ELGHAZALY; FRISAN, 2020; RODIER et al., 2011). Uma das formas para avaliar

DNA-SCARS é pela expressão da fosforilação da histona H2Ax; a fosforilação da variante de histona H2Ax em sítios de quebras de DNA de fita dupla formam γ H2Ax (CELESTE et al., 2003; WEITZMAN; WEITZMAN, 2014). Assim, células senescentes apresentam aumento da expressão de γ H2Ax, sendo também marcador importante para demonstrar alteração no ciclo celular associado a imunossenescência (COVRE et al., 2020; RODRIGUEZ et al., 2021).

Outro mecanismo envolvido com a imunossenescência são as *mitogen-activated protein kinases* (proteína quinase ativada por mitógeno, MAPK sigla do inglês) que albergam vários sistemas complexos nos quais regulam diversas funções celulares tanto na imunidade inata e como da adaptativa (AIELLO et al., 2019; MARTÍNEZ-LIMÓN et al., 2020). As MAPKs atuam fosforilando resíduos específicos de serina, treonina e/ou tirosina, sendo reguladoras de processos como expressão gênica, proliferação, diferenciação celular e apoptose (PATTERSON et al., 2014). As MAPKs convencionais consistem em três grandes grupos e as p38 MAPKs estão dentre eles (MARTÍNEZ-LIMÓN et al., 2020). O p38 existe em quatro isoformas (α , β , γ e δ), que desempenham papéis essenciais na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , além de mediadores inflamatórios (MACHADO; MACHADO; PASCUTTI, 2021). Geralmente pode estar ausente em células T senescentes, entretanto, o IFN- α acaba ativando a via de p38, desencadeando a senescência celular e levando à inibição da proliferação e da atividade da telomerase em células T não senescentes (LANNA et al., 2013).

Tem sido visto que as células T CD4⁺ CD27⁻CD28⁻ acionam a MAPK para estimular a via do p38, sendo que esse mecanismo pode inibir a atividade da telomerase, interferir na proliferação de células T e na expressão de componentes-chave do TCR (LANNA et al., 2014). Dessa forma, as próprias células senescentes se autorregulam na sua manutenção e frequência. Outro ponto importante notar que linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ CD28⁻CD27⁻ também apresentam altas frequências de NKRs (receptores de células NK), sugerindo que elas também podem mediar funções efetoras através desses receptores (PEREIRA et al., 2020). Por sua vez, um ambiente com alta produção de citocinas faz com que células de memória se diferenciem em T EMRA independente de estimulação por TCR (GEGINAT, 2003).

1.5 – IMUNOSSENECÊNCIA E PATÓGENESE DE DOENÇAS

Células T senescentes produzem concentrações significativamente mais altas de mediadores inflamatórios que contribuem para imunopatogênese de diversas enfermidades (CHOU; EFFROS, 2013). A atividade constante de células T senescentes ou ativadas cronicamente podem causar extensa perda óssea, fenômeno esse que ocorre em doenças como a artrite reumatoide e a osteoporose (FESSLER et al., 2018). Em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, a imunossenescência parece contribuir na piora em diversas disfunções cognitivas, como nos domínios de atenção, recordação e visão-espacial (KALIM et al., 2020).

No mais, as células T senescentes estão presentes em doenças infecciosas como a leishmaniose tegumentar e contribuem para persistência da infecção (COVRE et al., 2019). Além disso, a expressão de marcadores de senescência mais aumentada em lesões de leishmaniose cutânea se correlaciona com o tamanho da lesão apresentada (FANTECELLE et al., 2021).

Tamanho e alterações telemétricas, principalmente encurtamento de telômero, estão também presentes em células senescentes (MUÑOZ-ESPÍN; SERRANO, 2014). Assim, o comprimento dos telômeros de linfócitos do sangue periférico parece contribuir para o desenvolvimento do carcinoma orofaríngeo associado ao papiloma vírus (HPV, sigla do inglês) (ZHANG et al., 2013). Desse modo, é importante entender o papel de células T senescentes e como contribuem para imunopatogênese associada.

Na infecção por vírus da influenza em idosos houve uma diminuição de células T naïve e também um aumento da senescência e diferenciação terminal de células T CD8+ específicas do vírus (DOLFI et al., 2013). Houve aumento da expressão de células T senescentes, com a redução da frequência de CD28 e aumento das frequências de CD57 e KLRG1 em pacientes com vírus Epstein-Barr (VEB ou EBV sigla do inglês) associado a linfoma (LIU et al., 2020). Porcentagens de células CD8+ negativas para CD28 ou CD27 estavam mais aumentadas em pacientes com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao vírus-T linfotrófico humano do tipo 1 (HTLV-1, sigla do inglês) (HAM/TSP, sigla do inglês) em comparação com portadores de vírus assintomáticos saudáveis ou controles

saudáveis (SABOURI et al., 2008). Infecções crônicas relacionadas ao CMV levam a uma expansão atípica de células T CD8+ de memória específicas do vírus que retêm um metabolismo ativo enquanto expressam um fenótipo senescente (PAWELEC, 2014).

O vírus da hepatite C (HCV sigla do inglês) e o vírus da hepatite B (HBV sigla do inglês), além do CMV, são frequentemente detectados em pessoas vivendo com HIV/AIDS tratadas com terapia antirretroviral combinada (TROY et al., 2016) apoiando a noção de que uma exposição constante ao antígeno pode contribuir para uma imunossenescência disfuncional (TEDESCHI et al., 2022).

Sabe-se que expansões de células T de memória altamente diferenciadas têm sido associadas a respostas vacinais reduzidas, principalmente na população idosa (GORONZY, et al., 2001). KLRG1 super expresso em células T CD4+ de não respondedores à vacina do vírus do HBV infectados pelo HCV foi associado a piora na resposta vacinal (SHI et al., 2014). Não só em idosos, mas em adultos jovens CMV+ a expansão de células T CD4+ CD57+KLRG1+ terminalmente diferenciadas antes da vacinação MVA-EBO-Z foi negativamente associada a respostas de anticorpos específicos da vacina contra o vírus Ebola (BOWYER et al., 2020). Por isso, é importante entender o fenótipo das células T senescentes no contexto atual da COVID-19.

A população T CD4+ CD27-CD28- estava mais aumentada em pacientes CMV+ (AMYES et al., 2003; BOWYER et al., 2020) e tem sido visto que as células T CD4+ CD27-CD28- específicas para o CMV apresentam características de células T reguladoras (Treg) (TOVAR-SALAZAR et al., 2010; TOVAR-SALAZAR; WEINBERG, 2017). A infecção latente por CMV parece estar associada a um risco aumentado de hospitalização relacionada ao COVID-19 (ALANIO et al., 2022). Visto isso, entender a relação da infecção por CMV, levando em consideração que a população mais idosa é mais propensa a se infectar por SARS-CoV-2 e a ter esse vírus, sendo esses fatores contribuintes para um acúmulo de células T senescentes que interferem na imunopatogênese em co-infecções. Isso já é descrito em pacientes HIV+ co-infectados com CMV+ no qual há maior acúmulo de células T CD4+ CD28-CD27- do que aqueles CMV-HIV- e CMV+HIV- (TOVAR-SALAZAR; WEINBERG, 2017).

1.6 – IMUNOSSENECÊNCIA E COVID-19

Embora a razão CD4/CD8 esteja mais aumentada em pacientes COVID-19 em relação aos indivíduos saudáveis, quando comparados com a gravidade da doença não parece haver diferença significativa (MAZZONI et al., 2020; WANG et al., 2020b; WEISKOPF et al., 2020). Em amostras de linfonodos torácicos e baço *post-mortem* de pacientes com COVID-19 houve perda da capacidade proliferativa de células T CD4+ Tfh, o que explica em parte a durabilidade limitada das respostas de anticorpos contra o coronavírus (KANEKO et al., 2020).

Além do mais, houve um aumento da frequência de células T CD4+ efetora terminal CCR7-CD45RA+CD28-CD27+/- em pacientes com COVID-19 (BIASI et al., 2020). A frequência do fenótipo de células T CD4+ EMRA (CD45RA+CCR7-) foi significativamente maior em pacientes graves/críticos em comparação com os grupos de pacientes leves/moderados e de pacientes recuperados (GARCIA-GASALLA et al., 2022). Assim como acúmulo de células T CD8+ EMRA (CD45RA+CD27- ou CD45RA+CD27-CCR7-) (ADAMO et al., 2021; MATHEW et al., 2020; NEIDLEMAN et al., 2020). Ainda mais, foram encontradas frequências mais aumentadas de células T CD4+ CD28-CD57+ em pacientes com COVID-19 gravemente infectados na fase aguda da doença (ARCANJO et al., 2021). Ainda na fase aguda houve elevação das frequências de células T CD4+ EMRA produtoras de GM-CSF, envolvidas na tempestade de citocinas, e essas correlacionaram-se positivamente com a gravidade da doença (KREUTMAIR et al., 2021). Esses achados são importantes para correlacionar a gravidade da doença e a entender o perfil fenotípico das células T com a imunossenescência na COVID-19.

A população de T CD8+ CD27-CD28- estava mais aumentada na forma mais grave da COVID-19 em relação a forma moderada, demonstrando que quanto mais grave a apresentação clínica mais acúmulo de fenótipo senescente (SEGUNDO et al., 2021). Houve aumento de citotoxicidade com aumento das expressões de granzima B e perforina em células T CD8+ (GRIFONI et al., 2020). Os pacientes com COVID-19 apresentaram frequências mais altas de células T CD8+ produzindo moléculas citotóxicas como granzimas A e B, bem como perforina em comparação

aos controles saudáveis (BERGANTINI et al., 2021; WESTMEIER et al., 2020). Quando avaliadas, há aumento de grânulos citotóxicos (granzima B e perforina) em indivíduos com a forma mais grave da doença, indicando uma (hiper)ativação de citotoxicidade dessas células, podendo ser um agravante na doença (ADAMO et al., 2021; KANG et al., 2020; SONG et al., 2020). No pulmão, a ativação excessiva de células T citotóxicas parece não ser protetora, mas causadora de danos e sequelas pulmonares após a infecção por SARS-CoV-2 (WU et al., 2021).

De forma complementar, células T senescentes possuem propensão natural de migração para tecidos periféricos inflamados, onde se acumulam e mediam danos teciduais de forma inespecífica (COVRE et al., 2019; DOCK; EFFROS, 2011; VUKMANOVIC-STEJIC et al., 2015). Foi visto em lavado brônquio alveolar (LBA) de pacientes após a fase aguda de COVID-19 um aumento de frequência de células T CD8+; as respostas desreguladas dessas células estavam associadas a função pulmonar prejudicada após pneumonia viral (CHEON et al., 2021). Pacientes com sequela pulmonar apresentavam acúmulos de células T senescentes, principalmente com aumento de CD57 e KLRG1, mesmo após um ano da infecção por COVID-19 (WU et al., 2021).

JUSTIFICATIVA

Visto que o acúmulo de células T senescentes estão associadas a imunopatogênese de diversas infecções (COVRE et al., 2019; DOLFI et al., 2013; LIU et al., 2020; TEDESCHI et al., 2022; TROY et al., 2016) e que pacientes com COVID-19 apresentam inúmeros fatores que podem estar associados a imunossenescência como aumento de frequência de EMRA, NKRs, SASP e citotoxicidade. Este estudo tem como interesse avaliar características fenotípicas de CD4+ e CD8+, além de analisar o estado de diferenciação e características de senescência dessas células na infecção pelo SARS-CoV-2, de humanos em diferentes estágios da COVID-19.

2 – OBJETIVOS: GERAL E ESPECÍFICOS

2.1 – OBJETIVO GERAL:

Esta proposta objetiva analisar fenotipicamente células T senescentes durante a COVID-19, bem como de estabelecer sua relação com a patogênese e gravidade da doença.

2.1.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar o perfil clínico através dos resultados de exames laboratoriais de pacientes oligossintomáticos, moderados e graves, diagnosticados com COVID-19;
- Avaliar a expressão fenotípica das populações de células T totais e suas subpopulações dos três grupos;
- Avaliar as expressões fenotípicas de senescência nas populações de células T entre os três grupos.

3 – MÉTODOS

3.1 – ASPECTOS ÉTICOS E SELEÇÃO DE PACIENTES

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. O projeto teve aprovação ética do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Cassiano Moraes (HUCAM) – UFES, número referencial # 32171120.0.0000.5071 (**APÊNDICE A**).

Ao todo foram selecionados pacientes entre 18 e 65 anos, positivamente diagnosticados com COVID-19 (diagnóstico molecular RT-PCR (*swab* nasofaríngeo) e/ou diagnóstico imunológico por ELISA para IgM/IgG) para SARS-CoV-2), atendidos nos serviços dos hospitais HUCAM (Vitória, ES), do Hospital Jayme dos Santos Neves (Serra, ES) e do Hospital Dório Silva (Serra, ES). Os pacientes e/ou familiares foram informados sobre os objetivos do projeto, e os que consentiram em participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (**APÊNDICE B**).

Os pacientes foram classificados em 3 grupos de estudo (Oligossintomáticos, Moderados e Graves), segundo as diretrizes para diagnóstico e tratamento da COVID-19 preconizados pelo Ministério da Saúde do Brasil. Indivíduos com histórico de neoplasia, desordens imunossupressivas, que estiveram em uso crônico de retrovirais ou que desejaram a qualquer momento se retirar da pesquisa foram excluídos do estudo.

Os pacientes oligossintomáticos foram acompanhados por 180 dias (junho de 2020 a janeiro 2021) após a confirmação da infecção por SARS-CoV-2. Esses pacientes foram identificados pelos tempos de coleta: D15 (até 15 dias após a infecção), D30, D45, D60, D90/D120 e D180, sucessivamente. Sendo o principal foco o grupo D15 para as coletas de sangue com objetivo de isolar as células mononucleares do sangue periférico (PBMC, sigla do inglês).

Os pacientes moderados e graves foram coletados uma única vez (entre junho e agosto de 2020) enquanto estavam internados dentro do período da infecção viral, no tempo máximo de 20 dias após a confirmação do diagnóstico.

3.2 – ANÁLISES DOS PRONTUÁRIOS E EXAMES LABORATORIAIS

Exames como hemograma, bioquímicos, gasométricos e as imunoglobulinas foram incluídos no estudo para fins de comparação entre os grupos e com os achados das experimentações fenotípicas.

Os valores de referência de cada exame foram extraídos dos laboratórios de análises clínicas dos hospitais e clínicas em que foram realizados.

3.3 – COLETA DE AMOSTRAS E ISOLAMENTO DE CÉLULAS

As amostras de sangue foram coletadas por profissionais treinados seguindo os protocolos de segurança e utilização de equipamentos de proteção individual, utilizando o método de coleta à vácuo em tubo de coleta com heparina sódica. As PBMC foram obtidas do tubo de coleta com heparina, separadas por meio de gradiente de concentração utilizando Ficoll-Hypaque (GE Healthcare) e posteriormente armazenadas em meio de congelamento celular (10% Dimetilsulfóxido (DMSO) em Soro Fetal Bovino (SFB)) até o uso.

Para a realização dos experimentos, as células foram descongeladas em banho-maria a 37°C e diluído na proporção 1:10 em RPMI completo (contendo RPMI base com antibióticos, SFB, L-glutamina). Posteriormente foram centrifugadas e resuspendidas novamente em RPMI completo (aproximadamente 5 ml), realizada a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer e postas em estufa de CO₂ por no mínimo 4h.

3.4 – CITOMETRIA DE FLUXO

Uma parte das PBMC foram utilizadas para os experimentos de imunofenotipagem celular para populações de células T. Para a análise, por citometria de fluxo, cerca de 1×10^6 células/ml foram transferidas para uma placa de 96 poços de fundo cônico e centrifugadas. Após o processo, as células foram resuspendidas em solução tampão fosfato-salino (PBS) e novamente centrifugadas. Posteriormente, as células foram incubadas com marcação para

viabilidade celular Live/Dead (Zombie NIR) por 15 min em temperatura ambiente. Após isso, as células foram ressuspensas em PBS, centrifugadas e resuspensas em PBS com 2% de soro fetal bovino, contendo os anticorpos para marcação de superfície extracelular por cerca de 15min em temperatura ambiente. Os anticorpos usados na marcação estão descritos na **TABELA 1**. Depois desses anticorpos foram fixados com PBS + 1% paraformaldeído por cerca de 15 min, logo após lavados com tampão FACS 2% SFB e as células resuspensas nesse mesmo tampão (aproximadamente 500 µl) para aquisição no citômetro.

Para outra marcação extracelular foram fixadas com PBS + 2% paraformaldeído por 10min a 37°C. As células foram lavadas duas vezes com FACS 2% SFB, após isso foram permeabilizadas com BD Phosflow™ Perm Buffer III [BD Biosciences cat# 558050] por 30min no gelo (freezer -20°C). Depois as células foram incubadas para anticorpos p-p38 (PE) e p-γH2Ax (FITC) por 30min em temperatura ambiente (**TABELA 1**). Lavadas novamente com FACS 2% SFB e resuspensas nesse mesmo tampão para aquisição no citômetro.

Essas células foram adquiridas de 100.000 a 150.000 células/eventos por amostra dentro do *gate single cells* no equipamento CytoFLEX LX [Beckman Coulter Life Sciences, USA] e analisadas no software FlowJo versão 10.8.1 para Mac OS X. Foram utilizados os métodos de Fluorescence Minus One (FMO) ou a população positiva do grupo oligo. Os dados de citometria estão expressos em frequência (%) e intensidade média de fluorescência (MFI, sigla do inglês).

TABELA 1. Descrição dos anticorpos usados para marcação da PBMC na citometria de fluxo classificados por fluoróforo conjugado, clone, isotipo, catálogo, marca e diluição.

ANTICORPO	CONJUGADO	CLONE	ISOTIPO	CATÁLOGO #	MARCA	DILUIÇÃO
CD57	BV421	NK-1	Mouse IgM	563896	BD Pharmingen	1:50
CD3	BV510	OKT3	Mouse IgG2a	317332,	BioLegend	1:50, 1:40
CD45RA	BV605	HI100	Mouse IgG2b	304134	BioLegend	1:50
CD28	PE	CD28.2	Mouse (C3H x BALB/c) IgG1	555729	BD Pharmingen	1:50
CD56	PE/Dazzle 594	HCD56	Mouse IgG1	318348	BioLegend	1:100
CD4	PerCP-Cy5.5, PE-Cy 5	RPA-T4	Mouse IgG1	300530, 15-0049-42	BioLegend, eBioscience	1:50
CD27	PE-Cy7	M-T271	Mouse BALB/c IgG1	560609	BD Pharmingen	1:50
KLRG1	APC	REA261	Recombinant human IgG1	130-103-639	REAFinity	1:50
CD8	Alexa Fluor 700	RPA-T8	Mouse IgG1	557945	BD Pharmingen	1:50
p-p38	Alexa Fluor 647	36/p38 (pT180/pY182)	Mouse IgG1	612595	BD Pharmingen	1:20
p-γH2Ax	FITC	2F3	Mouse IgG1	613404	BioLegend	1:20
Fixable Viability Kit	Zombie NIR			77184	BioLegend	1:1000

3.4.1 - DETERMINAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS T

Estratégia de análise geral para determinação das populações de linfócitos se deu primeiramente por tamanho (FSC-H) e granulosidade (SSC-H), *singles cells* (FSC-H x FSC-A) para exclusão de eventos duplicados, células viáveis (DEAD-, FSC-H x NIR), população de células T CD3+ (CD56 PE/Dazzle 594 x CD3 BV510) e determinação das populações T CD4+ e T CD8+ totais (CD4 PerCP-Cy5.5 ou PE-Cy5 x CD8 Alexa Fluor 700) (**FIGURA 1**).

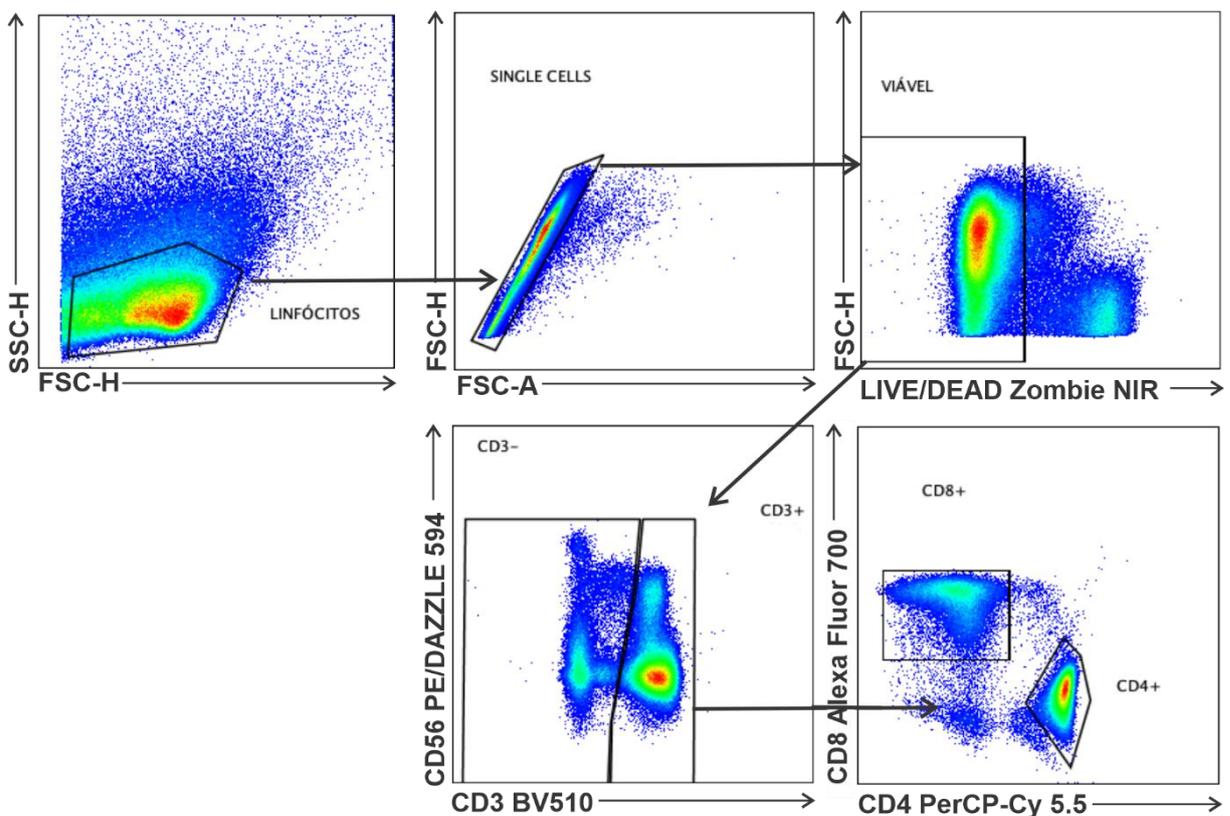


FIGURA 1. Estratégia de análise para definição das populações de células T.

3.5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism versão 9.1.1 para Mac OS X. Os dados foram representados por média \pm erro padrão da média em tabelas e/ou gráficos. Os valores considerados significativos quando $p < 0,05$.

Foi realizado teste de normalidade Shapiro-Wilk para analisar se os dados apresentavam distribuição normal. Para retirada/exclusão de *outliers* foi utilizado o método de ROUT (Q = 1%).

O teste de Mann-Whitney para dados não pareados e o Teste Wilcoxon para dados pareados foram realizados para todas as variáveis contínuas não paramétricas. Para mais de três variáveis não paramétricas foram realizados o Teste de Kruskal-Wallis para dados não pareados, Teste de Friedman para dados pareados e *post-hoc* "Original FDR method of Benjamini and Hochberg".

4 – RESULTADOS

4.1 – DADOS GERAIS DOS PACIENTES

Foram arrolados ao todo para análises clínicas e laboratoriais cerca de 108 pacientes, classificados conforme apresentação dos sintomas entre 42 pacientes oligossintomáticos, aqueles indivíduos que apresentavam sintomas leves e diversos que não precisaram de internação hospitalar, 40 pacientes moderados que necessitaram de internação hospitalar e acompanhamento médico e 26 pacientes graves que além de internação em UTI, ainda precisaram de suporte de ventilação mecânica.

A **TABELA 2** resume as características gerais dos pacientes, sexo biológico e a idade cronológica média dos grupos arrolados na pesquisa.

TABELA 2. Características gerais como sexo biológico e idade dos pacientes do grupo oligo (n = 42) arrolados do HUCAM e dos pacientes dos grupos moderado (n = 40) e grave (n = 26) arrolados do Hospital Dr. Jayme dos Santos Neves e do Hospital Dório Silva.

	OLIGO	MODERADO	GRAVE
MASCULINO	12	20	16
FEMININO	30	20	10
IDADE	39,74 ± 1,61	51,15 ± 2,16	48,08 ± 1,65

4.2 – DADOS DE INTERNAÇÃO

A porcentagem dos pacientes que obtiveram alta médica durante o período do estudo foi de 73,53% (25 de 34) no grupo moderado e 30,77% (8 de 26) no grupo grave. Já a porcentagem dos pacientes que foram à óbito durante o período do estudo no grupo moderado foi de 11,76% (4 de 34) e no grave foi de 62,54% (16 de 26). O restante dos pacientes que ou foram transferidos ou não tiveram informações sobre a internação foi de 14,71% (5 de 34) no grupo moderado e 7,36% (2 de 26) no grupo grave (**FIGURA 2A**).

O tempo médio em dias de internação do grupo moderado e grave foi de 7,72 ± 0,83 (n = 29) e 15,33 ± 1,45 (n = 21), respectivamente. Ainda, o tempo médio de

internação do grupo grave foi significativamente maior do que os observados no grupo moderado (**** $p < 0,0001$, **FIGURA 2B**).

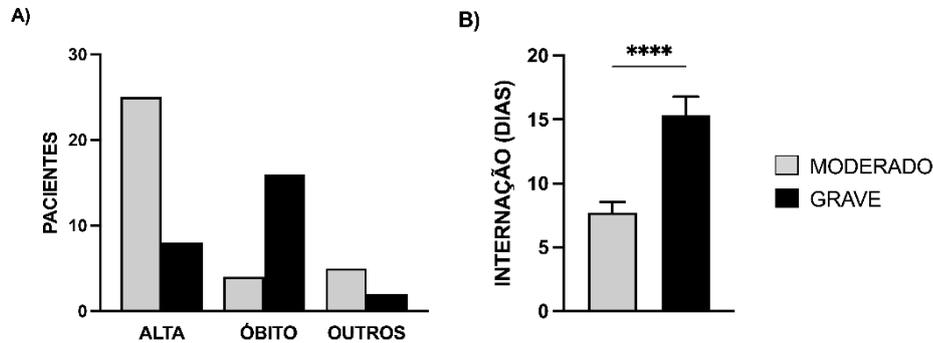


FIGURA 2. A) Dados de alta, óbitos e outros dos grupos moderado e grave. **B)** Tempo médio de internação do grupo moderado e grave do Hospital Dr. Jayme dos Santos Neves. Moderado (n = 29) e grave (n = 21). Teste de Mann-Whitney, **** $p < 0,0001$.

4.3 – EXAMES LABORATORIAIS

4.3.1 – HEMOGRAMA E COMPONENTES

Os exames sanguíneos como hemograma demonstram os valores de diversos componentes da corrente sanguínea e são auxiliares no acompanhamento e controle da COVID-19. Os dados de hemograma e componentes estão resumidos na **TABELA 3**. Houve diminuição dos níveis de Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), de linfócito e de monócito no grupo grave em relação ao moderado (**TABELA 3, linhas 6, 13 e 15**). Em contrapartida, houve um aumento dos níveis de RDW, leucócito, neutrófilo bastão, segmentado, bastão global e segmentado global no grupo grave em relação ao moderado (**TABELA 3, linhas 7, 9, 10, 11, 14 e 15**).

Quando observados os valores de hemoglobina estavam ligeiramente diminuídos nos dois grupos em relação aos valores de referência para esse analito (**TABELA 3, linha 2**). Enquanto para leucócitos e monócitos, esses apresentaram níveis aumentados em relação aos valores de referência, principalmente no grupo grave (**TABELA 3, linhas 9 e 14**). Os valores de neutrófilo segmentado estavam aumentados no grupo grave em relação aos valores de referência (**TABELA 3, linha**

11). Já os níveis de linfócitos estavam diminuídos em relação aos valores de referência nos dois grupos (**TABELA 3, linha 12**).

TABELA 3. Dados laboratoriais de hemograma e componentes dos pacientes moderados e graves do Hospital Estadual Dr. Jayme Santos Neves. VCM = Volume Corpuscular Médio, HCM = Hemoglobina Corpuscular Média. Teste de Mann-Whitney.

	MODERADO	GRAVE	p	VALORES DE REFERÊNCIA
HEMÁCIAS	3,97 ± 0,13 (n = 34)	3,85 ± 0,13 (n = 26)	0,3795	3,90 ~ 5,72
HEMOGLOBINA	11,56 ± 0,38 (n = 34)	11,04 ± 0,38 (n = 26)	0,3039	12,00 ~ 17,50
HEMATÓCRITO	34,58 ± 1,07 (n = 34)	33,48 ± 1,07 (n = 26)	0,4084	34,90 ~ 50,00
VCM	87,61 ± 1,00 (n = 34)	88,67 ± 0,72 (n = 23)	0,4403	81,20 ~ 98,30
HCM	29,26 ± 0,38 (n = 34)	29,27 ± 0,33 (n = 23)	0,5856	26,00 ~ 34,00
CHCM	33,51 ± 0,19 (n = 33)	32,95 ± 0,24 (n = 26)	< 0,05*	32,00 ~ 34,90
RDW	14,00 ± 0,24 (n = 32)	14,58 ± 0,23 (n = 24)	< 0,05*	11,80 ~ 15,60
PLAQUETAS	286.559 ± 20.152 (n = 34)	279.192 ± 17.422 (n = 26)	0,8969	150.000 ~ 450.000
LEUCÓCITOS	10.869 ± 938,2 (n = 32)	12.204 ± 434,0 (n = 24)	< 0,05*	4.000 ~ 10.500
NEUTRÓFILO BASTÃO	2,00 ± 0,00 (n = 27)	2,36 ± 0,13 (n = 25)	0,0013**	0,00 ~ 4,00
NEUTRÓFILO SEGMENTADO	74,64 ± 1,85 (n = 33)	83,87 ± 0,90 (n = 26)	< 0,0001****	45,00 ~ 75,00
LINFÓCITOS	14,56 ± 1,40 (n = 33)	8,03 ± 0,57 (n = 26)	0,0012 ***	22,00 ~ 45,00
EOSINÓFILOS	1,36 ± 0,24 (n = 34)	0,69 ± 0,13 (n = 26)	0,0574	1,00 ~ 5,00
MONÓCITOS	6,61 ± 0,55 (n = 34)	4,80 ± 0,39 (n = 26)	< 0,05*	1,00 ~ 3,00

BASTÃO GLOBAL	230,2 ± 20,93 (n = 31)	286,7 ± 21,27 (n = 24)	< 0,05*	~
SEGMENTADO GLOBAL	7.551 ± 800,6 (n = 31)	10.985 ± 606,7 (n = 26)	0,0001***	~
LINFÓCITO GLOBAL	1.452 ± 152,9 (n = 33)	1.030 ± 83,46 (n = 26)	0,0745	~
EOSINÓFILO GLOBAL	79,99 ± 16,22 (n = 27)	76,97 ± 14,87 (n = 25)	0,8853	~
MONÓCITO GLOBAL	639,4 ± 59,11 (n = 33)	579,2 ± 48,51 (n = 25)	0,6043	~

4.3.2 – BIOQUÍMICOS E GASOMETRIA

Da mesma forma que o hemograma, os exames bioquímicos auxiliam no acompanhamento dos pacientes internados e apresentam diversos indicadores de danos em tecidos e sistemas. Os dados estão resumidos na **TABELA 4**. Destacam-se o aumento dos níveis de DHL, bilirrubina direta, proteína C reativa, ureia e creatinina no grupo grave em relação ao moderado (**TABELA 4, linhas 1, 4, 9, 11 e 12**).

Os valores de DHL, TAP, ureia, creatinina e triglicerídeos estavam aumentados em relação aos valores de referência nos grupos moderado e grave (**TABELA 4, linhas 1, 6, 11, 12 e 13**).

TABELA 4. Exames bioquímicos dos pacientes moderados e graves do Hospital Estadual Dr. Jayme Santos Neves. TAP = Tempo de Protrombina, INR = Razão Normalizada Internacional, PTTK = Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. Teste de Mann-Whitney.

	MODERADO	GRAVE	p	VALORES DE REFERÊNCIA
DHL	446,2 ± 43,15 (n = 29)	749,2 ± 66,48 (n = 21)	0,0002***	110,00 ~ 248,00
FERRITINA	1.284 ± 337,8 (n = 11)	1.897 ± 453,6 (n = 14)	0,4668	~
BILIRRUBINA TOTAL	0,45 ± 0,04 (n = 29)	0,58 ± 0,08 (n = 20)	0,3249	~
BILIRRUBINA DIRETA	0,087 ± 0,01 (n = 23)	0,18 ± 0,03 (n = 19)	< 0,05*	~

BILIRRUBINA INDIRETA	0,33 ± 0,02 (n = 30)	0,34 ± 0,031 (n = 19)	0,7720	~
TAP	16,48 ± 0,72 (n = 12)	15,14 ± 0,30 (n = 12)	0,0773	12,00 ~ 14,00
TAP – INR	1,15 ± 0,03 (n = 12)	1,28 ± 0,07 (n = 12)	0,1438	1,00 ~ 1,2
TROPONINA I	0,05 ± 0,02 (n = 4)	4,33 ± 3,49 (n = 4)	0,3143	> 0,04
PROTEÍNA C REATIVA	95,34 ± 11,73 (n = 32)	162,6 ± 21,29 (n = 20)	0,0083**	~
DÍMERO D	1,22 ± 0,26 (n = 9)	10,08 ± 3,43 (n = 8)	0,0927	~
UREIA	53,97 ± 5,54 (n = 32)	85,80 ± 10,60 (n = 25)	0,0077**	17,00 ~ 43,00
CREATININA	0,86 ± 0,07 (n = 31)	2,43 ± 0,42 (n = 26)	< 0,05*	0,66 ~ 1,09
TRIGLICERÍDEOS	234,2 ± 48,86 (n = 10)	192,9 ± 27,36 (n = 15)	0,8488	0,10 ~ 175,00
PTTK – TEMPO	34,99 ± 1,68 (n = 8)	38,01 ± 1,45 (n = 10)	0,1395	22,00 ~ 40,00

Os dados de gasometria avaliam equilíbrio ácido-base demonstrando o estado do sistema cardiorrespiratório e são muito importantes para monitorar os pacientes internados por COVID-19. As performances pulmonar e metabólica do grupo grave parecem estar mais prejudicadas com a diminuição do pH e aumento da Pressão Parcial de Gás Carbônico (PCO₂), inclusive em relação aos valores de referência desses analitos (**TABELA 5, linhas 1 e 3**). A saturação de ambos os grupos estava ligeiramente diminuída em relação aos valores de referência para esse analito (**TABELA 5, linha 6**).

TABELA 5. Gasometria arterial dos pacientes moderados e graves do Hospital Estadual Dr. Jayme Santos Neves. PO₂ = Pressão Parcial de Oxigênio. Teste de Mann-Whitney.

MODERADO	GRAVE	<i>p</i>	VALORES DE REFERÊNCIA
----------	-------	----------	-----------------------

pH	7,38 ± 0,02 (n = 33)	7,29 ± 0,02 (n = 26)	0,0002***	7,35 ~ 7,45
PO₂	86,85 ± 4,69 (n = 33)	94,08 ± 5,39 (n = 26)	0,2495	83,00 ~ 108,00
PCO₂	42,03 ± 0,92 (n = 32)	55,82 ± 2,97 (n = 26)	< 0,0001****	35,00 ~ 45,00
BICARBONATO	23,82 ± 0,42 (n = 32)	25,08 ± 0,78 (n = 25)	0,5255	21,00 ~ 28,00
BASE	-0,56 ± 0,57 (n = 33)	-1,72 ± 1,08 (n = 26)	0,1816	-3,00 ~ 3,00
SATURAÇÃO	94,48 ± 0,73 (n = 34)	95,06 ± 0,58 (n = 25)	0,9363	96,00 ~ 110,00

4.3.3 – IMUNOGLOBULINAS

Para avaliar a titulação das classes de anticorpos envolvidos na COVID-19, IgM e IgG foram mensurados nos tempos D15, D30, D45, D60, D90/120 e D180 após a infecção por SARS-CoV-2 (**FIGURA 3A e B**).

O teste da marca Abbot para IgG que utilizou amostras coletadas no D15 apresentou uma média de $1,51 \pm 0,35$ (n = 18), D30 $2,39 \pm 0,48$ (n = 18), D45 $1,65 \pm 0,30$ (n = 18), D60 $1,63 \pm 0,31$ (n = 18), D90/120 $1,13 \pm 0,22$ (n = 18) e D180 $0,35 \pm 0,08$ (n = 18) (**FIGURA 3A**). Enquanto o IgM apresentou valores médios para D15 $2,59 \pm 0,67$ (n = 15), D30 $1,66 \pm 0,36$ (n = 15), D45 $1,16 \pm 0,25$ (n = 15), D60 $0,94 \pm 0,23$ (n = 15), D90/120 $0,67 \pm 0,19$ (n = 15) e D180 $0,46 \pm 0,11$ (n = 15) (**FIGURA 3B**). Houve, portanto, uma diminuição dos níveis de IgG e IgM conforme passaram os dias, as diferenças estatísticas estão representadas na **FIGURA 3A e B**.

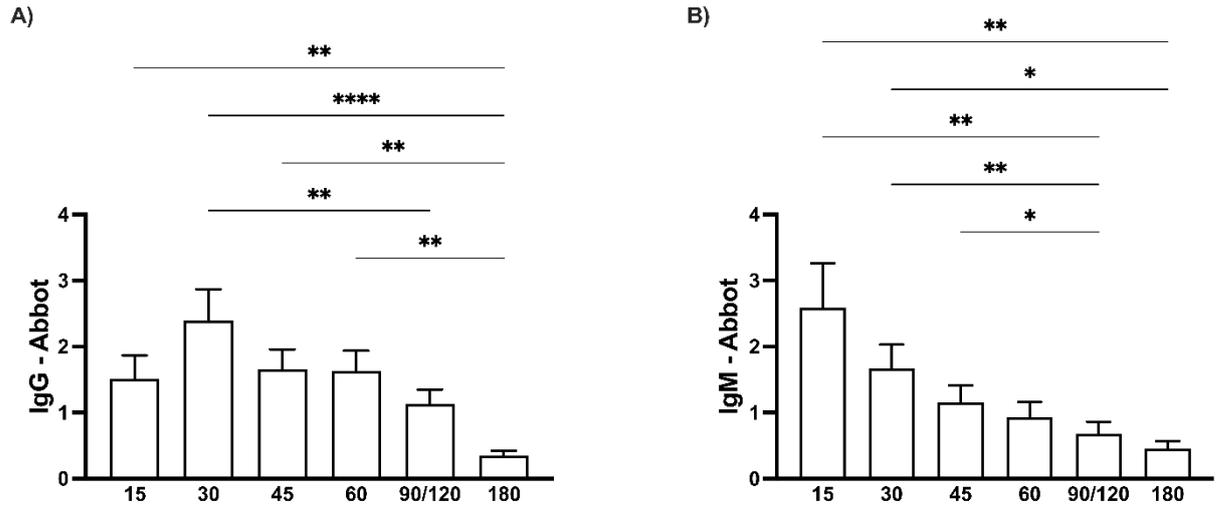


FIGURA 3. Níveis de **A)** IgG e **B)** IgM marca Abbot dos pacientes oligossintomáticos do HUCAM nos tempos D15, D30, D45, D60, D90/D120 e D180. Teste de Friedman, post-hoc de FDR Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, **** $p < 0,0001$.

4.4 – ESCOLHA DA AMOSTRA PARA EXPERIMENTOS DE CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

Dos 108 pacientes arrolados na pesquisa, foram escolhidos 36 indivíduos divididos nos grupos oligo, moderado e grave ($n = 12$, cada). Foram equiparados por idade e tempo de infecção viral (>10 dias de sintomas). A **TABELA 6** resume os dados de identificação (ID), idade (anos), sexo biológico e origem hospitalar dos pacientes dos grupos oligo, moderado e grave escolhidos para as análises de citometria de fluxo *ex vivo*.

TABELA 6. Dados clínicos dos pacientes dos grupos oligo, moderado e grave ($n = 12$, cada) para as análises de citometria. † = veio a óbito.

PACIENTES	ID	IDADE (ANOS)	SEXO	HOSPITAL	PACIENTES	ID	IDADE (ANOS)	SEXO	HOSPITAL	PACIENTES	ID	IDADE (ANOS)	SEXO	HOSPITAL
	OLIGO1	32	F	HUCAM		MOD1	54	M	DÓRIO		GRAVE1	47	F	JAYME
	OLIGO2	30	F	HUCAM		MOD2	47	M	JAYME		GRAVE2†	42	M	JAYME
	OLIGO3	53	F	HUCAM		MOD3†	63	M	JAYME		GRAVE3†	47	M	JAYME
	OLIGO4	37	M	HUCAM		MOD4	57	M	DÓRIO		GRAVE4†	44	F	JAYME
	OLIGO5	51	M	HUCAM		MOD5	41	M	JAYME		GRAVE5	59	M	JAYME
OLIGO	OLIGO6	26	M	HUCAM	MODERADO	MOD6	63	M	JAYME	GRAVE	GRAVE6†	47	M	JAYME
	OLIGO7	53	M	HUCAM		MOD7	48	M	JAYME		GRAVE7	44	M	JAYME
	OLIGO8	41	F	HUCAM		MOD8	47	F	DÓRIO		GRAVE8†	59	F	JAYME
	OLIGO9	43	F	HUCAM		MOD9	49	M	JAYME		GRAVE9	41	M	JAYME
	OLIGO10	49	F	HUCAM		MOD10	48	M	DÓRIO		GRAVE10†	42	F	JAYME
	OLIGO11	48	M	HUCAM		MOD11	43	F	DÓRIO		GRAVE11	44	M	JAYME
	OLIGO12	38	F	HUCAM		MOD12	45	M	JAYME		GRAVE12†	48	M	JAYME
		41,75 ± 2,68					50,42 ± 2,10					47 ± 1,75		

4.4.1 – DIMINUIÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS NOS GRUPOS MODERADO E GRAVE

A primeira análise foi a comparação da viabilidade celular de linfócitos totais entre os grupos oligo, moderado e grave. Destacou-se uma diminuição de frequência de células viáveis nos grupos moderado e grave (< 90%) em relação ao grupo oligo (**FIGURAS 4A e B**). Não foi observado diferenças entre o grupo moderado e severo (**FIGURA 4A**).

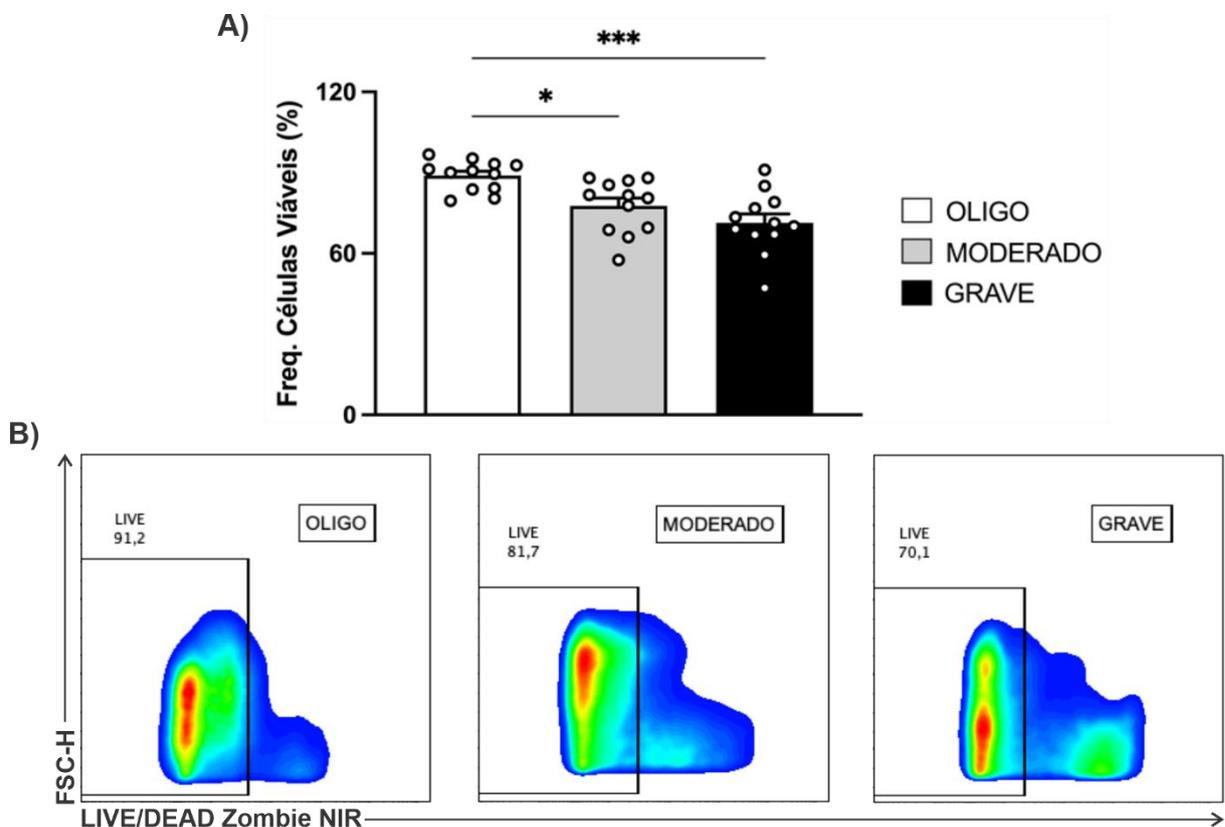


FIGURA 4. Comparação das frequências de células viáveis entre os grupos oligo, moderado e grave. **A)** Frequência em porcentagem nos três grupos (n = 12, cada). Teste de Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg, * $p < 0,05$, *** $p < 0,0005$. **B)** Estratégia de análise de células viáveis dos três grupos.

4.4.2 – CÉLULAS T DOS GRUPOS OLIGO, MODERADO E GRAVE

A frequência e proporção de células T são indicadores de fenótipo senescente, dessa forma foram analisadas as frequências dessas células entre os

três grupos. A análise das frequências de células T CD3+ não demonstrou diferença entre eles (**FIGURA 5A**). Enquanto a frequência de células T CD4+ do grupo moderado foi maior em relação aos grupos oligo e grave (**FIGURAS 5A e B**). Já a frequência de células T CD8+ foi menor no grupo moderado em relação ao oligo (**FIGURAS 5A e C**).

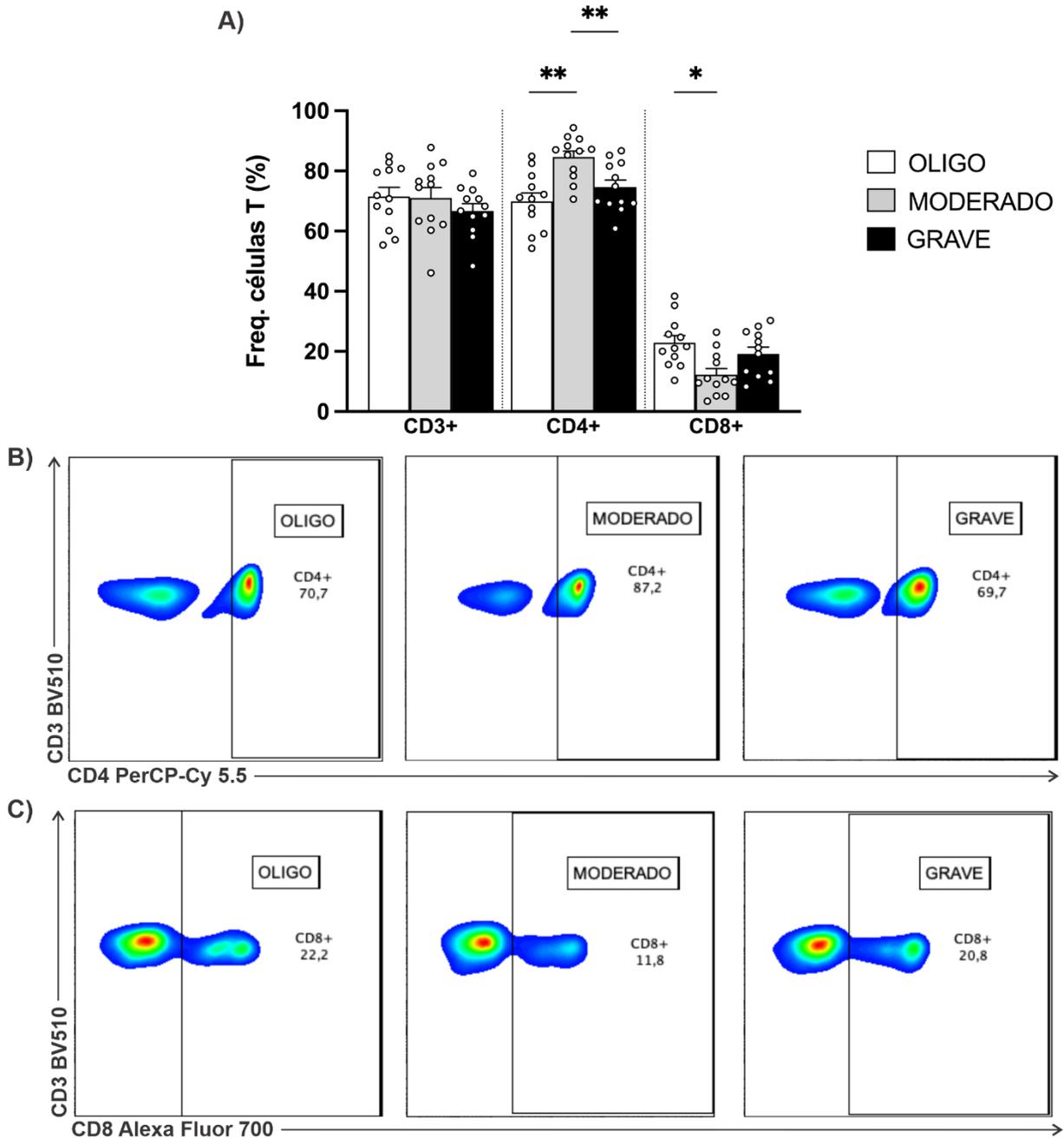


FIGURA 5. A) Gráfico das frequências totais das células T CD3+, T CD4+ e T CD8+ dos grupos oligo, moderado e grave (n = 12, cada). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg, * $p <$

0,05, ** $p < 0,0098$. Estratégia de análise e comparação das frequências de células **B)** T CD4+ e **C)** T CD8+ nos três grupos.

4.4.3 – RECEPTORES DE IMUNOSSENESCÊNCIA CD57 E KLRG1 EM CÉLULAS T

Posteriormente foram realizadas as análises do perfil de senescência em células T. Para tanto, utilizamos os marcadores CD57 e KLRG1 que são altamente expressos em células terminalmente diferenciadas. Os resultados demonstram que não houve diferença de frequência e MFI de células T CD4+ CD57+ nos grupos oligo, moderado e grave (**FIGURAS 6B e C**), assim como não houve diferença de frequência e MFI de células T CD4+ KLRG1+ nos três grupos (**FIGURAS 7B e C**).

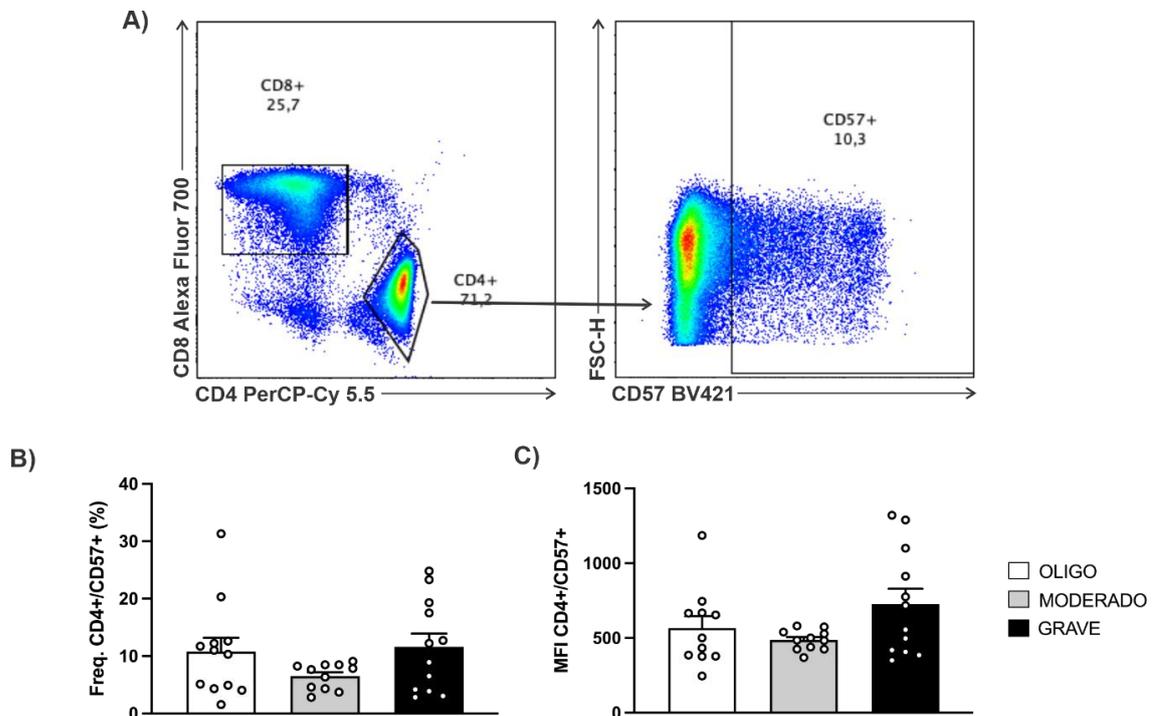


FIGURA 6. A) Estratégia de análise de células T CD4+ CD57+. **B)** Gráfico das frequências de células T CD4+ CD57+ nos grupos oligo (n = 12), moderado (n = 11) e grave (n = 12) e **C)** gráfico do MFI das células T CD4+ CD57+ nos grupos oligo (n = 11), moderado (n = 11) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg.

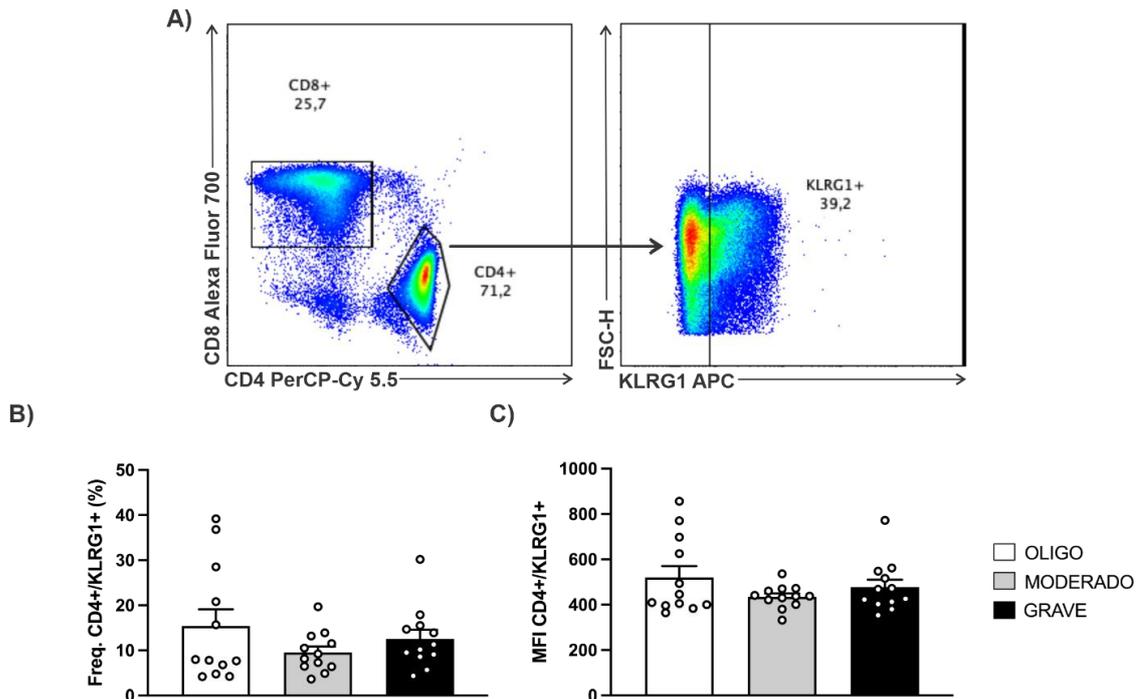


FIGURA 7. A) Estratégia de análise de células T CD4+ KLRG1+. **B)** Gráfico da frequência de células T CD4+ KLRG1+ nos grupos oligo, moderado e grave (n = 12, cada) e **C)** gráfico do MFI das células T CD4+ KLRG1+ nos três grupos (n = 12, cada). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg.

Da mesma forma que também não houve diferença de frequência e MFI de células T CD8+ CD57+ nos três grupos (**FIGURAS 8B e C**), assim como também não houve diferença de frequência e MFI de células T CD8+ KLRG1+ nos três grupos (**FIGURAS 9B e C**).

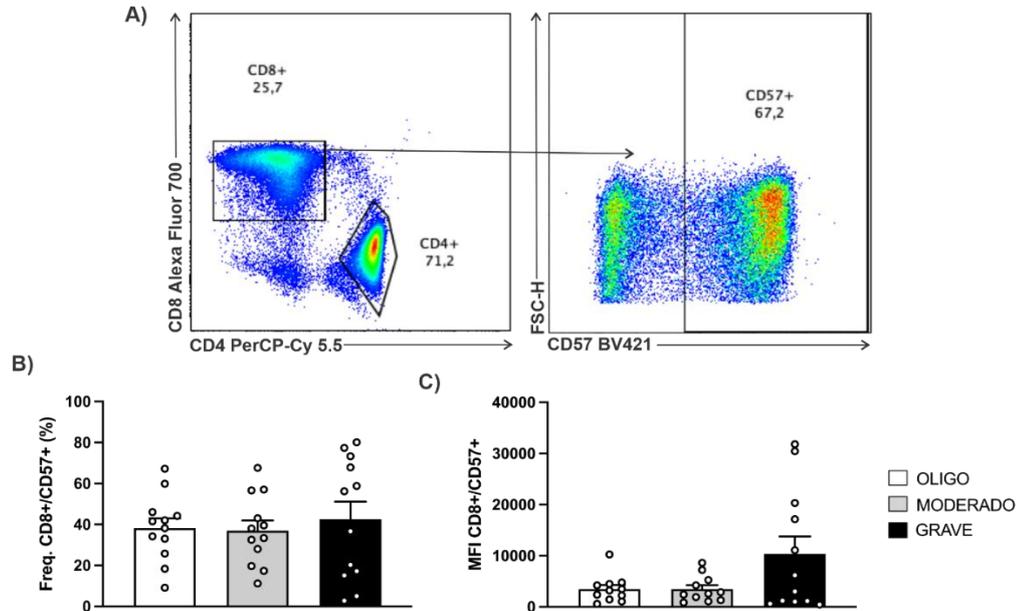


FIGURA 8. A) Estratégia de análise de células T CD8+ CD57+. **B)** Gráfico da frequência de células T CD8+ CD57+ nos três grupos (n = 12, cada) e **C)** gráfico do MFI das células T CD8+ CD57+ nos grupos oligo (n = 11), moderado (n = 11) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg.

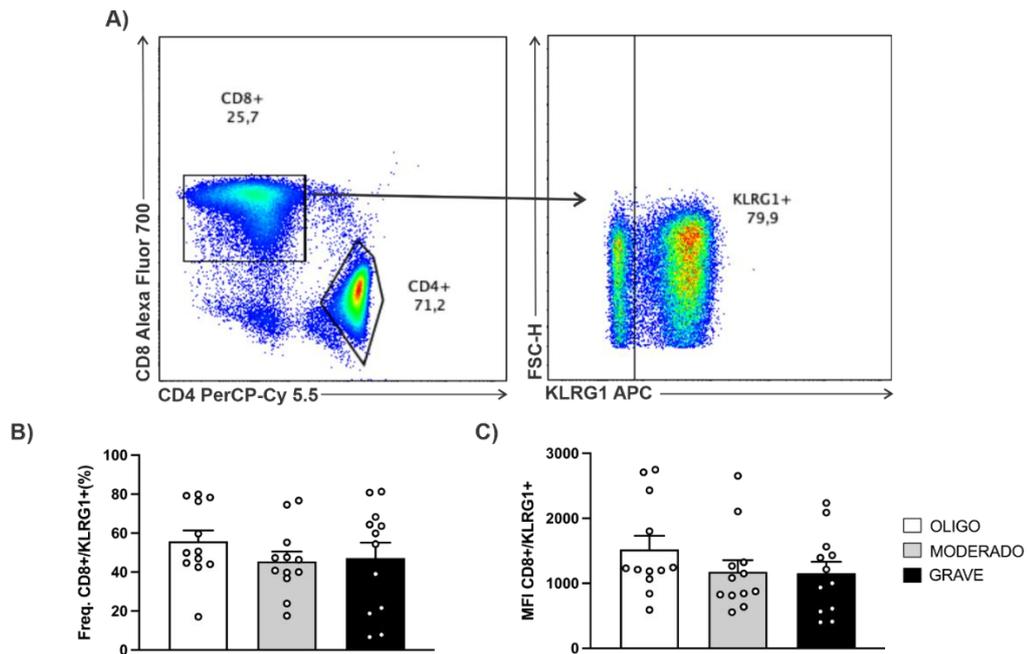


FIGURA 9. A) Estratégia de análise de células T CD8+ KLRG1+. **B)** Gráfico da frequência de células T CD8+ KLRG1+ nos grupos oligo, moderado e grave (n = 12, cada) e **C)** gráfico do MFI das células T CD8+ KLRG1+ nos três grupos (n = 12, cada). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg.

4.4.4 – AVALIAÇÃO DE DANOS NO DNA E EXPRESSÃO DE P38 EM CÉLULAS T

A expressão da p38 MAPK, bem como o acúmulo de dano no DNA tem sido explorado como marcadores de características de imunossenescência (FREUND; PATIL; CAMPISI, 2011; RODIER et al., 2011). Deste modo, nossas análises demonstram um aumento da frequência de T CD4+ γ H2Ax+ no grupo moderado em relação ao grupo oligo, no grupo grave em relação ao oligo e ao moderado (**FIGURAS 10A e B**). Enquanto o MFI de células T CD4+ γ H2Ax+ estava aumentado no grupo grave em relação ao oligo e moderado (**FIGURAS 10C e D**), mas não houve diferença entre os grupos oligo e moderado (**FIGURA 10C**). Evidenciado então que no grupo grave houve um maior aumento da expressão de γ H2Ax, ou seja, uma maior expressão de danos ao DNA em células T CD4+.

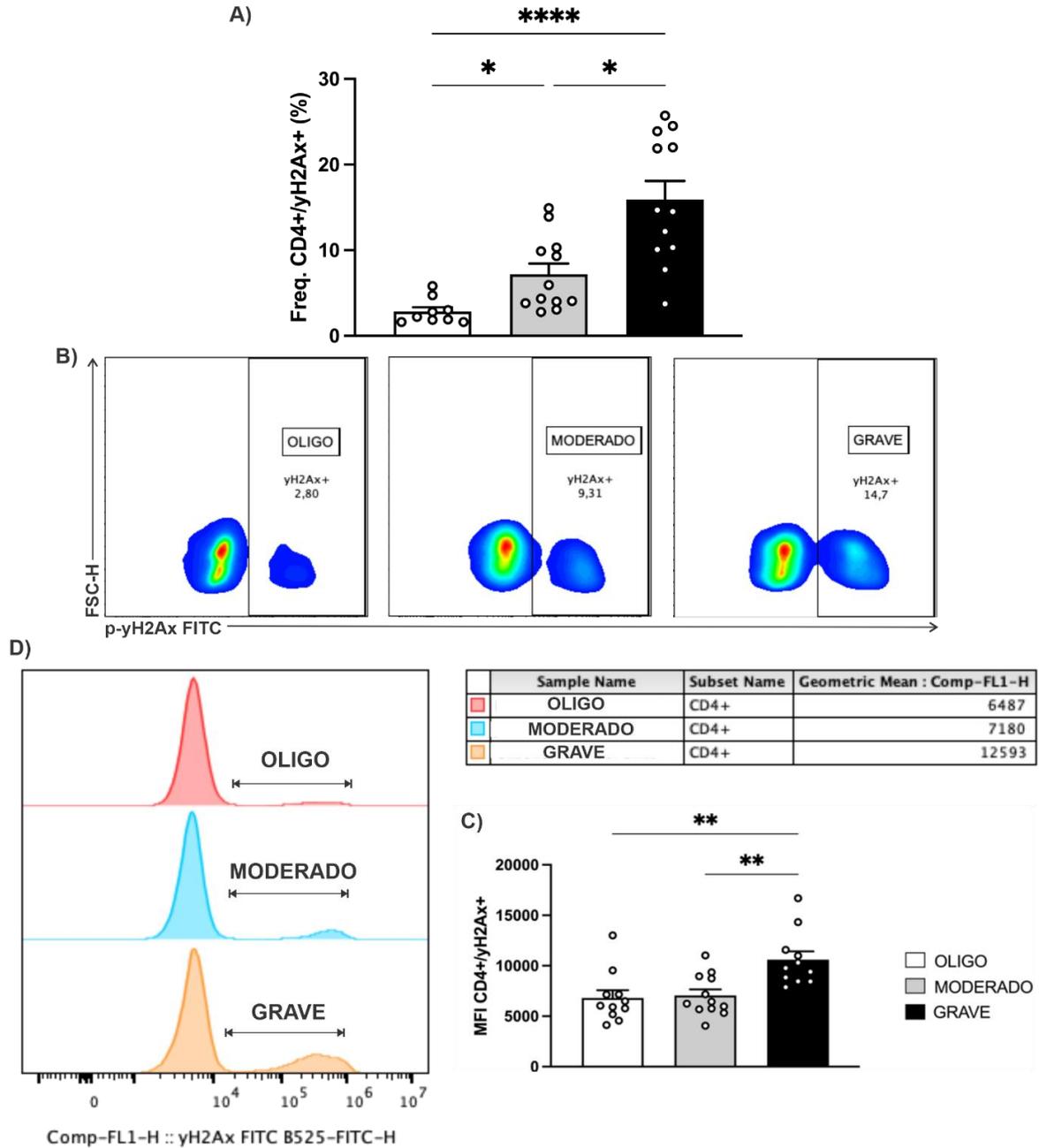


FIGURA 10. A) Gráfico das frequências de células T CD4+ γ H2Ax+ nos grupos oligo ($n = 9$), moderado ($n = 12$) e grave ($n = 12$). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$. **B)** Estratégia de análise para células T CD4+ γ H2Ax nos três grupos. **C)** Gráfico do MFI de células T CD4+ γ H2Ax+ dos grupos oligo ($n = 11$), moderado ($n = 12$) e grave ($n = 11$). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. ** $p = 0,0053$ e $0,0062$. **D)** Comparação do MFI de células T CD4+ γ H2Ax+ nos três grupos.

Em relação ao p38 em células T CD4+ totais, houve aumento das frequências de T CD4+ p-p38+ nos grupos moderado e grave em relação ao grupo oligo (**FIGURAS 11A e C**). Não houve diferença de frequência de p38 entre os grupos

moderado e grave (**FIGURA 11A**). Quanto ao MFI, não se observou diferença nas células T CD4+ p-p38+ entre os três grupos (**FIGURA 11B**).

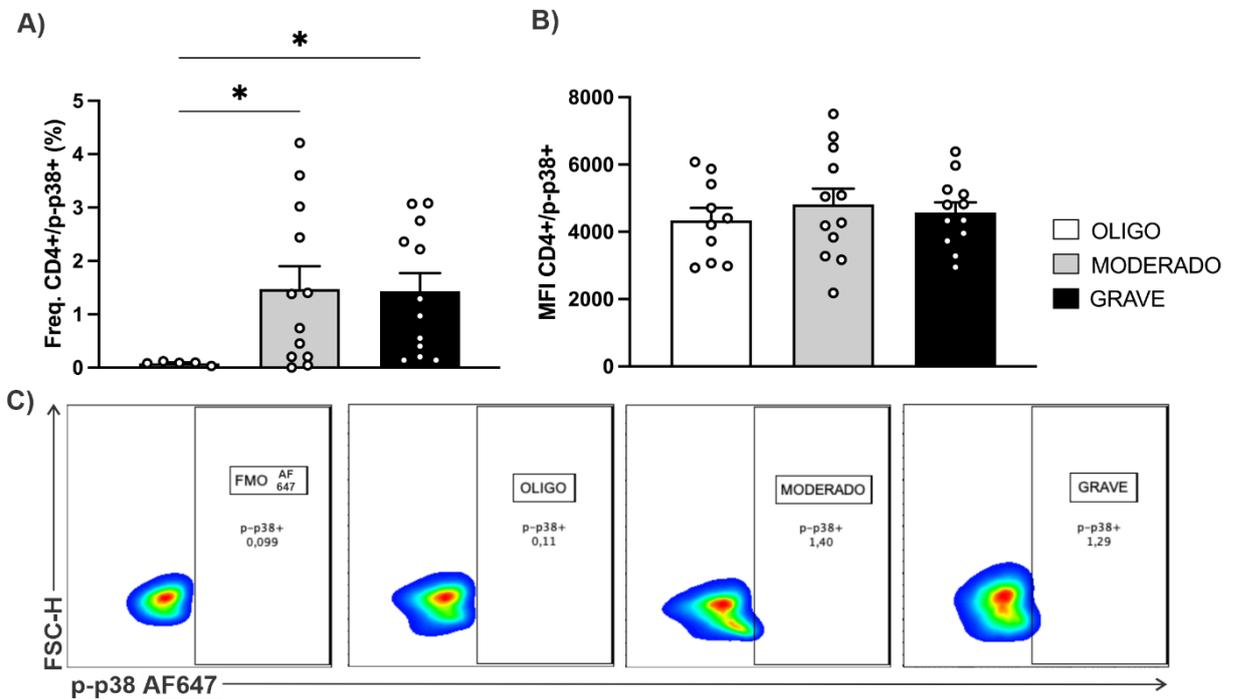


FIGURA 11. A) Gráfico das frequências de células T CD4+ p-p38+ dos grupos oligo (n = 5), moderado (n = 12) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$. **B)** Gráfico do MFI de células T CD4+ p-p38+ dos grupos oligo (n = 10), moderado (n = 12) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. **C)** Estratégia de análise de células T CD4+ p-p38+ em relação ao FMO de Alexa Fluor 647 (AF647) dos três grupos.

Em relação as células T CD8+, observou-se um aumento da frequência de T CD8+ γ H2Ax+ nos grupos moderado e grave em relação ao oligo (**FIGURAS 12A e B**). Não houve diferença na frequência de T CD8+ γ H2Ax+ entre os grupos moderado e grave (**FIGURA 12A**). Já o MFI de células T CD8+ γ H2Ax+ estava aumentado no grupo moderado e grave em relação ao oligo (**FIGURAS 12C e D**), mas não houve diferença entre os grupos moderado e grave (**FIGURA 12C**). Dessa forma, também houve aumento de danos ao DNA em células T CD8+ de pacientes com a forma mais grave da COVID-19.

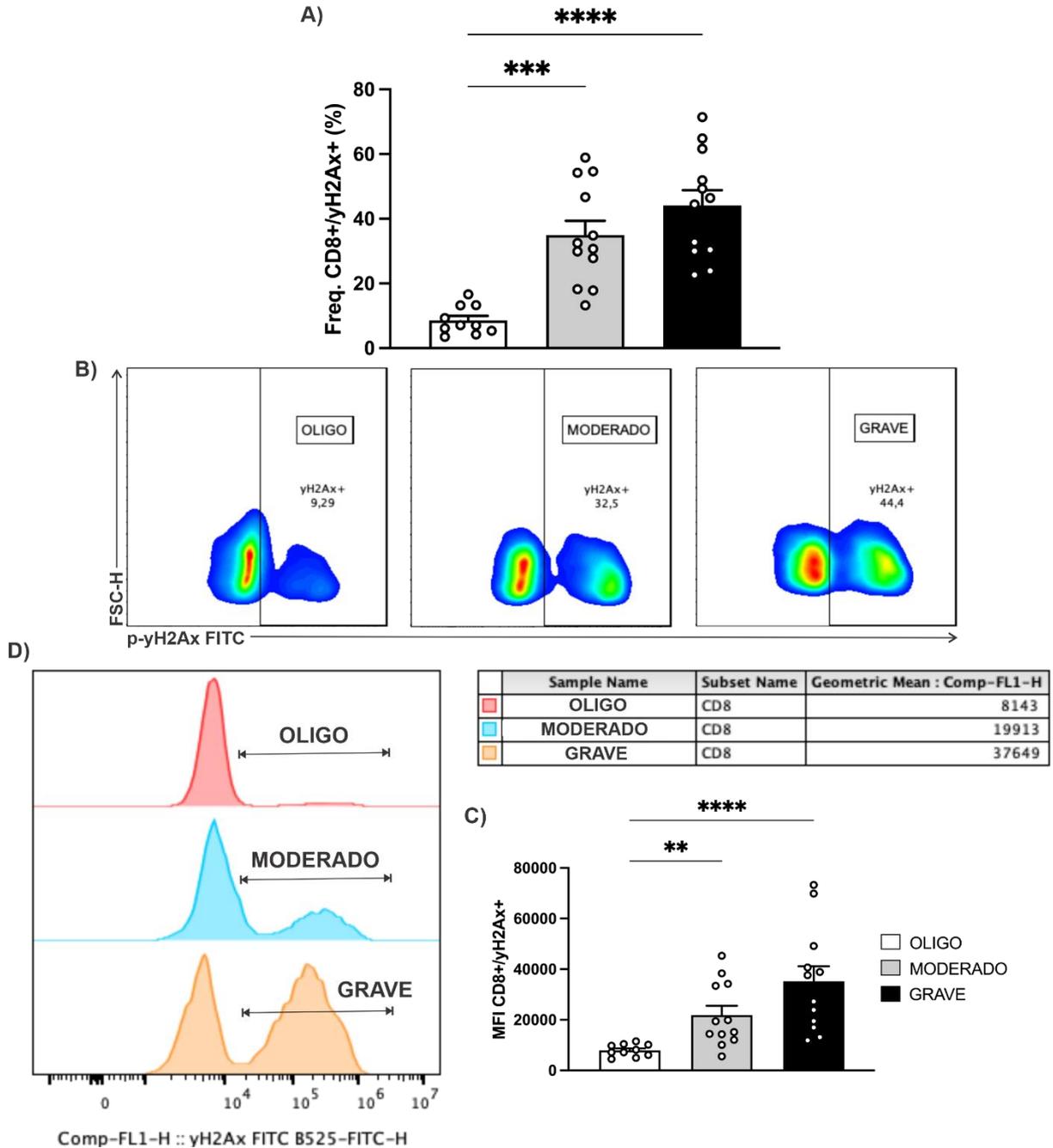


FIGURA 12. A) Gráfico das frequências de células T CD8+ γH2Ax+ dos grupos oligo (n = 10), moderado (n = 12) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. *** $p = 0,0008$, **** $p < 0,0001$. **B)** Estratégia de análise das frequências de células T CD8+ γH2Ax+ nos três grupos. **C)** Gráfico do MFI de células T CD8+ γH2Ax+ dos grupos oligo (n = 10), moderado (n = 12) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. ** $p = 0,0051$, **** $p < 0,0001$. **D)** Comparação dos MFI de células T CD8+ γH2Ax+ dos três grupos.

Em relação ao p38 em células T CD8+ totais, não foram observadas diferenças entre frequências de T CD8+ p-p38+ nos grupos oligo, moderado e grave

(FIGURA 13A). Quanto ao MFI, houve um aumento em células T CD4+ p-p38+ no grupo oligo em relação ao grupo grave (FIGURA 13B e C).

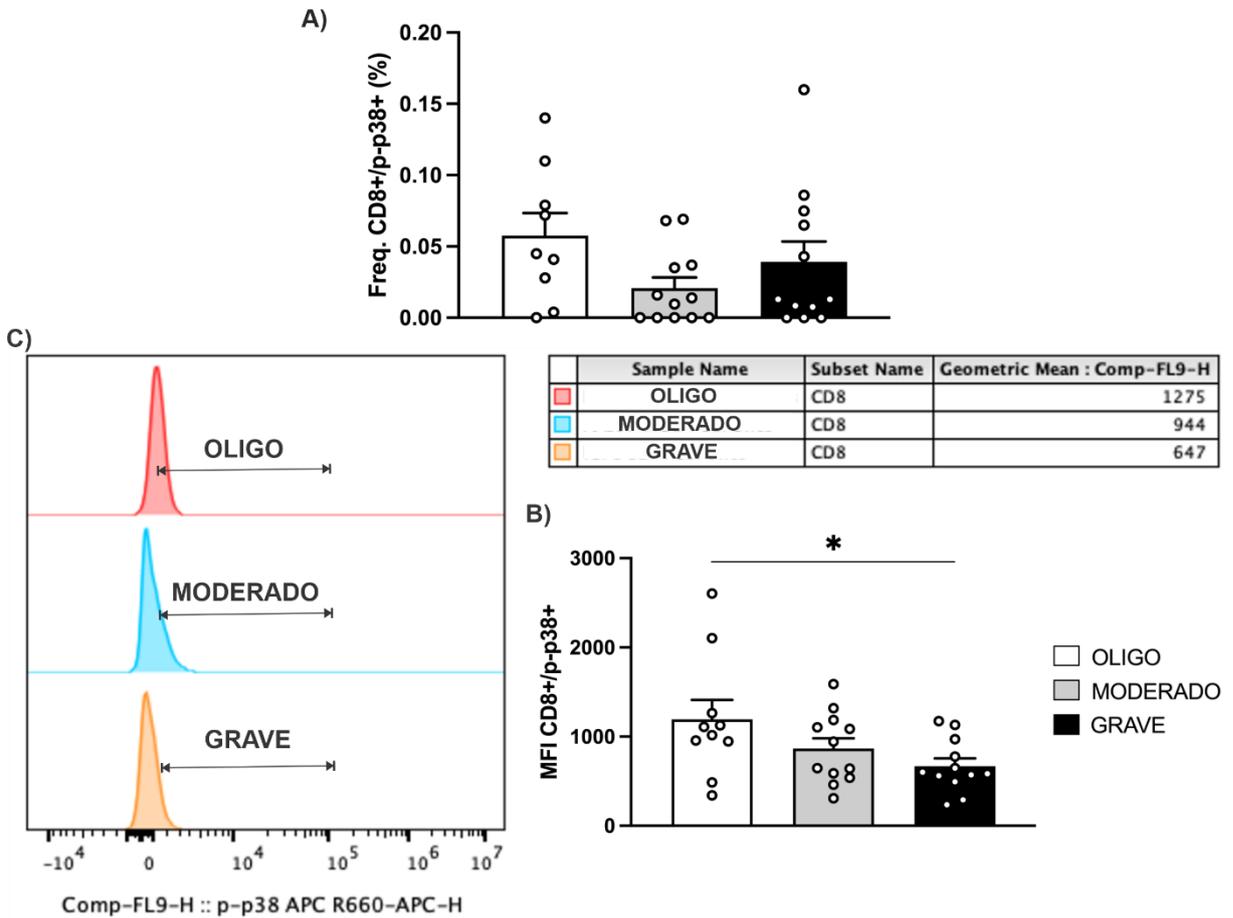


FIGURA 13. A) Gráfico das frequências de células T CD8+ p-p38+ dos grupos oligo (n = 9), moderado (n = 12) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. **B)** Gráfico do MFI de células T CD8+ p-p38+ dos grupos oligo (n = 10), moderado (n = 12) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$. **C)** Comparação do MFI de células T CD8+ p-p38+ nos três grupos.

4.4.5 – ANÁLISE DO PERFIL DE DIFERENCIAÇÃO DOS COMPARTIMENTOS DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA NOS DIFERENTES GRUPOS COM COVID-19

Para avaliação do perfil de diferenciação das populações das células T de memória, realizou-se a marcação utilizando CD45RA (BV605) e CD27 (PE-Cy7), que permite identificar as populações conforme demonstrado na FIGURA 14. Deste modo, foram classificados como naïve (NAIVE CD45RA+CD27+), memória central (CM CD45RA-CD27+), memória efetora (EM (CD45RA-CD27-) e memória efetora

que re-expressa CD45RA (EMRA CD45RA+CD27-). Sendo as EMRA o grupo de células T altamente diferenciadas.

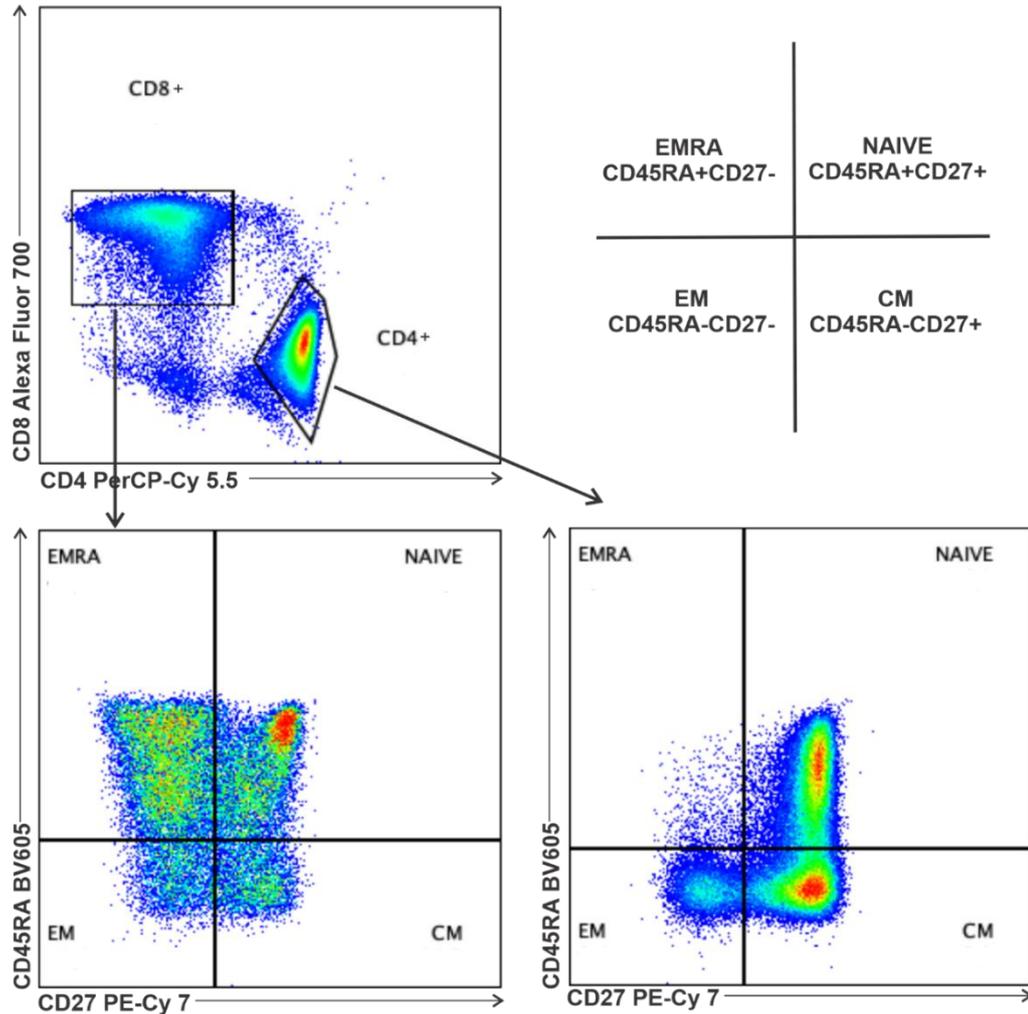


FIGURA 14. Estratégia de análise para determinação das populações de memória NAIVE, CM, EM e EMRA de células T CD4+ e T CD8+.

Assim, não houve diferença nas frequências de T CD4+ NAIVE, CM e EM entre os grupos oligo, moderado e grave (**FIGURA 15A**). Houve diminuição das frequências conforme havia a perda do receptor CD27 e a re-expressão do receptor CD45RA de NAIVE, CM, EM até EMRA como observado na **FIGURA 15A**. Já no compartimento das células mais terminalmente diferenciadas destacou-se aumento das frequências de células T CD4+ EMRA no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado (**FIGURAS 15A e B**), mas não houve diferença entre os grupos oligo e moderado (**FIGURA 15A**).

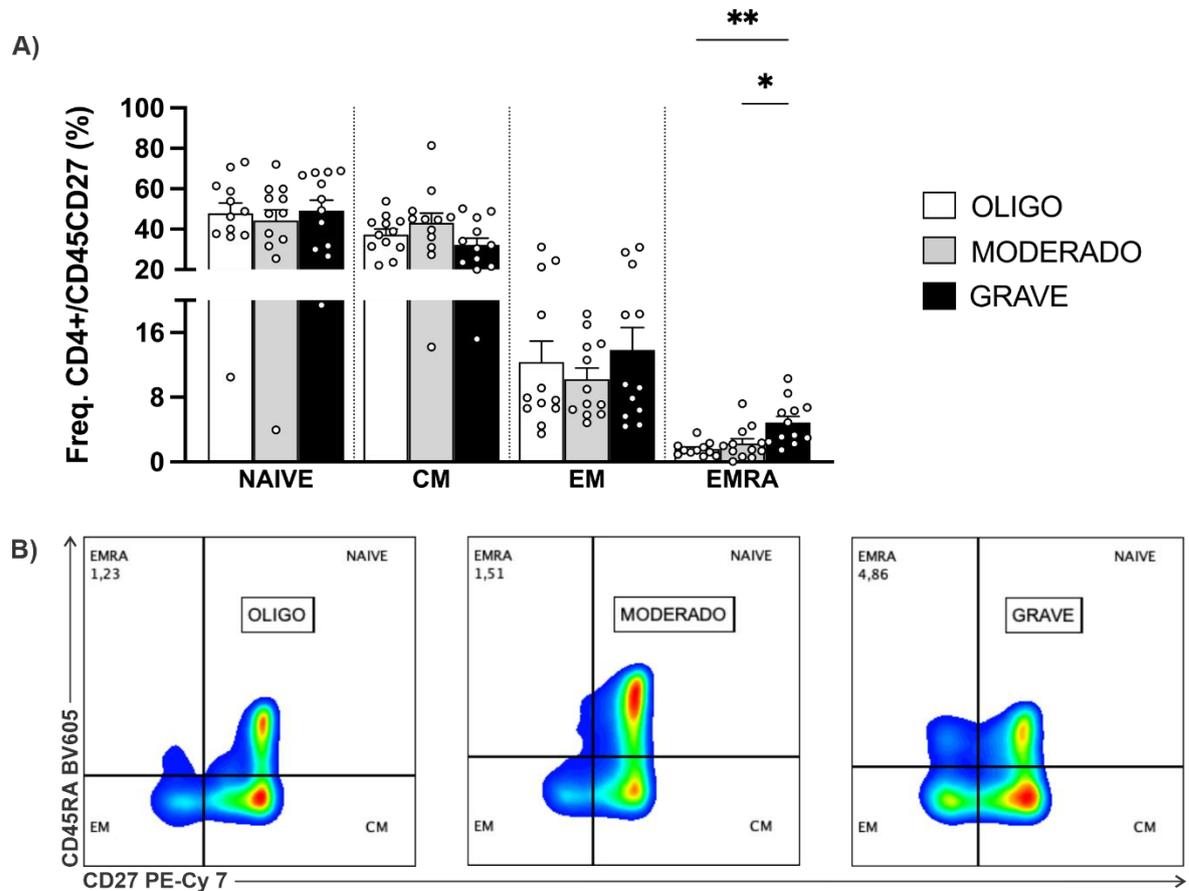


FIGURA 15. A) Gráfico das frequências de T CD4+ NAIVE (n = 12, cada), CM (n = 12, cada), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg, * $p < 0,05$, ** $p = 0,002$. **B)** Comparação das populações de memória, principalmente EMRA, de T CD4+ entre os três grupos.

No subgrupo de células T CD8+ não houve diferença de frequências de T CD8+ NAIVE, EM e EMRA entre os três grupos (**FIGURA 16A**). Todavia, destacou-se uma diminuição da frequência de T CD8+ CM no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado (**FIGURAS 16A e B**), sem diferença entre os grupos oligo e moderado (**FIGURA 16A**).

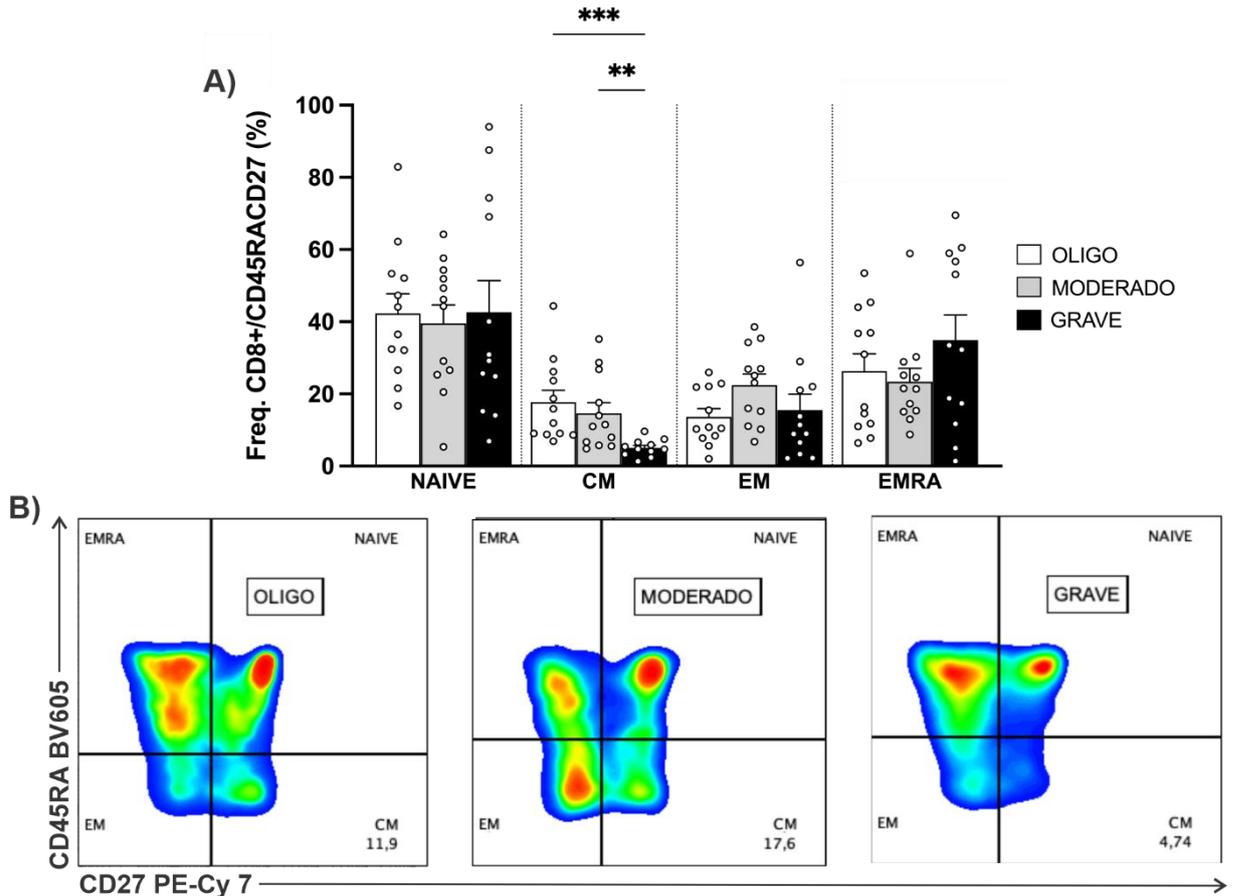


FIGURA 16. A) Gráfico das frequências de T CD8+ NAIVE (n = 12, cada), CM (n = 12 oligo e moderado, n = 11 grave), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 12, cada) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg, ** $p < 0,005$, *** $p = 0,0004$. **B)** Comparação das populações de memória de T CD8+ CM entre os três grupos.

4.4.6 – RECEPTORES CO-ESTIMULADORES CD27 E CD28 EM CÉLULAS T

Em complemento as análises de características de senescência, avaliamos em seguida a expressão dos receptores CD28 e CD27 uma vez que células T senescentes expressam menores frequências (COVRE et al., 2020). Para avaliar as frequências desses receptores co-estimuladores foram feitas análises para definição das populações CD28+CD27+, CD28+CD27-, CD28-CD27+ e CD28-CD27- (**FIGURAS 17A e 18A**).

Dentro do compartimento de células T CD4+ houve uma diminuição das frequências de CD28+CD27+ no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado (**FIGURAS 17B e C**). Houve um aumento das frequências de células T CD4+ CD28-CD27- no grupo grave em relação ao moderado (**FIGURA 17B e C**).

Também se destacou um aumento da frequência da população "transitória" CD28-CD27+ no grupo grave em relação ao grupo moderado (**FIGURAS 17B e C**).

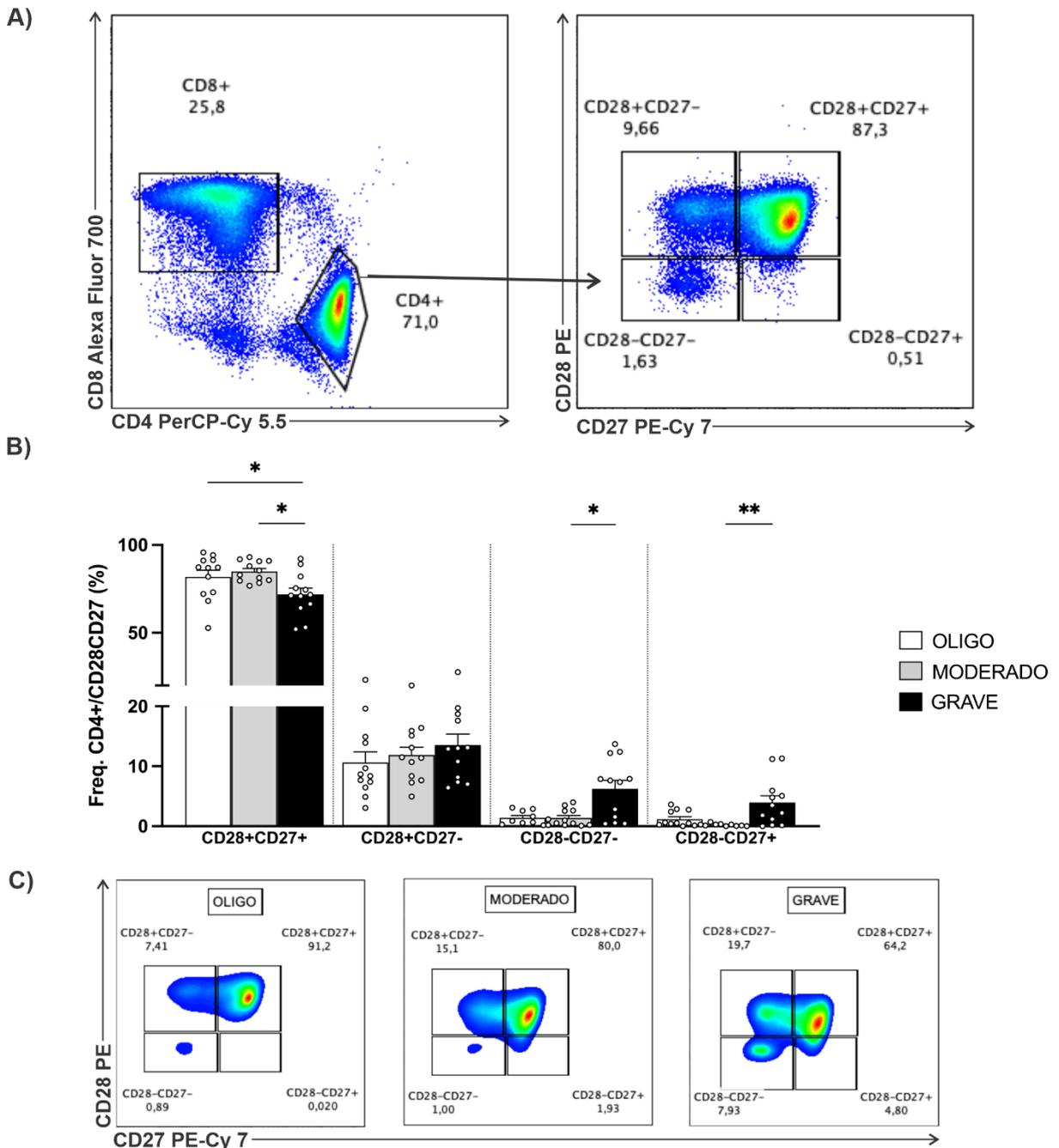


FIGURA 17. Estratégia de análise para **A)** determinação das populações CD28+CD27-, CD28+CD27+, CD28-CD27+, CD28-CD27- dentro da população de células T CD4+. **B)** Gráfico das frequências de T CD4+ CD28+CD27+ (n = 12, cada), CD28+CD27- (n = 12, cada), CD28-CD27- (n = 9 oligo, n = 12 moderado e grave) e CD28-CD27+ (n = 12 oligo e grave, n = 9 moderado) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg, * $p < 0,05$, ** $p = 0,0054$. **C)** Comparação das populações de células T CD4+ CD28+CD27-, CD28+CD27+, CD28-CD27+, CD28-CD27- entre os três grupos.

No compartimento de células T CD8+ não houve diferença entre as frequências de CD28+CD27+, CD28-CD27+ e CD28-CD27- nos três grupos (**FIGURAS 18B e C**). Mas foi observada a população "transitória" CD28+CD27- com diminuição da frequência no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado (**FIGURAS 18B e C**).

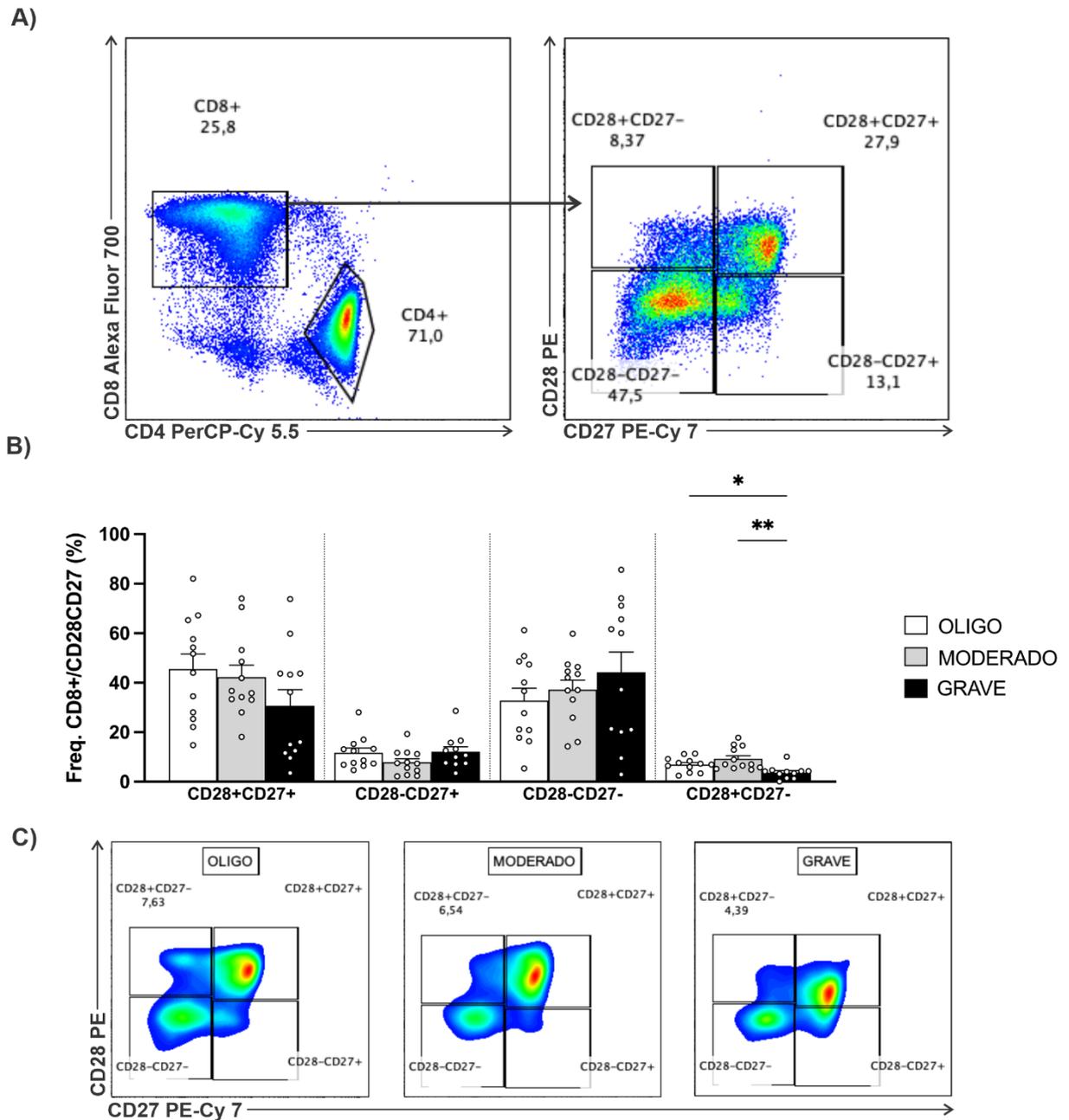


FIGURA 18. Estratégia de análise para **A)** determinação das populações CD28+CD27-, CD28+CD27+, CD28-CD27+, CD28-CD27- dentro da população de células T CD8+. **B)** Gráfico das frequências de T CD8+ CD28+CD27+ (n = 12, cada), CD28-CD27+ (n = 12 oligo e moderado, n = 11

grave), CD28-CD27- (n = 12, cada), CD28+CD27- (n = 12 oligo e moderado, n = 11 grave). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg, * $p < 0,05$, ** $p = 0,0017$. **C)** Comparação das populações de células T CD8+ CD28+CD27-, CD28+CD27+, CD28-CD27+, CD28-CD27- entre os três grupos.

4.4.7 – RECEPTORES DE IMUNOSSENSÊNCIA CD57 E KLRG1 NOS SUBGRUPOS DE CD28CD27 DE CÉLULAS T

Demos seguimento as análises dos receptores ligados a imunossenescência CD57 e KLRG1 nos subgrupos de CD28CD27. Assim não houve diferença nas frequências e MFI de T CD4+ CD28+CD27+ CD57+ entre os três grupos, assim como das populações de células T CD4+ CD28+CD27- CD57+ e células T CD4+ CD28-CD27- CD57+ (**FIGURAS 19B e C**). Mas foram observados um aumento gradual das frequências e MFI de CD57+ conforme havia perda dos receptores CD27 e CD28 (**FIGURAS 19A, B e C**).

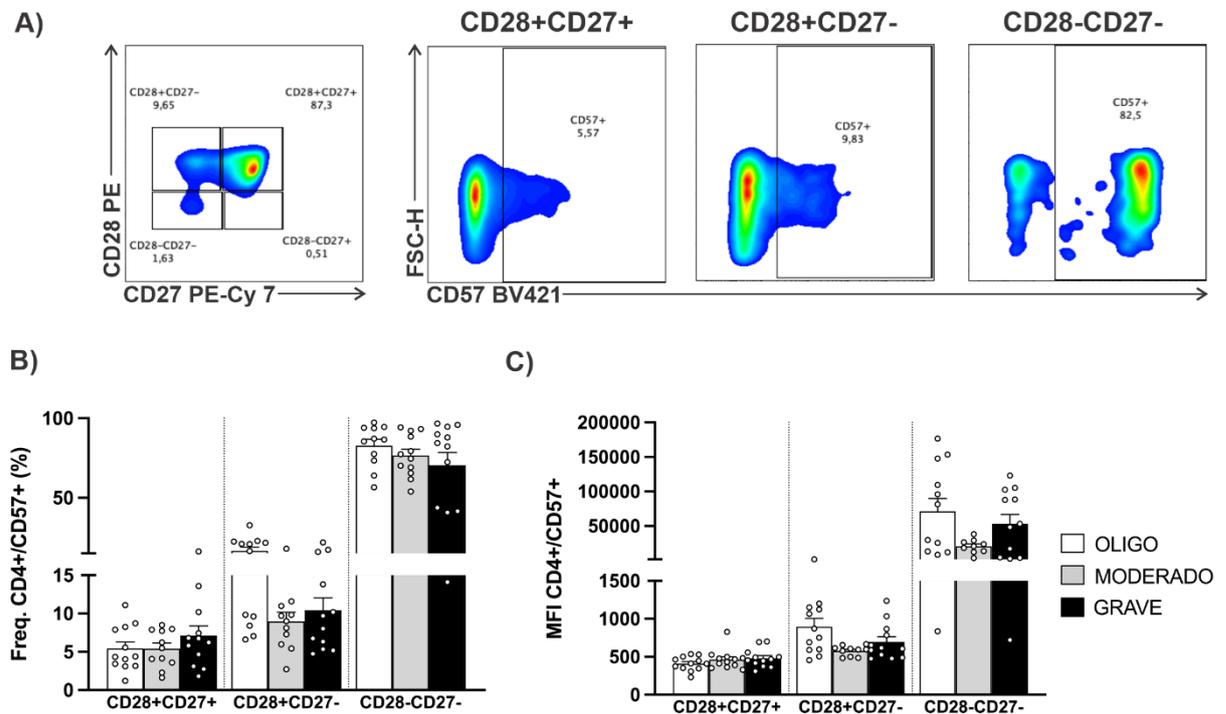


FIGURA 19. Estratégia de análise de **A)** células T CD4+ CD28+CD27+ CD57+, CD28+CD27- CD57+ e CD28-CD27- CD57+. **B)** Gráfico das frequências de células T CD4+ CD28+CD27+ CD57+ (n = 12 oligo e grave, n = 11 moderado), CD28+CD27- CD57+ (n = 12 oligo e grave, n = 11 moderado), CD28-CD27- CD57+ (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. **C)** Gráfico do MFI das células T CD4+ CD28+CD27+ CD57+ (n = 12, cada),

CD28+CD27- CD57+ (n = 12 oligo e grave, n = 10 moderado), CD28-CD27- CD57+ (n = 12 oligo e grave, n = 9 moderado). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg.

As análises não evidenciaram diferenças nas frequências e MFI de T CD4+ CD28+CD27+ KLRG1+ entre os três grupos, assim como das populações de células T CD4+ CD28+CD27- KLRG1+ e células T CD4+ CD28-CD27- KLRG1+ (**FIGURAS 20B e C**). Como anteriormente visto com CD57, também foram observados um aumento gradual das frequências e MFI de KLRG1+ conforme havia perda dos receptores CD27 e CD28 (**FIGURAS 20A, B e C**).

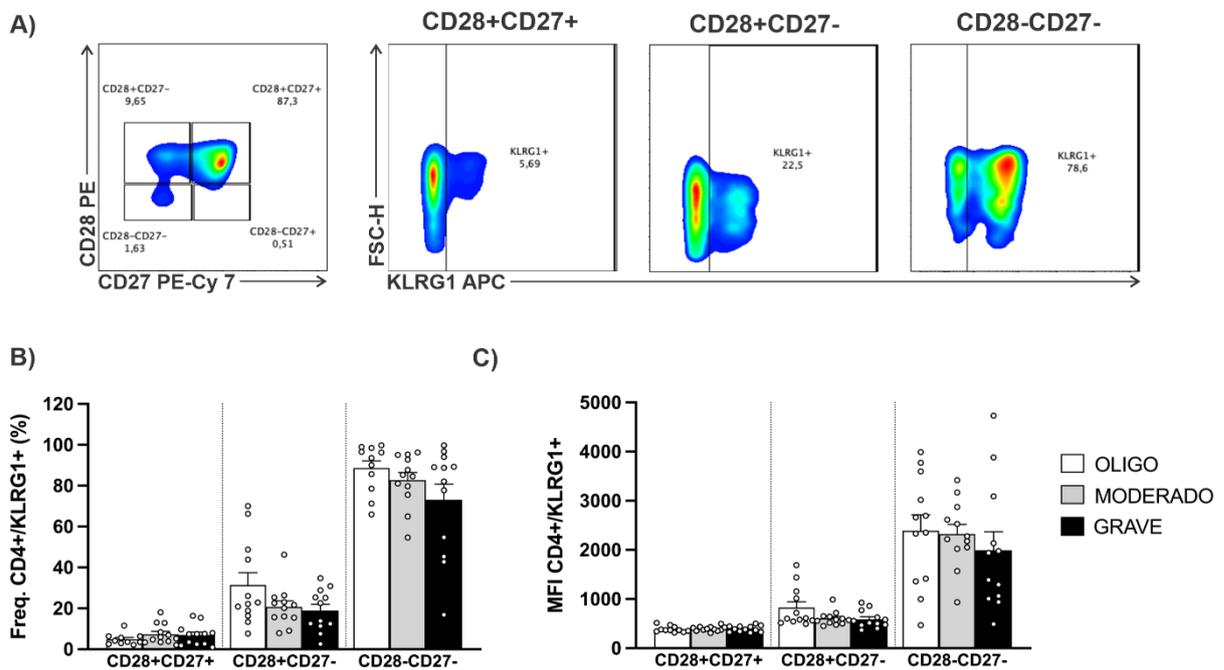


FIGURA 20. Estratégia de análise de **A)** células T CD4+ CD28+CD27+ KLRG1+, CD28+CD27- KLRG1+ e CD28-CD27- KLRG1+. **B)** Gráfico das frequências de células T CD4+ CD28+CD27+ KLRG1+ (n = 10 oligo, n = 12 moderado e grave), CD28+CD27- KLRG1+ (n = 12, cada), CD28-CD27- KLRG1+ (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. **C)** Gráfico do MFI das células T CD4+ CD28+CD27+ KLRG1+ (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave), CD28+CD27- KLRG1+ (n = 12, cada), CD28-CD27- KLRG1+ (n = 12, cada). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg.

Assim como observado nas populações de células T CD4+, não houve diferença nas frequências de T CD8+ CD28+CD27+ CD57+ entre os três grupos, assim como das populações de células T CD8+ CD28+CD27- CD57+ e células T CD8+ CD28-CD27- CD57+ (**FIGURA 21B**). Também foram observados um aumento gradual das frequências de CD57+ conforme havia perda dos receptores CD28 e

CD27 (**FIGURAS 21A e B**). O MFI T CD8+ CD28+CD27- CD57+ houve uma diminuição no grupo grave em relação ao moderado (**FIGURAS 21C e D**), mas não houve diferença entre os dois grupos oligo e moderado (**FIGURA 21C**). Os demais MFI T CD8+ CD28+CD27+ CD57+ e CD28-CD27- CD57+ não apresentaram diferença entre os grupos, mas apresentaram aumento gradual conforme havia perda dos receptores CD28 e CD27 (**FIGURA 21C**).

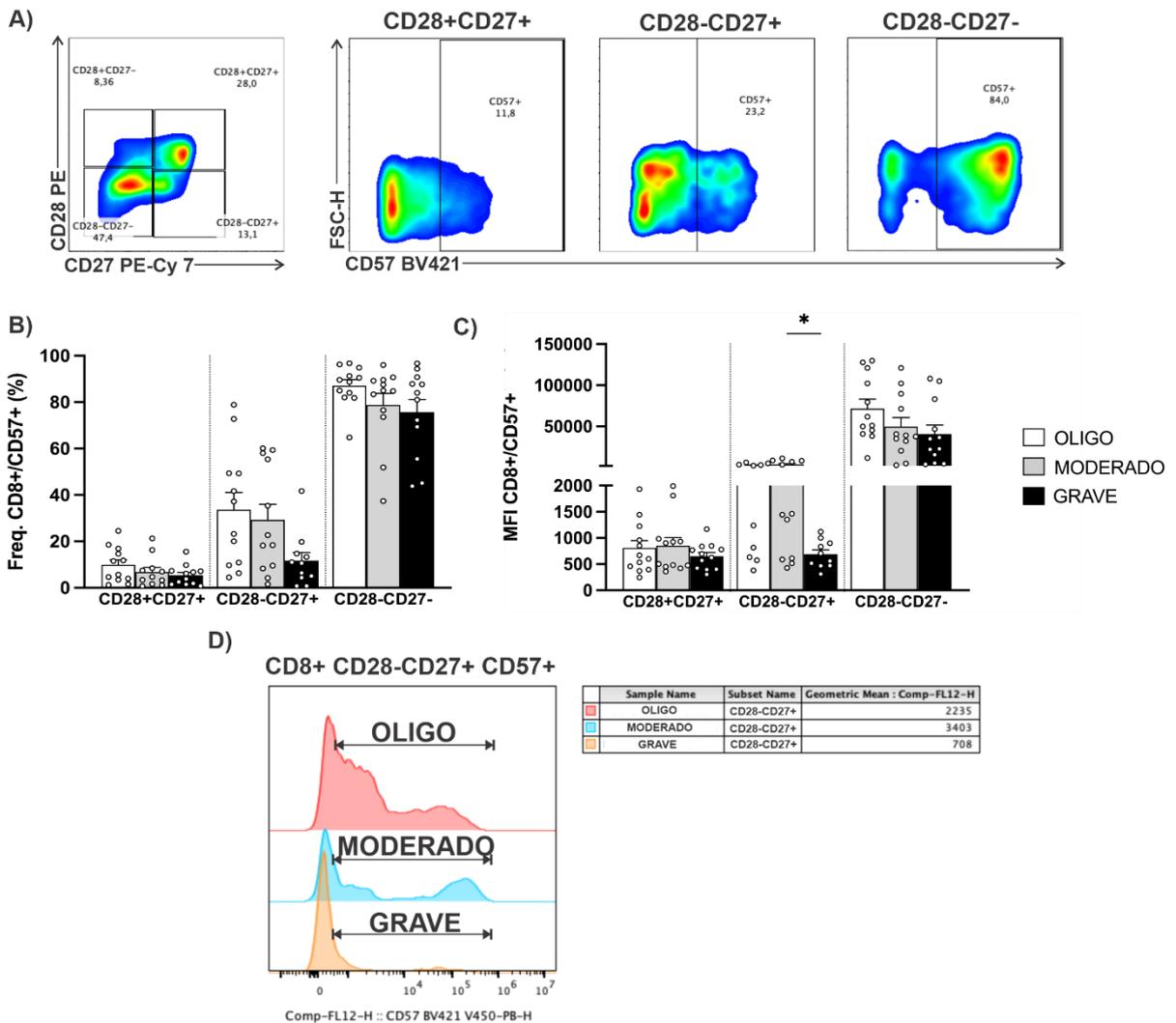


FIGURA 21. Estratégia de análise de **A)** células T CD8+ CD28+CD27+ CD57+, CD28-CD27+ CD57+ e CD28-CD27- CD57+. **B)** Gráfico das frequências de células T CD8+ CD28+CD27+ CD57+ (n = 12 oligo e grave, n = 11 moderado), CD28-CD27+ CD57+ (n = 12 oligo e moderado, n = 11 grave), CD28-CD27- CD57+ (n = 12, cada) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. **C)** Gráfico do MFI das células T CD8+ CD28+CD27+ CD57+ (n = 12, cada), CD28-CD27+ CD57+ (n = 10 oligo e grave, n = 12 moderado), CD28-CD27- CD57+ (n = 12, cada) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* Benjamini e Hochberg, * $p < 0,05$. **D)** Comparação de MFI das células T CD8+ CD28-CD27+ CD57+ nos três grupos.

Com KLRG1 houve diminuição das frequências de células T CD8+ CD28+CD27+ KLRG1+ no grupo grave em relação ao oligo (**FIGURAS 22A e B**). Houve diminuição das frequências de células T CD8+ CD28-CD27+ KLRG1+ no grupo grave em relação ao grupo oligo e moderado (**FIGURAS 22A e C**). Também se destacou uma diminuição das frequências de células T CD8+ CD28-CD27-KLRG1+ no grupo grave em relação ao oligo (**FIGURAS 22A e D**). Os resultados então sugerem que houve um aumento de KLRG1 no grupo oligo nos diferentes subgrupos de CD28CD27 de células T CD8+.

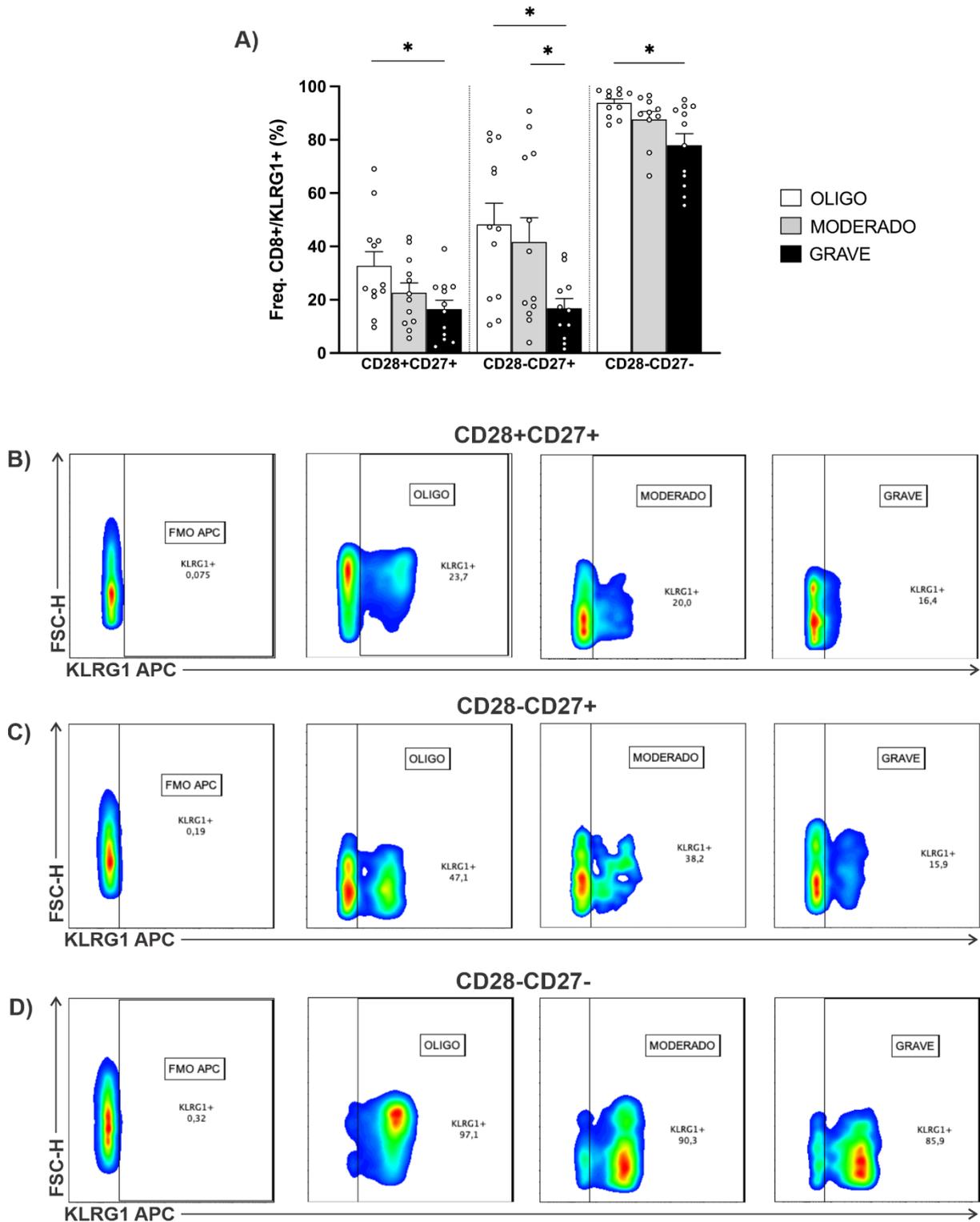


FIGURA 22. A) Gráfico das frequências de células T CD8+ CD28+CD27+ KLRG1+ (n = 12, cada), CD28-CD27+ KLRG1+ (n = 12 oligo e moderado, n = 11 grave), CD28-CD27- KLRG1+ (n = 11 oligo, n = 10 moderado, n = 12 grave) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$. Comparação das frequências de células **B)** T CD8+ CD28+CD27+ KLRG1+; **C)** T CD8+ CD28-CD27+ KLRG1+ e **D)** T CD8+ CD28-CD27- KLRG1+ nos três grupos.

Quanto ao MFI, não houve diferença nas populações de células T CD8+ CD28+CD27+ KLRG1+ e T CD8+ CD28-CD27- KLRG1+ entre os três grupos (**FIGURA 23B**). Entretanto houve uma diminuição do MFI da população de células T CD8+ CD28-CD27+ KLRG1+ no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado (**FIGURAS 23A e B**).

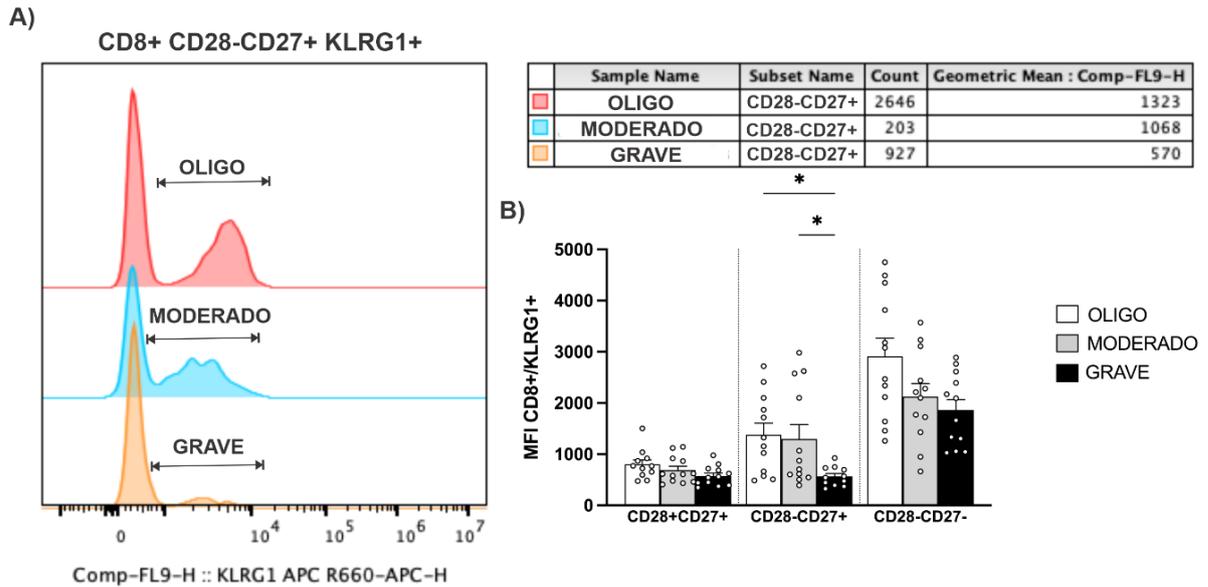


FIGURA 23. A) Comparação do MFI de células T CD8+ CD28-CD27+ KLRG1+ nos três grupos. **B)** Gráfico de MFI de células T CD8+ CD28+CD27+ (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave), CD28-CD27+ (n = 12 oligo e moderado, n = 11 grave) e CD28-CD27- KLRG1+ (n = 12, cada) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$.

4.4.8 – RECEPTORES DE IMUNOSSENESCÊNCIA CD57 E KLRG1 NOS COMPARTIMENTOS DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA DE CÉLULAS T CD4+

O receptor CD57 nos compartimentos de memória de células T de memória não apresentou diferença das frequências de células T CD4+ NAIVE, CM e EM CD57+ entre os três grupos (**FIGURA 24A**). Enquanto as frequências de células T CD4+ EMRA CD57+ apresentou um aumento no grupo oligo em relação ao moderado, no grupo grave em relação ao moderado (**FIGURAS 24A e B**). Em relação ao MFI não houve diferença dos valores de células T CD4+ NAIVE, CM e EM CD57+ entre os três grupos (**FIGURA 24D**). Já na população T CD4+ EMRA

CD57+ apresentou um aumento no grupo grave em relação ao moderado (**FIGURAS 24C e D**).

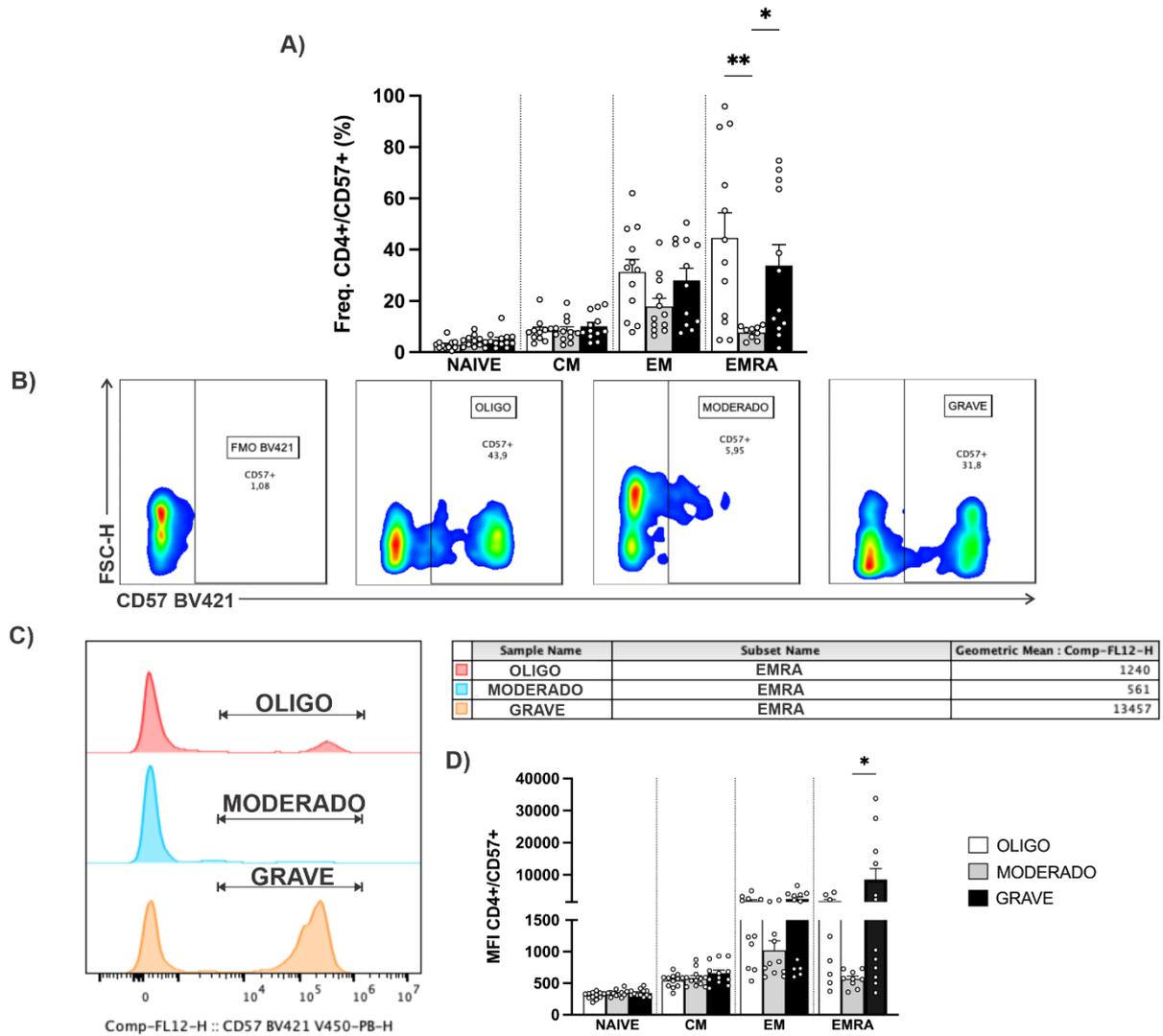


FIGURA 24. A) Gráfico das frequências de T CD4+ NAIVE (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave), CM (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 12 oligo e grave, n = 9 moderado) CD57+. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg, * $p < 0,05$, ** $p = 0,0077$. **B)** Estratégia de análise de células T CD4+ EMRA CD57+ em comparação com FMO BV421. **C)** Comparação de MFI de células T CD4+ EMRA CD57+ nos três grupos. **D)** Gráfico da MFI de células T CD4+ NAIVE (n = 12, cada), CM (n = 12, cada), EM (n = 11 oligo e moderado, n = 12 grave) e EMRA (n = 8 oligo, n = 9 moderado, n = 12 grave) CD57+. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* Benjamini e Hochberg, * $p < 0,05$.

Quanto ao KLRG1, não houve diferença das frequências de células T CD4+ NAIVE, CM e EM KLRG1+ entre os três grupos (**FIGURA 25A**). A frequência de células T CD4+ EMRA KLRG1+ apresentou um aumento no grupo oligo em relação

ao moderado (**FIGURAS 25A e B**). Em relação ao MFI não houve diferença dos valores de MFI de células T CD4+ NAIVE, CM e EM KLRG1+ entre os três grupos (**FIGURA 25D**). Já na população T CD4+ KLRG1+ EMRA houve um aumento no grupo oligo em relação ao moderado (**FIGURAS 25C e D**). Dessa forma houve uma maior expressão de KLRG1 no grupo oligo em células T CD4+ EMRA.

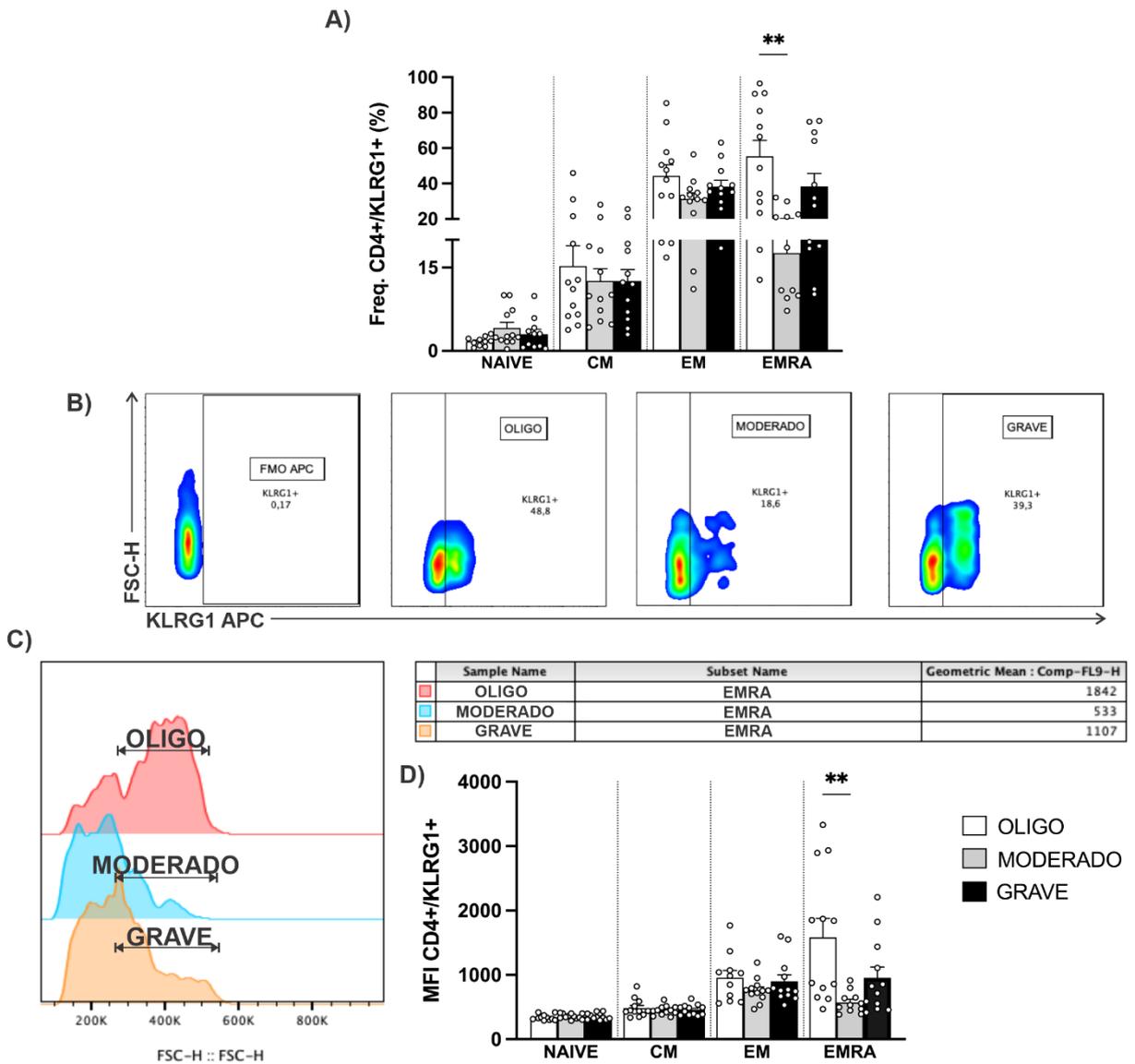


FIGURA 25. A) Gráfico das frequências de células T CD4+ NAIVE (n = 10 oligo, n = 12 moderado, n = 11 grave), CM (n = 12, cada), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 12 oligo e grave, n = 11 moderado) KLRG1+. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg, ** $p = 0,0038$. **B)** Comparação das frequências de células T CD4+ EMRA KLRG1+ em relação ao FMO de APC nos três grupos. **C)** Comparação de MFI de células T CD4+ EMRA KLRG1+ nos três grupos. **D)** Gráfico do MFI de células T CD4+ NAIVE (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave), CM (n = 12, cada), EM (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave) e EMRA (n = 12 oligo e grave, n = 11 moderado) KLRG1+. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg, ** $p = 0,0042$.

4.4.9 – DANOS AO DNA E EXPRESSÃO DE P38 DOS COMPARTIMENTOS DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA DE CÉLULAS T CD4+

Visto que houve aumento da expressão de γ H2Ax em células T totais, foram analisados danos ao DNA nos compartimentos de memória de células T. Assim houve aumento das frequências de γ H2Ax+ em todas as subpopulações de células T CD4+ NAIVE, CM, EM e EMRA no grupo grave em relação ao grupo oligo (**FIGURAS 26A, B, C, D e E**). Destacam-se também aumento das frequências de células T CD4+ NAIVE γ H2Ax+ e de T CD4+ CM γ H2Ax+ no grupo grave em relação ao moderado (**FIGURAS 26A, B e C**). Mais uma vez evidenciando que no grupo grave houve aumento de danos ao DNA em diferentes populações celulares de T CD4+.

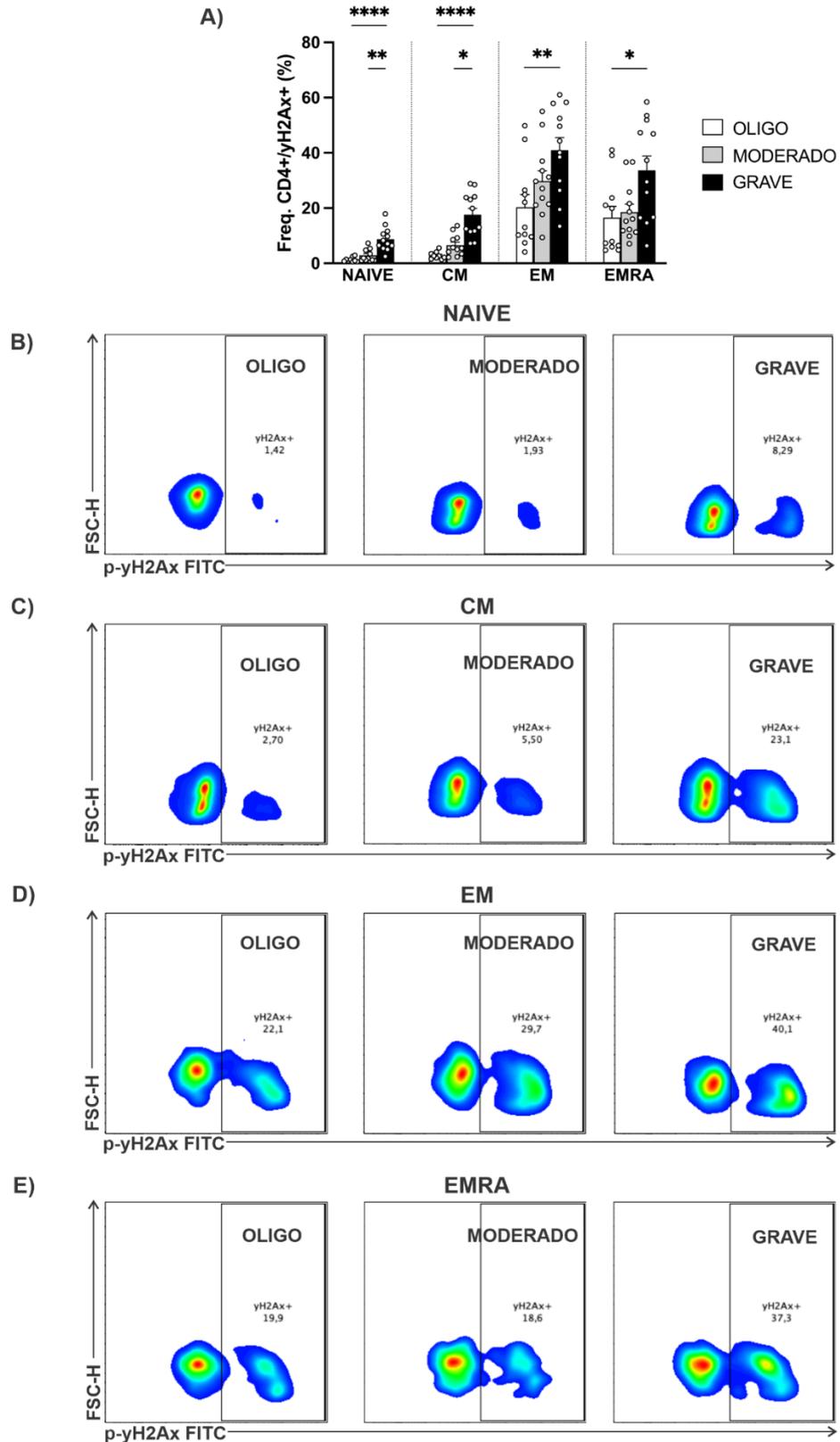


FIGURA 26. A) Gráfico das frequências das populações de células T CD4+ NAIVE (n = 9 oligo, n = 12 moderado e grave), CM (n = 9 oligo, n = 11 moderado, n = 12 grave), EM (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave) e EMRA (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave) γH2Ax+ dos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,009$, **** $p < 0,0001$.

Comparação das frequências de células **B)** T CD4+ NAIVE γ H2Ax+; **C)** T CD4+ CM γ H2Ax+; **D)** T CD4+ EM γ H2Ax+ e **E)** T CD4+ EMRA γ H2Ax+ entre os três grupos.

Quanto ao MFI, houve aumento de γ H2Ax em todas as subpopulações de T CD4+ NAIVE, CM, EM e EMRA no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado (**FIGURAS 27A, B, C, 28A, B e C**). Corroborando com os dados de frequência anteriormente mostrados para esse marcador.

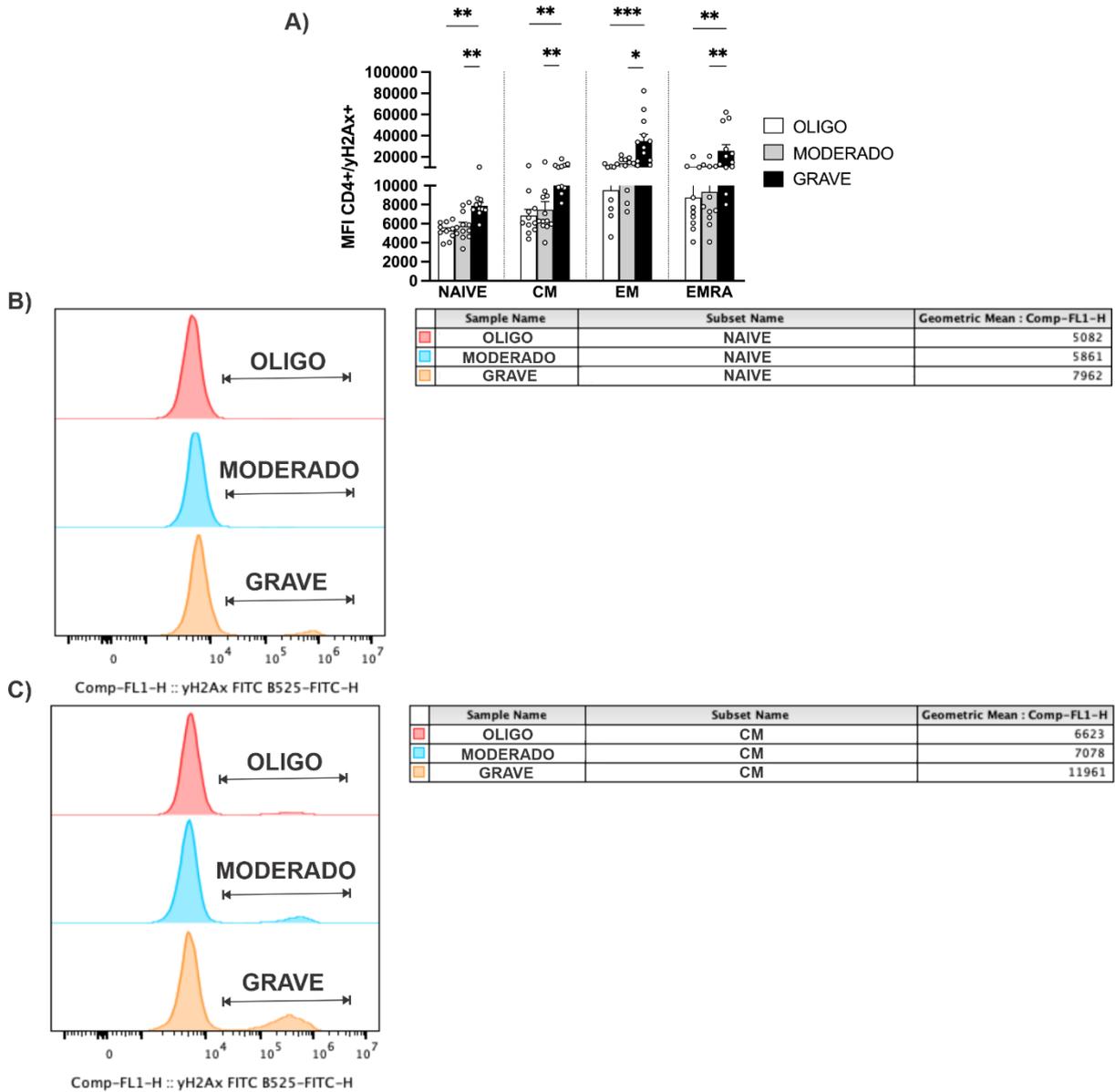


FIGURA 27. A) Gráfico do MFI de células T CD4+ NAIVE (n = 10 oligo, n = 12 moderado, n = 11 grave), CM (n = 11 oligo e grave, n = 12 moderado), EM (n = 9 oligo, n = 10 moderado e n = 12 grave) e EMRA (n = 8 oligo, n = 11 moderado, n = 12 grave) γ H2Ax+ dos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* Benjamini e Hochberg. * p < 0,05, ** p < 0,009, *** p < 0,0003. Comparação do MFI de células **B)** T CD4+ NAIVE γ H2Ax+ e **C)** T CD4+ CM γ H2Ax+ dos grupos oligo, moderado e grave.

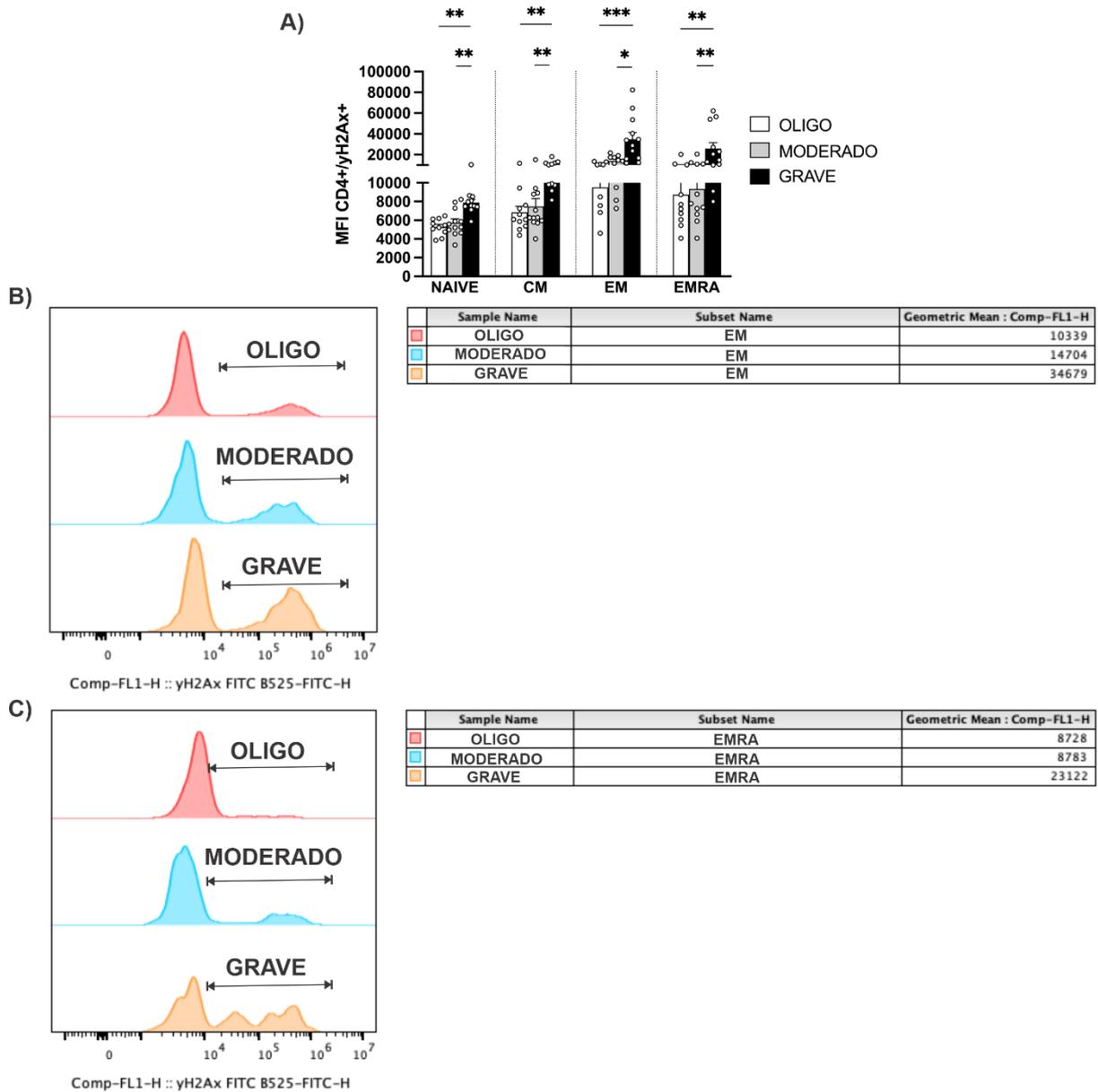


FIGURA 28. A) Gráfico do MFI de células T CD4+ NAIVE (n = 10 oligo, n = 12 moderado, n = 11 grave), CM (n = 11 oligo e grave, n = 12 moderado), EM (n = 9 oligo, n = 10 moderado, n = 12 grave) e EMRA (n = 10 oligo, n = 11 moderado, n = 12 grave) γH2Ax+ dos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,009$, *** $p < 0,003$. Comparação de MFI de células **B)** T CD4+ EM γH2Ax+ e **C)** T CD4+ EMRA γH2Ax+ dos grupos oligo, moderado e grave.

Quanto a avaliação de MAPK, o MFI de p-p38 em nas populações de memória de células T CD4+ NAIVE, CM, EM e EMRA não apresentou diferenças entre os três grupos (**FIGURA 29**).

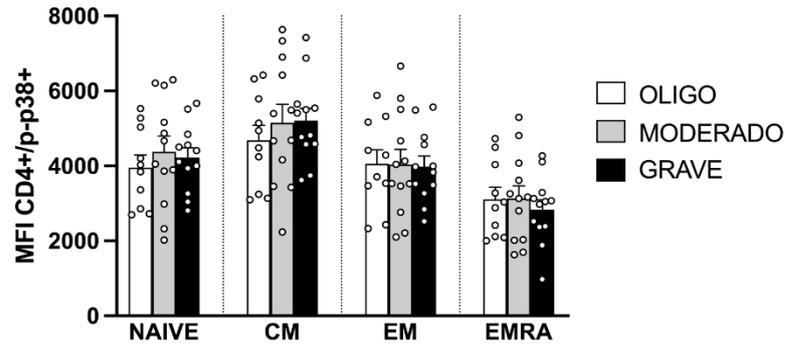


FIGURA 29. Gráfico do MFI de células T CD4+ NAIVE, CM, EM e EMRA p-p38+ dos grupos oligo (n = 10, cada), moderado (n = 12, cada) e grave (n = 12, cada). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg.

4.4.10 – RECEPTORES DE IMUNOSSENESCÊNCIA CD57 E KLRG1 NOS COMPARTIMENTOS DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA DE CÉLULAS T CD8+

No compartimento de células T CD8+ não houve diferença das frequências e MFI de células T CD8+ NAIVE, CM, EM e EMRA CD57+ entre os grupos (**FIGURAS 30A e B**). Foram observados aumento das frequências CD57+ nos três grupos conforme havia perda do receptor CD27 e re-expressão do receptor CD45RA de NAIVE, CM, EM até EMRA (**FIGURAS 30A e C**).

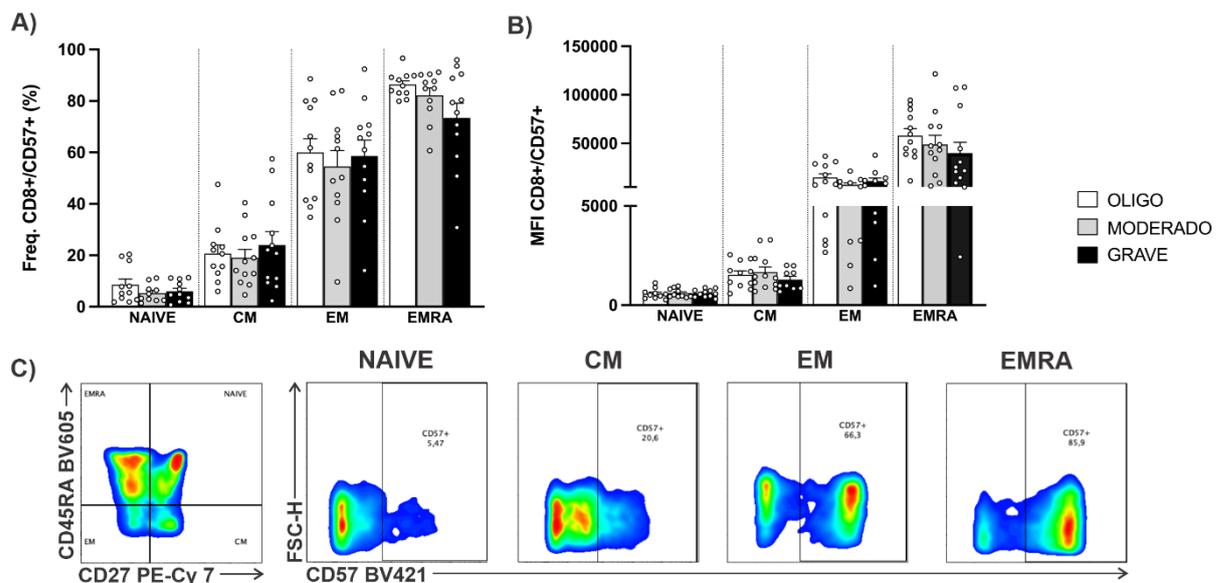


FIGURA 30. A) Gráfico das frequências de células T CD8+ NAIVE (n = 11 oligo e grave, n = 10 moderado), CM (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 11 oligo e moderado, n = 12 grave) CD57+ dos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e

Hochberg. **B)** Gráfico do MFI de células T CD8+ NAIVE (n = 10 oligo e moderado, n = 11 grave), CM (n = 11 oligo, n = 12 moderado, n = 9 grave), EM (n = 12 oligo, n = 10 moderado, n = 11 grave) e EMRA (n = 12, cada) CD57+ dos grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. **C)** Comparação das populações de células T CD8+ NAIVE, CM, EM e EMRA CD57+.

Não houve diferença das frequências de células T CD8+ NAIVE KLRG1+ entre os três grupos (**FIGURA 31A**). Houve diminuição das frequências de células T CD8+ CM KLRG1+ nos grupos moderado e grave em relação ao oligo (**FIGURAS 31A e B**). Assim como, nas populações de células T CD8+ EM KLRG1+ apresentaram esse mesmo perfil (**FIGURAS 31A e C**). Destacou-se também uma diminuição das frequências de células T CD8+ EMRA KLRG1+ no grupo grave em relação ao oligo (**FIGURAS 30A e D**). Dessa forma, houve aumento da expressão de KLRG1 em diferentes populações de memória de células T CD8+ no grupo oligo.

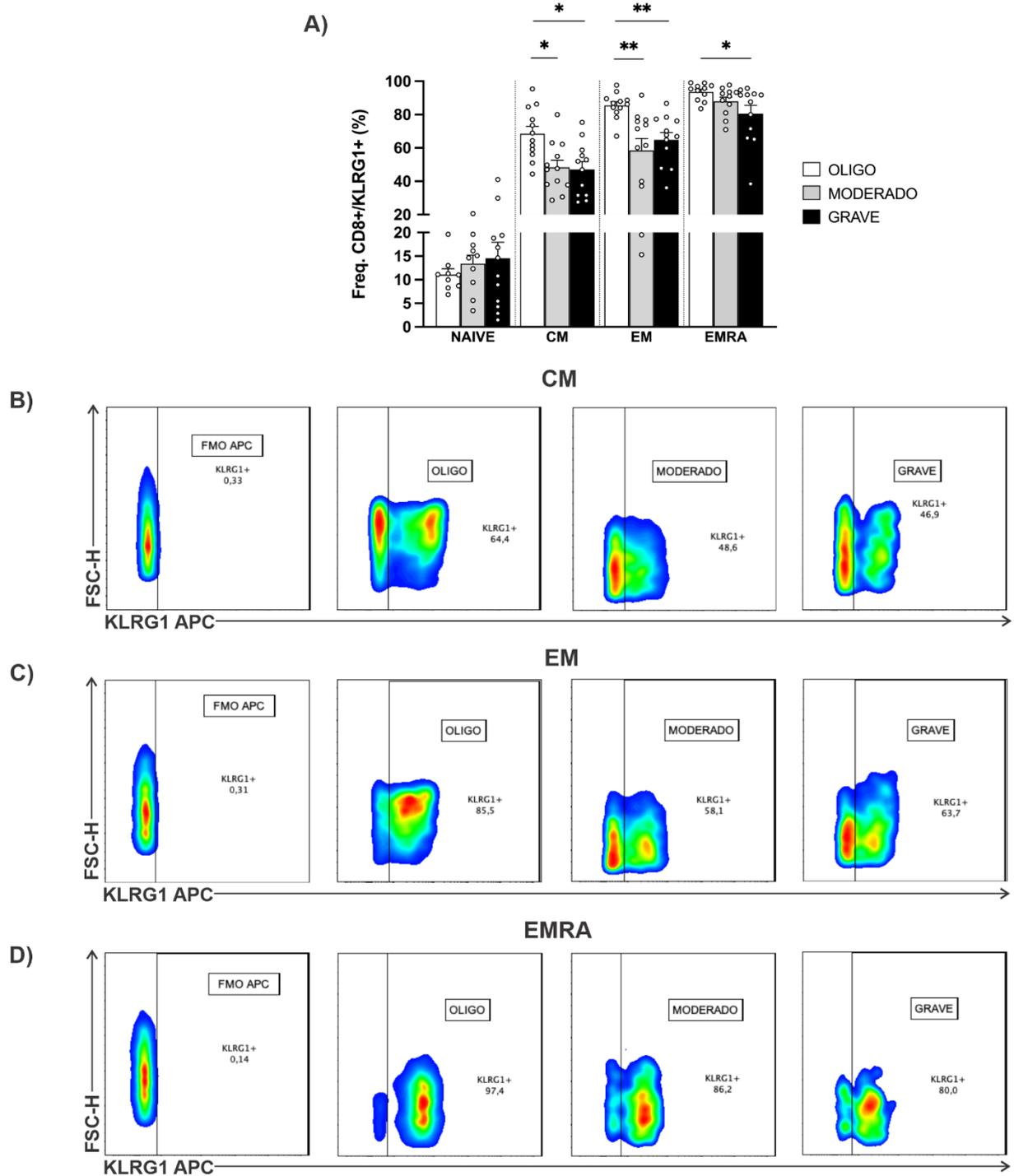


FIGURA 31. A) Gráfico das frequências de células T CD8+ NAIVE (n = 9 oligo, n = 10 moderado, n = 12 grave), CM (n = 12, cada), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 11 oligo e moderado, n = 12 grave) KLRG1+ dos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$. Comparação das frequências de células **B)** T CD8+ CM KLRG1+ **C)** T CD8+ EM KLRG1+ **D)** T CD8+ EMRA KLRG1+ com FMO de APC nos três grupos.

Quanto ao MFI, não houve diferença em células T CD8+ NAIVE KLRG1+ e células T CD8 EMRA KLRG1+ entre os três grupos (**FIGURA 32A**). Entretanto,

houve uma diminuição de MFI de células T CD8+ CM KLRG1+ e de células T CD8+ EM KLRG1+ nos grupos moderado e grave em relação ao oligo (FIGURAS 32A, B e C). Assim, evidenciando que populações de memória como CM e EM apresentam aumento da expressão de KLRG1 no grupo oligo.

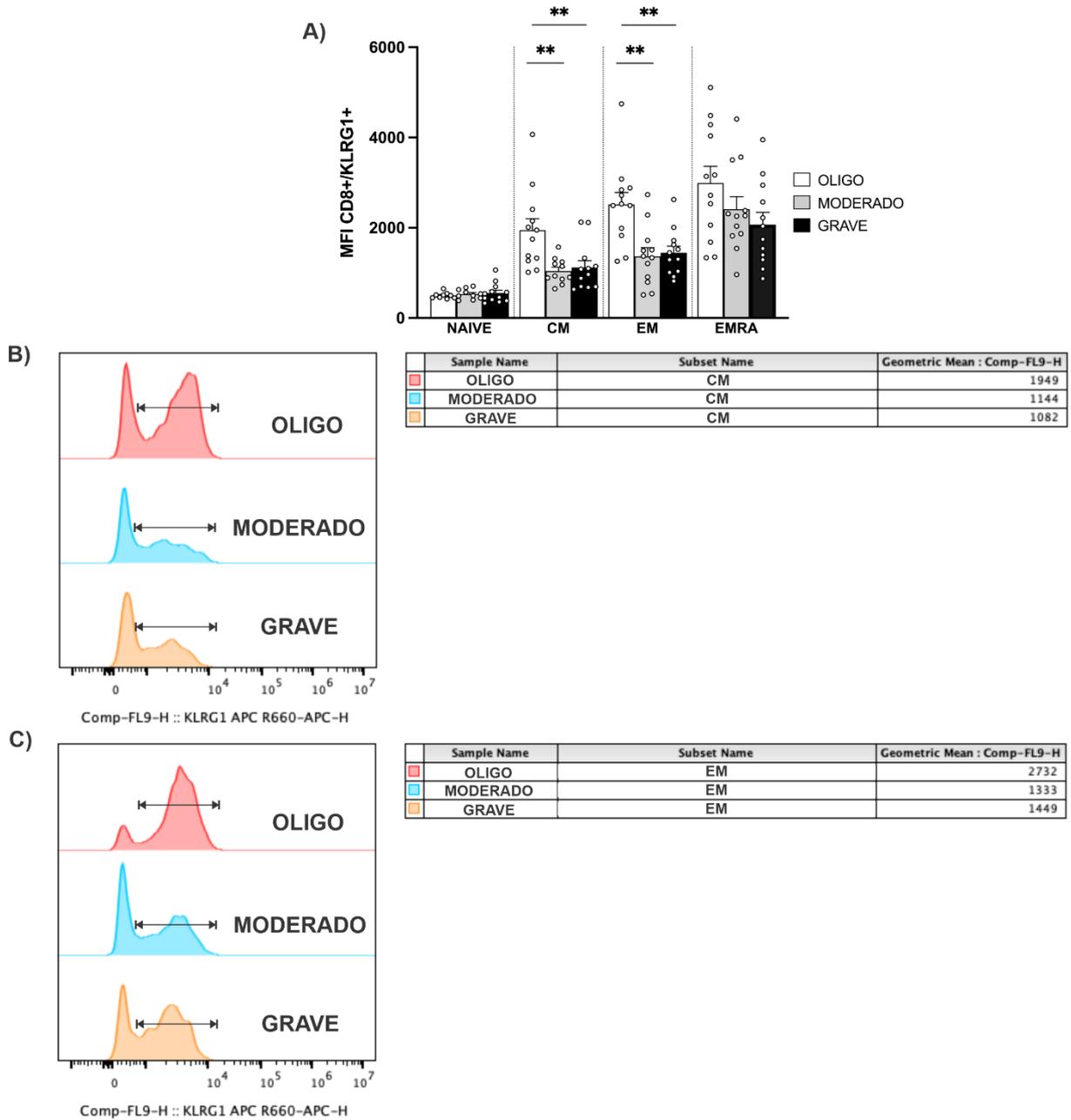


FIGURA 32. A) Gráfico de MFI das células T CD8+ NAIVE (n = 9 oligo, n = 10 moderado, n = 12 grave), CM (n = 12 oligo e grave, n = 11 moderado), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 12, cada) KLRG1+ dos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. ** $p < 0,005$. Comparação de MFI **B)** de células T CD8+ CM KLRG1+ e **C)** de células T CD8+ EM KLRG1+ dos três grupos.

4.4.11 – DANOS AO DNA E EXPRESSÃO DE P38 DOS COMPARTIMENTOS DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA DE CÉLULAS T CD8+

Assim como nos compartimentos de células T CD4+, houve aumento das frequências de γ H2Ax+ em todos compartimentos de memória de T CD8+ no grupo grave em relação ao oligo (**FIGURAS 33A, B, C, D e E**). Evidenciaram-se também aumento da frequência de células T CD8+ NAIVE γ H2Ax+ no grupo grave em relação ao grupo moderado (**FIGURAS 33A e B**). Assim como um aumento das frequências de células T CD8+ CM γ H2Ax+ no grupo moderado em relação ao grupo oligo e no grupo grave em relação ao moderado (**FIGURAS 33A e C**). Com especial destaque do aumento das frequências de células T CD8+ EM γ H2Ax+ e de células T CD8+ EMRA γ H2Ax+ no grupo moderado em relação ao oligo (**FIGURAS 33A, D e E**).

Deste modo, os resultados de citometria destacam que EMRA de células T CD4+ e T CD8+ no grupo grave apresentam aumento significativo de danos ao DNA por aumento da expressão de γ H2Ax.

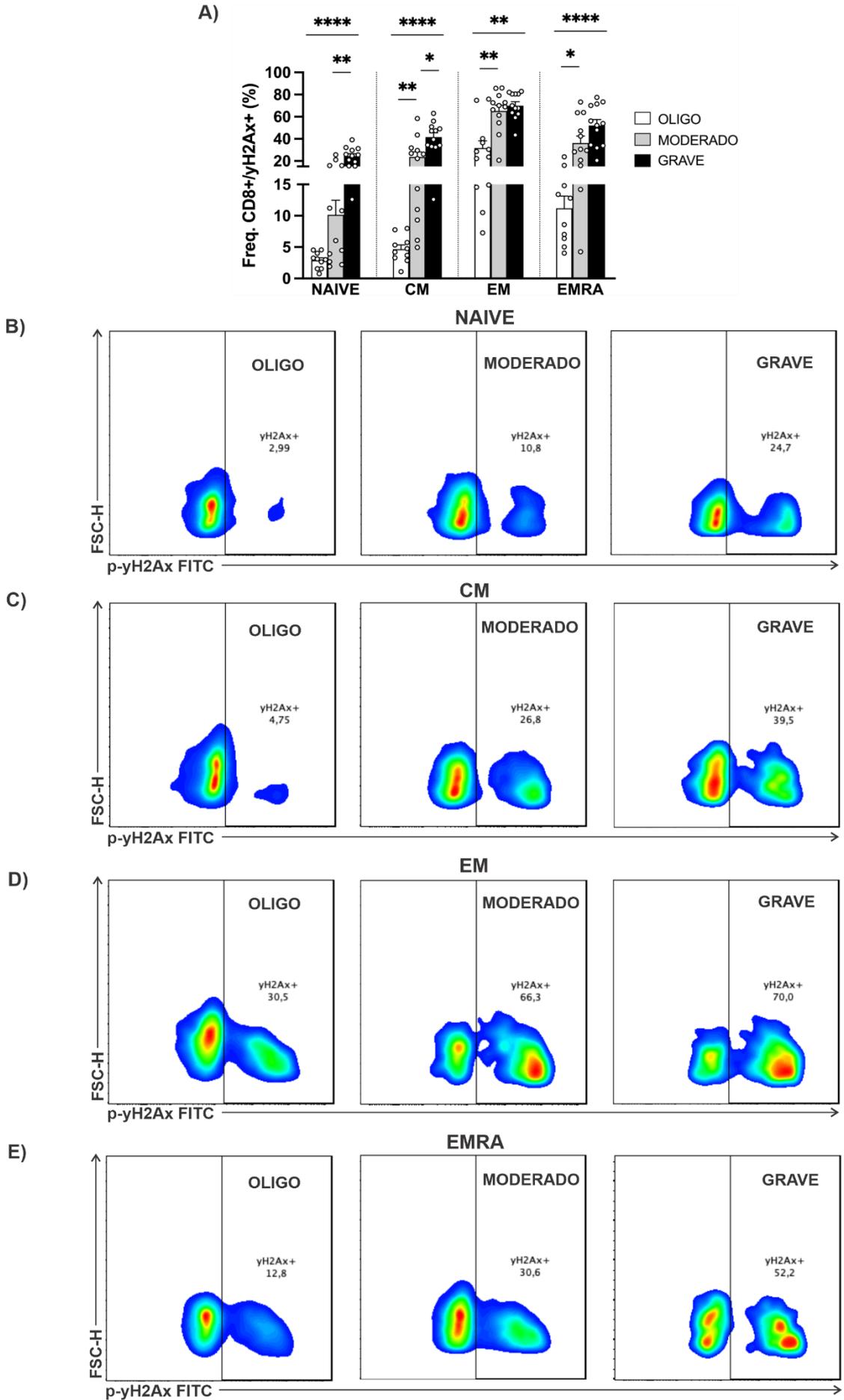


FIGURA 33. A) Gráfico das frequências de células T CD8+ NAIVE (n = 10 oligo, n = 12 moderado e grave), CM (n = 10 oligo, n = 12 moderado e grave), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 10 oligo, n = 12 moderado e grave) γ H2Ax+ dos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$. **B)** Comparação das frequências de células T CD8+ NAIVE; **C)** CM; **D)** EM e **E)** EMRA γ H2Ax+ nos três grupos.

Da mesma forma, houve aumento de MFI de γ H2Ax+ em todos os compartimentos de memória de células T CD8+ no grupo grave em relação ao oligo (**FIGURAS 34A, B, C, 35A, B e C**). Houve aumento de MFI nas populações de memória de células T CD8+ NAIVE γ H2Ax+ e de células T CD8+ CM γ H2Ax+ no grupo grave em relação ao moderado (**FIGURAS 34A, B e C**). Também houve aumento de MFI nas populações de memória T CD8+ EM γ H2Ax+ e T CD8+ EMRA γ H2Ax+ no grupo moderado em relação ao oligo (**FIGURAS 35A, B e C**). Aqui o MFI corroborando com os dados de frequência desse marcador anteriormente mostrados.

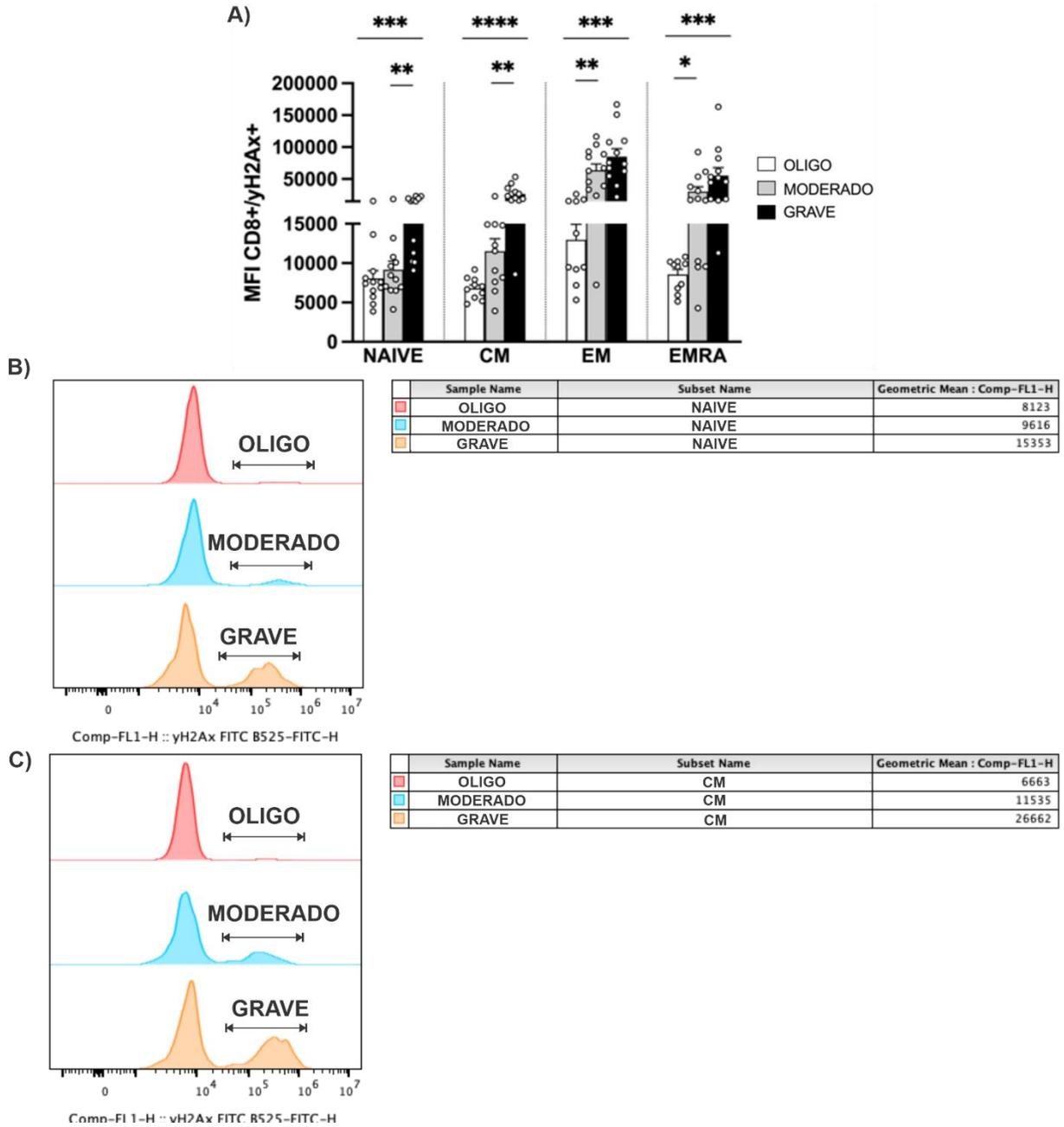


FIGURA 34. A) Gráfico de MFI de células T CD8+ NAIVE (n = 12, cada), CM (n = 10 oligo, n = 11 moderado, n = 12 grave), EM (n = 10 oligo, n = 12 moderado e grave) e EMRA (n = 10 oligo, n = 12 moderado e grave) γH2Ax+ nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Comparação de MFI **B)** de células T CD8+ NAIVE γH2Ax+ e **C)** de células T CD8+ CM γH2Ax nos três grupos.

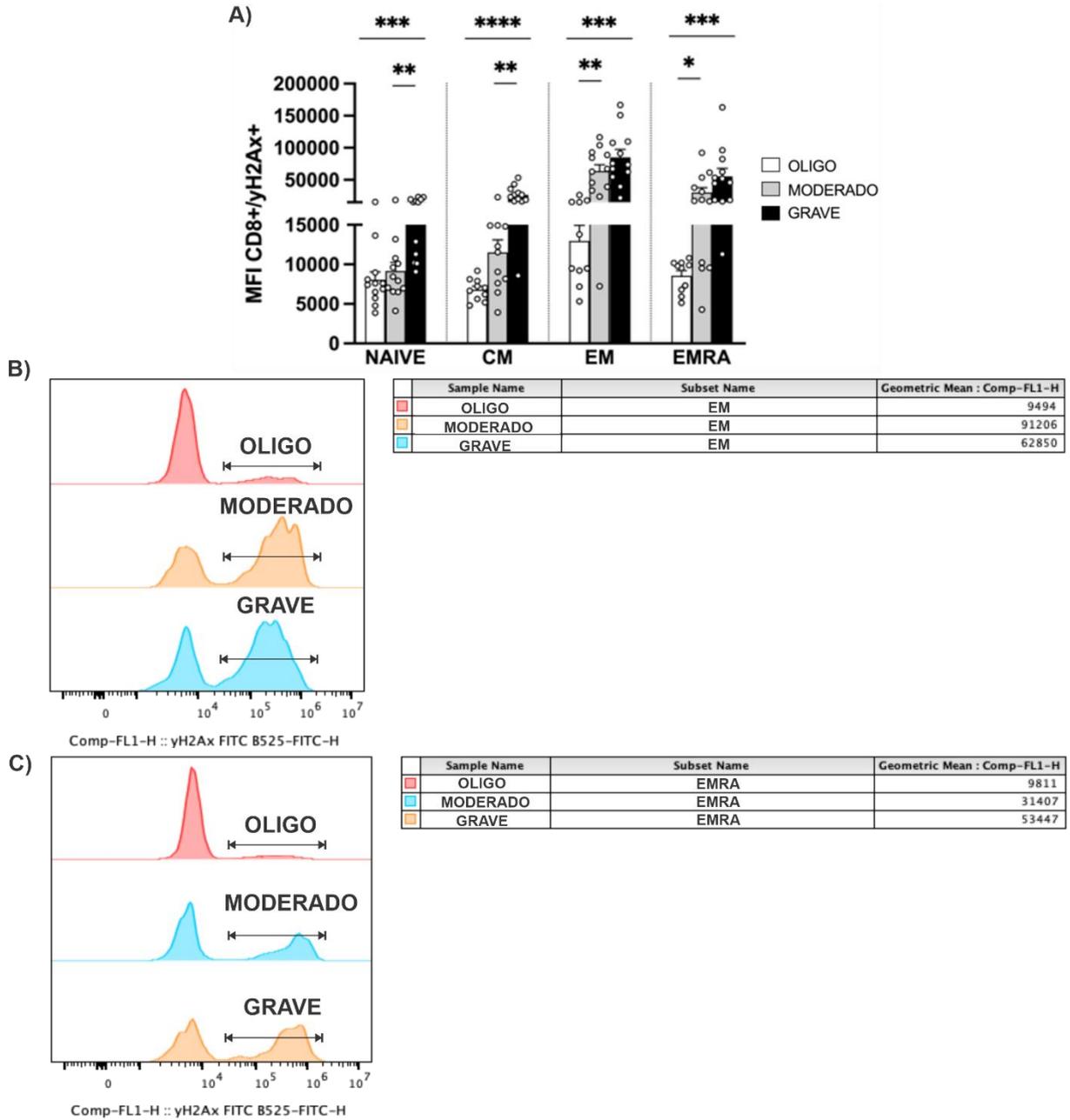


FIGURA 35. A) Gráfico de MFI de células T CD8+ NAIVE ($n = 12$, cada), CM ($n = 10$ oligo, $n = 11$ moderado, $n = 12$ grave), EM ($n = 10$ oligo, $n = 12$ moderado e grave) e EMRA ($n = 10$ oligo, $n = 12$ moderado e grave) γ H2Ax nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Comparação de MFI **B)** de células T CD8+ EM γ H2Ax+ e **C)** de células T CD8+ EMRA γ H2Ax nos três grupos.

Assim como nas células T CD4 para p38, os resultados demonstram que não houve diferença de MFI de células T CD8+ NAIVE, CM, EM e EMRA p-p38+ entre os três grupos (**FIGURA 36**).

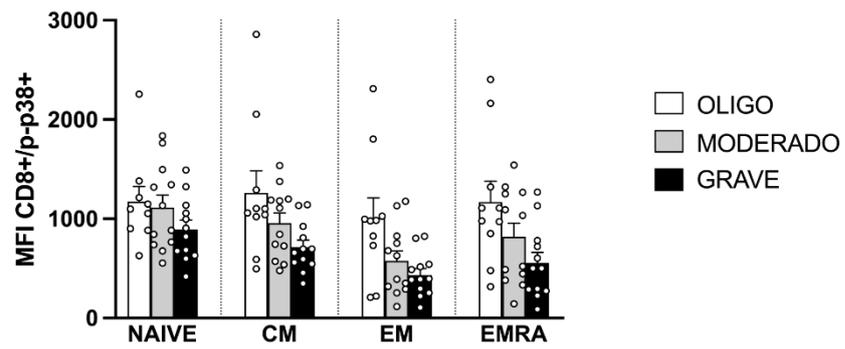


FIGURA 36. Gráfico de MFI de células T CD8+ NAIVE (n = 9 oligo, n = 12 moderado e grave), CM, EM e EMRA p-p38+ nos grupos oligo (n = 10, cada), moderado (n = 12, cada) e grave (n = 12, cada). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg.

5 – DISCUSSÃO

5.1 – DADOS GERAIS DOS PACIENTES E DE INTERNAÇÃO

Dados epidemiológicos de fevereiro a agosto de 2020 sobre COVID-19 no Brasil demonstraram maior predomínio de casos na região sudeste do país, com a taxa de letalidade maior em idosos de ambos os sexos (SOUZA et al., 2021). A taxa de internação na UTI no geral foi de 39,37% (n = 145.053), sendo que 24,41% (n = 138.962) necessitaram de ventilação mecânica invasiva, e destes 82,98% vieram a óbito (SOUZA et al., 2021). Esses dados trazem o retrato nacional do panorama que a COVID-19 causou no início da pandemia.

No estado do Espírito Santo, entre o período de março de 2020 a junho de 2021 houve 524.496 casos com 11.516 óbitos acumulados (DE SOUSA et al., 2021). Embora o sexo feminino tivesse maior percentual de casos confirmados, foi o sexo masculino que obteve maior percentual de óbitos (DE SOUSA et al., 2021). Ainda, maior percentual de casos confirmados foi entre as pessoas de 30 a 39 anos, enquanto os óbitos foram mais prevalentes entre os idosos (DE SOUSA et al., 2021). Essas informações devem ser levadas em consideração quando analisados as amostras coletadas para o estudo. Dos 108 indivíduos arrolados para pesquisa, grande parte foi composta pelo sexo feminino (60 de 108), tendo a idade média entre os grupos composta por indivíduos maiores de 38 anos (**TABELA 2**). Embora no grupo oligo não houve mortes, quando analisados os indivíduos hospitalizados a porcentagem dos pacientes que foram à óbito no grupo grave foi de 62,54% (16 de 26), ou seja, mais da metade desse grupo morreu devido a gravidade e/ou as complicações da COVID-19 (**FIGURA 2A**).

Um estudo de coorte retrospectivo sobre hospitalizações de COVID-19 no Brasil demonstrou que pacientes que se recuperaram da COVID-19 permaneceram na UTI por $10,69 \pm 12,36$ dias, enquanto os que vieram a óbito foi de $12,84 \pm 13,37$ (SOBRAL et al., 2022). Ainda, a probabilidade de sobrevivência média diária diminuiu 3,27% por dia durante os 15 primeiros dias, sendo que aqueles que ficaram mais de 14 dias na UTI tiveram menos de 50% de probabilidade de sobreviver (SOBRAL et al., 2022). Isso corrobora que conforme a gravidade da doença se

intensifica, maior tempo de internação e óbito associados encontrados no grupo grave (**FIGURAS 2A e B**).

Importante salientar que o período que o presente estudo coletou as amostras (junho de 2020 a janeiro de 2021) no país havia apenas uma cepa circulante do SARS-CoV-2 originada da China sem variantes registradas até o momento (ALEEM; SAMAD; SLENKER, 2022). No país não se tinha vacinas aprovadas pela Anvisa e todos os participantes da pesquisa não haviam sido vacinados até então para esse novo CoV (SABÓIA et al., 2021). Ainda durante o período do estudo, o Espírito Santo passou por duas grandes ondas onde a primeira compreendeu de março a outubro de 2020 e a segunda onda de novembro de 2020 a junho de 2021 (DE SOUSA et al., 2021). Dessa forma, os grupos foram homogêneos quanto ao vírus infectado e diferiram apenas quanto ao grau de acometimento da COVID-19, sem interferentes imunológicos causadas pela vacinação, indo desde sintomas leves, perpassando a necessidade de hospitalização do grupo moderado até indivíduos com a forma grave da doença que precisaram de aporte de ventilação mecânica.

5.2 – EXAMES LABORATORIAIS: HEMOGRAMA

As primeiras confirmações de COVID-19 (na época 2019-nCoV) na China evidenciaram alterações de exames laboratoriais de rotina como exames hematológicos e bioquímicos (CHEN et al., 2020; HUANG et al., 2020b; ZHOU et al., 2020b). Houve anemia (26%, 14 de 54) naqueles pacientes que não sobreviveram a COVID-19 (ZHOU et al., 2020b). A hemoglobina estava abaixo dos valores de referência em muitos pacientes (51%, 50 de 99) (CHEN et al., 2020). Por outro lado, pareceu não haver diferença estatística e nem alterações fora dos valores de referência nas dosagens de hemoglobina e plaquetas entre os grupos internados e não internados por COVID-19 (HUANG et al., 2020b).

Um estudo transversal realizado na cidade de Barash no Iraque, de outubro de 2020 a agosto de 2021, com diversos exames laboratoriais de rotina em diferentes formas clínicas da COVID-19 demonstrou significativas alterações nos parâmetros hematológicos (ALI et al., 2022). O valor médio de glóbulos vermelhos apresentou um declínio significativo no grupo grave em comparação aos grupos com

sintomas leves e grupos saudáveis ($3,12 \pm 0,78$ vs. $4,67 \pm 1,23$ $10^{12}/L$ e $4,86 \pm 0,48$ $10^{12}/L$, respectivamente, $p > 0,05$) (ALI et al., 2022). O mesmo perfil foi encontrado em relação à hemoglobina, sendo que o valor médio diminuiu no grupo grave em relação aos demais grupos ($10,68 \pm 2,05$ vs. $11,84 \pm 2,61$ e $13,04 \pm 1,34$ g/dl, respectivamente, $p > 0,05$) (ALI et al., 2022).

Ainda sobre a hemoglobina, uma metanálise encontrou que pacientes graves apresentaram valores de hemoglobina significativamente reduzidos em relação aos não graves (HENRY et al., 2020). No entanto, a mesma tendência não foi observada nos não sobreviventes em relação aos sobreviventes, não havendo diferença significativa na média entre os grupos (HENRY et al., 2020; QIU et al., 2020).

Diferentemente dos descritos acima, não foram encontrados valores alterados de hemácias (glóbulos vermelhos, eritrócitos) entre os grupos moderado e grave, como também esse analito estava dentro dos valores de referência em ambos os grupos (**TABELA 3, linha 1**). Quanto a hemoglobina, não houve diferença estatística entre os grupos, mas apresentaram níveis ligeiramente mais baixos nos dois grupos em relação aos valores de referência para esse analito (**TABELA 3, linha 2**).

Um estudo demonstrou que o SARS-CoV-2 pode ser capaz de infectar as células progenitoras dos glóbulos vermelhos levando uma síntese prejudicada da hemoglobina (KRONSTEIN-WIEDEMANN et al., 2022). Pacientes com COVID-19 apresentavam níveis mais baixos de hemoglobina em relação aos pacientes saudáveis e aos pacientes convalescentes (KRONSTEIN-WIEDEMANN et al., 2022). Outro estudo defendeu que o SARS-CoV-2 parece codificar proteínas não-estruturais capazes de atuar diretamente nas cadeias beta-globínicas da hemoglobina (WENZHONG; HUALAN, 2022). A baixa nos níveis de hemoglobina e consequente alterações na capacidade de transporte de oxigênio influenciam a gravidade da COVID-19.

Em contraposição, pacientes com sequela pulmonar apresentavam níveis mais aumentados de hemoglobina, sugerindo que lesões pulmonares residuais podem influenciar a capacidade de difusão e induzir um aumento compensatório da hemoglobina (WU et al., 2021). Apesar disso, Dr. Cançado da Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (ABHH) alegou que “não é possível

afirmar [até o momento junho de 2022] [...], [que a] COVID-19 seja uma doença hematológica com complicações pulmonares” (CANÇADO, 2022).

Nossos achados não apresentaram diferenças entre os grupos moderado e grave como também não fugiram aos valores de referência os parâmetros como hematócrito, VCM e HCM (**TABELA 3, linhas 3, 4 e 5**). Quando observado o CHCM, houve um aumento nos valores do grupo moderado em relação ao grave, no entanto, ambos os grupos exibiram níveis dentro dos valores de referência (**TABELA 3, linha 6**). Um estudo sobre parâmetros laboratoriais associados ao tempo de permanência hospitalar por COVID-19 demonstrou que CHCM era um preditor negativo (JERAIBY et al., 2021). O que deve ser levado em consideração que esse estudo de Jeraiby et al. (2021) não utilizou valores de referência para determinar se esse analito estava alterado dentro de uma normalidade entre os pacientes estudados.

Os níveis de RDW nos pacientes graves estavam mais aumentados que no grupo moderado, mas ambos os grupos não apresentaram parâmetros fora dos valores de referência (**TABELA 3, linha 7**). O RDW é calculado através do desvio padrão do volume de glóbulos vermelhos dividido pelo volume corpuscular médio, sendo o parâmetro que mede a variabilidade de tamanho dos eritrócitos circulantes (MORENO-TORRES et al., 2022). Os valores de RDW parecem exibir maior significância na admissão e hospitalização na UTI e podem indicar mortalidade de pacientes com COVID-19, como também podem ser considerados um marcador associado a (hiper)inflamação sistêmica (BILGIR et al., 2021; GUANÍ-GUERRA et al., 2022; MORENO-TORRES et al., 2022).

Os níveis de plaquetas não apresentaram diferença entre os grupos moderado e grave assim também não diferindo dos valores de referência (**TABELA 3, linha 8**). A IFCC e a SBAC destacam a diminuição de plaquetas (plaquetopenia ou trombocitopenia) como um dos principais achados em pacientes com COVID-19 (IFCC, 2022; SBAC, 2020). No entanto, em diversos estudos não apresentaram diferença desse analito entre os grupos com COVID-19, como também não estiveram fora dos valores de referência consultados (BALNIS et al., 2021; BALUSHI et al., 2021; HUANG et al., 2020b; JIN et al., 2020; KANG et al., 2020; MANN et al., 2020; MAZZONI et al., 2020; MORENO-TORRES et al., 2022; SONG et al., 2020;

URRA et al., 2020; WU et al., 2021). Entretanto, pacientes com COVID-19 apresentam anormalidades na coagulação que são percebidos em outros exames laboratoriais como dímero-D e TAP (WOOL; MILLER, 2021).

Outros achados de alterações laboratoriais estão na série de glóbulos brancos (**TABELA 3, linhas 9 a 19**). Pacientes dos grupos moderado e grave apresentaram aumento dos níveis de leucócitos (leucocitose) em relação aos valores de referência, enquanto o grupo grave estava mais aumentado em relação ao moderado (**TABELA 3, linha 9**). Uma metanálise sobre níveis de leucócitos descreveu que a leucocitose estava associada a desfechos ruins enquanto a leucopenia foi associada a um melhor prognóstico para doença (YAMADA et al., 2020).

Os níveis de neutrófilo bastão se encontraram dentro dos valores de referência nos dois grupos, no entanto, no grupo grave apresentavam mais elevados em relação ao grupo moderado (**TABELA 3, linha 10**). Já os neutrófilos segmentados estavam dentro dos valores de referência apenas no grupo moderado, enquanto no grupo grave estavam mais aumentados tanto em relação ao moderado quanto em relação aos valores de referência, assim indicando uma neutrofilia no grupo grave (**TABELA 3, linha 11**). Quando visto global, os níveis de neutrófilo bastão e segmentado estavam aumentados no grupo grave em relação ao moderado (neutrofilia global) (**TABELA 3, linhas 15 e 16**). A IFCC e a SBAC também destacam aumento dos níveis de neutrófilos como um dos achados esperados de alterações no hemograma nos pacientes acometidos com COVID-19 (IFCC, 2022; SBAC, 2020).

Nossos dados demonstram que houve alteração dos níveis de linfócitos (linfopenia ou linfocitopenia) de ambos os grupos, sendo que os parâmetros se encontraram abaixo dos valores de referência para esse analito, e no grupo grave houve diminuição dos linfócitos em relação ao grupo moderado (**TABELA 3, linha 12**). No entanto, quanto ao global os níveis de linfócitos não apresentaram diferença entre os grupos (**TABELA 3, linha 17**). Houve uma tendência de diminuição dos valores de eosinófilos (eosinopenia) nos pacientes graves que se encontrou abaixo dos valores de referência e estavam diminuídos em relação ao grupo moderado (**TABELA 3, linha 13**). Enquanto o eosinófilo global não apresentou diferença entre

os grupos (**TABELA 3, linha 18**). A leucocitose, eosinopenia e linfopenia parecem estar associadas à progressão do estado inflamatório, no mais, a eosinopenia persistente pode ser um preditor de gravidade da doença como também de desfecho clínico adverso durante a hospitalização (ZHANG et al., 2021).

Houve aumento dos valores de monócitos (monocitose) em ambos os grupos em relação aos valores de referência, destacando o grupo moderado com níveis mais elevados em relação ao grupo grave (**TABELA 3, linha 14**). Enquanto os valores de monócito global não houve diferença entre os grupos (**TABELA 3, linha 19**). O aumento do número de monócitos GM-CSF+ e monócitos IL-6+ sugerem um risco potencialmente alto de tempestades de citocinas pro-inflamatórias, migração e acúmulo dessas células em tecidos afetados pela doença (ZHOU et al., 2020c).

5.3 – EXAMES LABORATORIAIS: BIOQUÍMICOS

Houve aumento dos níveis de DHL nos grupos moderado e grave em relação aos valores de referência, enquanto o grupo grave apresentou níveis mais elevados em relação ao moderado (**TABELA 4, linha 1**). Estudos preliminares já destacaram alterações de DHL, principalmente níveis mais aumentados em pacientes internados e naqueles que não sobreviveram a COVID-19 (CHEN et al., 2020; HUANG et al., 2020b; ZHOU et al., 2020b). A DHL é uma enzima presente em praticamente em todas as células do organismo, envolvida nos processos de metabolismo celular, responsável por catalisar o piruvato à lactato (GUPTA, 2022). Quando há dano celular e/ou tecidual, essa enzima é liberada na corrente sanguínea sendo detectada através do exame laboratorial bioquímico, todavia, é um marcador inespecífico de morte celular e tecidual, por isso unicamente esse exame não traz muitas informações clínicas dos pacientes (GUPTA, 2022). Por isso as análises de exames clínicos precisam de um conjunto de resultados.

Nós não observamos diferença entre os grupos moderado e grave quanto aos valores de ferritina, bilirrubina total, bilirrubina indireta e dímero-D (**TABELA 4, linhas 2, 3, 5 e 10**). Também não houve diferença entre os grupos e não fugiram aos valores de referência os resultados de TAP (INR), troponina I e PTTK (tempo) (**TABELA 4, linhas 7, 8 e 14**). Houve aumento de bilirrubina direta no grupo grave

em relação ao grupo moderado (**TABELA 4, linha 4**). A bilirrubina é um dos marcadores que indicam lesão hepática (CAI et al., 2021). Acredita-se que a lesão hepática em pacientes com COVID-19 seja multifatorial: de danos diretos da infecção do SARS-CoV-2 nas células hepáticas, da tempestade de citocinas, das disfunções de coagulação e endoteliais, como também dos danos causados pelas drogas utilizadas no tratamento (CAI et al., 2021). Para mais, pacientes com níveis elevados de bilirrubina direta tiveram uma proporção maior de serem pacientes críticos, tiveram maiores chances de admissão em UTI, apresentaram maiores incidências de complicações clínicas e tiveram maiores chances de mortalidade (CHEN et al., 2022).

Observamos aumento de triglicerídeos em ambos os grupos em relação aos valores de referência (**TABELA 4, linha 13**). Aparentemente a COVID-19 influencia no metabolismo de lipídios de forma indireta causando prejuízos da função de HDL refletindo em concentrações aumentadas de triglicerídeos na corrente sanguínea (SURMA; BANACH; LEWEK, 2021). No entanto, apenas o valor de triglicerídeos unicamente não estaria implicada nessa hipótese, precisariam ser avaliados outros lipídeos como VLDL, LDL e HDL que não estão presentes nesse estudo.

Embora os valores de TAP não diferiram entre os grupos moderado e grave, esse analito estava ligeiramente aumentado em relação aos valores de referência para ambos os grupos (**TABELA 4, linha 6**). TAP é o tempo de coagulação do sangue plasmático induzido pelo fator tecidual e associado ao INR são geralmente usados para avaliar vários distúrbios tromboembólicos e hemorrágicos (SAHA et al., 2021). Como os valores de TAP podem variar dependendo da quantidade e tipo de agente coagulante usado para desencadear a coagulação, o TAP (INR) é a medida mais adequada para comparação (SAHA et al., 2021). O TAP (INR) nesse caso não estava alterado entre os grupos (**TABELA 4, linha 7**), assim o valor alterado de TAP pode não ser adequado para avaliação hospitalar dos grupos moderado e grave nesse caso.

Os valores de proteína C reativa foram maiores no grupo grave em relação ao moderado (**TABELA 4, linha 9**). Proteína C reativa é uma proteína originalmente produzida pelo fígado e fica aumentada quando há um estado inflamatório, como no caso de pacientes mais graves com COVID-19 (VELAVAN; MEYER, 2020). Os

resultados corroboram com os achados clínicos demonstrando que quanto mais grave a doença, maiores são os níveis de proteína C reativa. Os valores de ureia foram maiores no grupo grave e ambos os grupos apresentaram níveis acima dos valores de referência (**TABELA 4, linha 11**). O mesmo perfil foi encontrado para creatinina (**TABELA 4, linha 12**). Ureia e creatinina, biomarcadores de danos nos rins, geralmente estando mais aumentados em pacientes que tiveram desfecho fatal para COVID-19 (BOSS et al., 2022). A COVID-19 também é uma doença que acomete os rins e está associada à lesões renais agudas, tanto por conta do vírus quanto por conta do tratamento da doença e do agravamento da infecção (NADIM et al., 2020).

5.4 – EXAMES LABORATORIAIS: GASOMÉTRICOS

Quanto aos exames gasométricos, houve diminuição do pH no grupo grave em relação ao moderado, resultado também está abaixo dos valores de referência para o grupo grave (**TABELA 5, linha 1**). Houve aumento de PCO_2 no grupo grave em relação ao moderado, esse valor também se encontra aumentado em relação aos valores de referência (**TABELA 5, linha 3**). O PCO_2 e o pH são inversamente proporcionais, assim quando há aumento das concentrações de PCO_2 o pH tende a diminuir, que é o que foi encontrado no grupo grave.

Não houve diferença entre os grupos moderado e grave nos níveis de saturação, entretanto, se encontravam abaixo dos valores de referência para ambos os grupos de acordo com esse analito (**TABELA 5, linha 6**). A baixa saturação de oxigênio é indicativo de lesão pulmonar que pode evoluir para ARDS (RANIERI et al., 2012). Assim eram esperados que apresentassem níveis baixos de saturação já que os grupos moderado e grave foram constituídos de pacientes internados para tratamento hospitalar.

5.5 – EXAMES LABORATORIAIS: IMUNOGLOBULINAS

Os resultados de IgM e IgG demonstram que houve uma diminuição gradual dos títulos dessas imunoglobulinas de D15 a D180 no grupo oligo (**FIGURA 3A e B**).

Geralmente na COVID-19 IgM e IgG diminuem com tempo, enquanto a proporção de anticorpos neutralizantes são produzidos de forma estável por pelo menos 5 a 7 meses após a infecção por SARS-CoV-2 (RIPPERGER et al., 2020; YANG et al., 2022), mas sendo questionável quanto ao papel protetor duradouro. Contudo, como outros coronavírus, os indivíduos podem ser re-infectados e contrair COVID-19 novamente, ainda mais por outra variante do SARS-CoV-2 (IWASAKI, 2021). Dessa forma, a vacina continua sendo a principal forma de prevenção para doença.

5.6 – RESULTADOS DE CITOMETRIA DE CÉLULAS T

Dado que os exames clínicos e laboratoriais indicavam que pacientes com COVID-19, principalmente das formas mais graves, apresentavam aumentos de marcadores inflamatórios (aumento de proteína C reativa, DHL), danos sistêmicos, alterações das células imunes, principalmente leucocitose e linfopenia, o presente estudo foi avaliar o perfil fenotípico e funcional das células T de diferentes estágios da infecção por SARS-CoV-2. Assim, as primeiras análises dos resultados de citometria demonstram uma diminuição das frequências de viabilidade celular (< 90%) de linfócitos totais nos grupos moderado e grave em relação ao grupo oligo (**FIGURA 4A e B**).

Há uma hipótese de que depleção de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD⁺) causada pela superexpressão de CD38 em células T estaria associada na regulação de distúrbios metabólicos e viabilidade celular (RAHIMMANESH et al., 2022). Existe um fenótipo (hiper) ativado já descrito através dos receptores CD69, CD38, CD44, HLA-DR altamente expressos em células T de pacientes em diferentes estágios da COVID-19 em comparação com indivíduos saudáveis sem a doença (SONG et al., 2020; WANG et al., 2020b; XU et al., 2020; ZHOU et al., 2020c). A depleção de NAD⁺ interferiria em vias celulares vitais refletindo numa menor viabilidade celular na COVID-19 (RAHIMMANESH et al., 2022).

Outros fatores podem estar envolvidos nessa diminuição da viabilidade celular nos grupos moderado e grave referentes a inflamação exacerbada e linfopenia. Altos níveis de IL-6 podem promover a morte de linfócitos, além do SARS-CoV-2 atuar diretamente nos linfonodos e baço contribuindo para redução dessas células no

sangue periférico (FENG et al., 2020). A diminuição da viabilidade celular também pode estar relacionada a imunossenescência, mas para caracterizar esse fenótipo foi preciso avaliar outras características como frequência de células T, marcadores CD57 e KLRG1, perda de receptores CD28 e CD27, danos ao DNA e alterações na atividade de MAPK p38.

Especificamente em relação as células T, não houve diferença entre as frequências de células T CD3+ nos grupos oligo, moderado e grave (**FIGURA 5A**). As contagens de linfócitos T CD3+ totais podem diminuir se comparados aos indivíduos saudáveis e/ou com formas menos graves da COVID-19, no entanto, as frequências parecem não diferir entre os acometidos pela doença (LÖHR et al., 2021; MANN et al., 2020; SONG et al., 2020).

Nossos dados apontaram que a frequência de células T CD4+ totais foi maior no grupo moderado em relação aos grupos oligo e grave (**FIGURA 5A e B**). Enquanto a frequência de células T CD8+ totais foi menor nesse grupo em relação ao grupo oligo (**FIGURA 5A e C**). As frequências de T CD4+ totais das formas leve e grave da COVID-19 parecem não se distinguir dependendo da análise (SONG et al., 2020). No entanto, quando comparados entre estágios leves/moderados com estágios graves/críticos, há um aumento das frequências de T CD3+CD4+ nas formas de menor gravidade da COVID-19 (GARCIA-GASALLA et al., 2022). Geralmente, as frequências de células T CD4+ são maiores que de T CD8+ na circulação, enquanto cada população celular, CD4 e CD8, vão variar conforme o recrutamento desses linfócitos para os locais de lesão tecidual (KARLSSON; HUMBERT; BUGGERT, 2020). Aparentemente parece haver uma descompensação de recrutamento de células T no grupo moderado. Outro indício de indicativo de imunossenescência já que pode ser caracterizada pelo prejuízo nas proporções de CD4/CD8.

Outra característica para determinação do perfil de senescência é a avaliação das frequências de células T de memória (**FIGURA 14**). Além disso pela caracterização dos receptores co-estimuladores CD27 e CD28. As populações de células T apresentam um estágio menos diferenciado expressando os dois receptores CD28+CD27+, um estágio intermediário com a perda de um dos receptores até um estágio mais terminalmente diferenciado com a perda de ambos

receptores (PEREIRA et al., 2019). Assim, foram analisados essas (sub)populações em diferentes apresentações clínicas da COVID-19.

Houve aumento da frequência de células T CD4+ EMRA no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado (**FIGURA 15A e B**). Essa população celular carrega características de células terminalmente diferenciadas, perdem a expressão de receptor co-estimulador, se acumulam com a idade como também perante a infecções como visto na COVID-19 (GARCIA-GASALLA et al., 2022; HENSON; RIDDELL; AKBAR, 2012). Os resultados corroboram que pacientes com a forma grave da COVID-19 apresentam aumento da expressão de células T CD4+ EMRA.

Nossos dados demonstraram que houve diminuição da frequência de células T CD8+ CM no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado (**FIGURA 16A e B**). As células T CM normalmente têm pouca ou nenhuma função efetora e baixa capacidade citotóxica, mas essa população é a responsável por se proliferar e se diferenciar em células efetoras em resposta à estimulação antigênica (CZESNIKIEWICZ-GUZIK et al., 2008; KAECH; CUI, 2012; SALLUSTO; GEGINAT; LANZAVECCHIA, 2004). Pacientes com COVID-19 tendem a apresentar baixas frequências de células T CD8+ CM em relação a indivíduos saudáveis sem a doença (BERGANTINI et al., 2021; BIASI et al., 2020; MAZZONI et al., 2020). Quando analisados os diferentes graus de acometimento da doença, pacientes com a forma mais grave apresentavam frequências mais baixas que os da forma moderada (BERGANTINI et al., 2021). Por conta da baixa frequência de T CM no grupo grave era de se esperar que diminuíssem as outras populações como T EM e T EMRA, mas isso não foi encontrado nos resultados (**FIGURA 16A**). Mas não descarta que a longo prazo essas células CM possam prejudicar manutenção celular de células efetoras.

Quando avaliados as frequências dos receptores CD28 e CD27 em células T CD4+ houve uma diminuição da frequência de CD28+CD27+ no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado, enquanto a frequência de CD28-CD27- no grupo grave aumentou em relação ao grupo moderado, o mesmo perfil foi encontrado para CD28-CD27+ (**FIGURA 17A, B e C**). Na fase aguda, pelo menos 5 primeiros dias de admissão hospitalar, não foram encontradas diferenças de frequências dessas populações em células T CD4+ (SEGUNDO et al., 2021). Aqui,

com mais de 10 dias de sintomas, houve acúmulo de células T CD4⁺ CD28-CD27⁻ no grupo grave. Essas células podem estar promovendo prejuízos diretos e indiretos com aumento de atividade inflamatória e citotóxica, além de poder regular e manter a imunossenescência nesses indivíduos (LANNA et al., 2014).

Em células T CD8⁺ houve diminuição da frequência de CD28⁺CD27⁻ no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado (**FIGURA 18A, B e C**). Na fase aguda da doença (pelo menos 5 primeiros dias de admissão hospitalar), pacientes moderados/graves apresentavam menor frequência de CD8⁺ CD28⁺CD27⁻ e acúmulo de CD8⁺ CD28-CD27⁻ em relação à pacientes leves com COVID-29 (SEGUNDO et al., 2021). No entanto com mais de 10 dias de sintomas, esses perfis não foram encontrados nos resultados do nosso estudo.

Quando avaliados os receptores de imunossenescência em células T, não houve diferenças na frequência e MFI dos receptores CD57 e KLRG1 em células T CD4⁺ e T CD8⁺ totais (**FIGURAS 6A, B, C, 7A, B, C, 8A, B, C, 9A, B e C**). Visto que as células T totais abarcam diversas subpopulações de células naïve, efetoras e de memória pode-se observar que em um todo não há um perfil de aumento destes receptores.

Populações de células T CD28-CD27⁻ e EMRA apresentam aumento de receptores de imunossenescência, por isso foram avaliados dentro de cada população a expressão de CD57 e KLRG1 mediante aos diferentes estágios da COVID-19. Foi visto um aumento de MFI de CD57 em células T CD8⁺ CD28-CD27⁺ no grupo moderado em relação ao grupo grave, mas não houve alteração de frequência nessa e nas demais populações (**FIGURA 21A, B, C e D**).

Quando observado o receptor KLRG1, houve aumento de frequência em células T CD8⁺ CD28⁺CD27⁺ no grupo oligo em relação ao grave, aumento de frequência em células T CD8⁺ CD28⁺CD27⁻ nos grupos oligo e moderado em relação ao grave e aumento de frequência em células T CD8⁺ CD28-CD27⁻ no grupo oligo em relação ao grave (**FIGURA 22A, B, C e D**). Com destaque na população de células T CD8⁺ CD28-CD27⁺ aumento de MFI de KLRG1 nos grupos oligo e moderado em relação ao grave (**FIGURA 23A e B**).

Houve aumento da frequência de CD57 em células T CD4⁺ EMRA nos grupos oligo e grave em relação ao grupo moderado (**FIGURA 24A e B**). Com destaque do

aumento de MFI de CD57 no grupo grave em relação ao grupo moderado (**FIGURA 24C e D**). Sendo assim CD57 mais aumentado na forma mais grave da COVID-19.

Em relação ao outro receptor, houve aumento de KLRG1 tanto em frequência e MFI em células T CD4+ EMRA no grupo oligo em relação ao grupo moderado (**FIGURA 25A, B, C e D**). Assim como houve aumento de KLRG1 tanto em frequência e MFI em células T CD8+ CM e EM (**FIGURAS 31A, B e C, 32A, B e C**) no grupo oligo em relação aos grupos moderado e grave, houve também aumento de frequência de KLRG1 em células T CD8+ EMRA no grupo oligo em relação ao grupo grave (**FIGURA 31A e D**).

Em modelo animal, células T CD8+ KLRG1+ efectoras são capazes de regular negativamente seu próprio receptor em condições pró-inflamatórias, sendo essencial para o desenvolvimento de células de memória periféricas com capacidade proliferativa aumentada (HERNDLER-BRANDSTETTER et al., 2018). Dessa forma o aumento de KLRG1 no grupo oligo pode não estar diretamente relacionado a imunossenescência, pelo menos em células T CD8+. Enquanto em células T CD4+ EMRA de pacientes oligo apresentam aumento dos CD57 e KLRG1 caracterizando que nesse grupo possa haver um princípio de fenótipo senescente, mas ainda carecendo de mais estudos para determinação do papel desses receptores em indivíduos menos acometidos pela doença.

No mais, aumento desses receptores CD57 e KLRG1 estão relacionados à prejuízos na resposta vacinal (BOWYER et al., 2020; SHI et al., 2014). Dessa forma, importante caracterizar o perfil de células T senescentes perante a esses receptores e como elas podem estar prejudicando na resposta vacinal em estudos futuros de pacientes vacinados pela COVID-19.

Em células T CD4+ totais houve aumento da frequência de γ H2Ax+ no grupo moderado em relação ao oligo, no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado (**FIGURA 10A e B**) e MFI houve aumento no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado (**FIGURA 10C e D**). Em células T CD8+ houve aumento de frequência e MFI de γ H2Ax nos grupos moderado e grave em relação ao grupo oligo (**FIGURA 12A, B, C e D**). Os resultados demonstram então que houve um aumento de danos no DNA, principalmente nos grupos mais afetados pela COVID-19.

Quando observado p38+ de células T CD4+ totais houve aumento da frequência nos grupos moderado e grave em relação ao grupo oligo (**FIGURA 11A e C**). Em células T CD8+ não houve diferença de frequência entre os grupos, mas MFI do grupo grave foi menor em relação ao grupo oligo (**FIGURA 13A, B e C**). Os coronavírus são capazes de ativar a via da MAP-quinase p38 (LEE et al., 2004), que é uma das responsáveis pela SASP (FREUND; PATIL; CAMPISI, 2011) e em linfócitos mantém e regula características de senescência celular (LANNA et al., 2014). Mesmo que o vírus não esteja diretamente regulando essa via, a inflamação provocada pela COVID-19 pode estar envolvida direta e/ou indiretamente nesse processo (GRIMES; GRIMES, 2020).

Nossos resultados também evidenciaram aumento de frequência e MFI de γ H2Ax em populações de memória de células T CD4+ e T CD8+ NAIVE, CM, EM e EMRA no grupo grave (**FIGURAS 26A, B, C, D e E, 27A, B e C, 28A, B e C, 33A, B, C, D e E, 34A, B e C, 35A, B, C**).

O aumento de γ H2Ax indica aumento de danos ao DNA e que de alguma forma as células T de pacientes no grupo grave com COVID-19 apresentam prejuízos no reparo do seu material genético (CELESTE et al., 2003).

Era esperado que os níveis de p38 estivessem aumentados nos grupos mais acometidos pela COVID-19, mas não foram encontradas diferenças entre os grupos nas células T NAIVE, CM, EM e EMRA (**FIGURAS 29 e 36**). Necessitam-se assim de mais estudos e outras análises para aprofundar como a via das MAPKs estariam envolvidas na COVID-19.

6 – CONCLUSÕES

Pacientes com COVID-19 apresentam sintomas e graus de acometimento que vão desde sintomas leves, moderados à graves e críticos. Os resultados demonstram que pacientes moderados e graves apresentam diversas alterações clínicas e laboratoriais hematológicas, gasométricas e bioquímicas. Esses dados evidenciam aumento inflamatório e danos sistêmicos como danos pulmonares, hepáticos, cardiovasculares e renais. No mais, os títulos de IgM e IgG decaíram ao longo do tempo em pacientes oligossintomáticos, podendo ser indicativo de prejuízos da resposta imune em pacientes convalescentes.

Por conta dessas alterações que podem levar a uma resposta imune prejudicada, foram avaliados como estavam fenotipicamente as células T de pacientes oligo, moderado e grave. Assim de acordo com os resultados da citometria, pacientes com COVID-19, principalmente do grupo grave, apresentaram uma série de características que condizem com fenótipo de células T senescentes como menor viabilidade celular, aumento de danos ao DNA visto pelo aumento de γ H2Ax em diferentes populações celulares, acúmulo de células com perdas de receptores co-estimuladores CD28 e CD27, aumento de p38, alterações nas frequências de populações de células T de memória, aumento da frequência de EMRA e aumento de CD57+ EMRA. Essas características foram mais evidenciadas em células T CD4+ do grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado.

Além disso, pacientes do grupo oligo apresentaram aumento de KLRG1 e CD57, um indicativo que a COVID-19 possa estar modulando um perfil de imunossenescência desde graus mais leves da doença. Assim esse trabalho contribui para caracterização fenotípica de células T senescentes em indivíduos de diferentes graus de acometimento da COVID-19.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMO, S. et al. Signature of long-lived memory CD8+ T cells in acute SARS-CoV-2 infection. **Nature**, v. 602, n. 7895, p. 148–155, 3 fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04280-x>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

AIELLO, A. et al. Immunosenescence and its hallmarks: How to oppose aging strategically? A review of potential options for therapeutic intervention. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 2247, p. 1–19, 1 set. 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02247/full>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

AKBAR, A. N.; FLETCHER, J. M. Memory T cell homeostasis and senescence during aging. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, p. 480–485, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.07.019>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

ALANIO, C. et al. Cytomegalovirus Latent Infection is Associated with an Increased Risk of COVID-19-Related Hospitalization. **The Journal of Infectious Diseases**, v. XX, n. XX XX, p. 1–11, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac020>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

ALEEM, A.; SAMAD, A. B. A.; SLENKER, A. K. **Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19)**. [S.l.]: StatPearls [Internet], 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570580/>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

ALI, E. T. et al. Extensive Study on Hematological, Immunological, Inflammatory Markers, and Biochemical Profile to Identify the Risk Factors in COVID-19 Patients. **International Journal of Inflammatio**, v. 2022, p. 1–11, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2022/5735546>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

AMYES, E. et al. Characterization of the CD4+ T Cell Response to Epstein-Barr Virus during Primary and Persistent Infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 6, p. 903–911, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20022058>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

APPAY, V. et al. Memory CD8+T cells vary in differentiation phenotype indifferent persistent virus infections. **Nature Medicine**, v. 8, n. 4, p. 379–385, abr. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm0402-379>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

ARCANJO, A. et al. Critically Ill Coronavirus Disease 2019 Patients Exhibit Hyperactive Cytokine Responses Associated With Effector Exhausted Senescent T Cells in Acute Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 224, p. 1672–1683, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab425>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

BALNIS, J. et al. Blood DNA methylation and COVID-19 outcomes. **Clinical**

Epigenetics, v. 13, n. 118, p. 1–16, 1 dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01102-9>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

BALUSHI, A. Al et al. Immunological predictors of disease severity in patients with COVID-19. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 110, p. 83–92, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.06.056>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

BARASHDI, M. A. Al et al. Protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC or CD45). **Journal of Clinical Pathology**, p. 548–552, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2020-206927>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

BAYATI, A. et al. SARS-CoV-2 infects cells after viral entry via clathrin-mediated endocytosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, n. 100306, p. 1–12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100306>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

BENETOS, A. et al. The Nexus between Telomere Length and Lymphocyte Count in Seniors Hospitalized with COVID-19. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 76, n. 8, p. E97–E101, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/gerona/glab026>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

BERGANTINI, L. et al. Nk and t cell immunological signatures in hospitalized patients with covid-19. **Cells**, v. 10, n. 3182, p. 1–14, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells10113182>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

BEZUIDENHOUT, M. C. et al. Correlating arterial blood gas, acid–base and blood pressure abnormalities with outcomes in COVID-19 intensive care patients. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 58, n. 2, p. 95–101, 1 mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0004563220972539>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

BIASI, S. De et al. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. **Nature Communications**, v. 11, n. 3434, p. 1–17, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17292-4>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

BILGIR, F. et al. Roles of certain biochemical and hematological parameters in predicting mortality and ICU admission in COVID-19 patients. **Revista da Associacao Medica Brasileira**, v. 67, p. 67–73, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1806-9282.67.Suppl1.20200788>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

BOSS, A. N. et al. Development of a Mortality Prediction Model in Hospitalised SARS-CoV-2 Positive Patients Based on Routine Kidney Biomarkers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7260, p. 1–13, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23137260>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

BOWYER, G. et al. Reduced Ebola vaccine responses in CMV+ young adults is associated with expansion of CD57+KLRG1+ T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 7, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20200004>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

BRASIL. **Guia de vigilância epidemiológica: emergência de saúde pública de importância nacional pela doença pelo coronavírus 2019 - covid-19**. 1. ed. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2022. v. 1. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/publicacoes-tecnicas/guias-e-planos/guia-de-vigilancia-epidemiologica-covid-19/view>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

BUCHHOLZ, V. R.; NEUENHAHN, M.; BUSCH, D. H. CD8 + T cell differentiation in the aging immune system: until the last clone standing. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 4, p. 549–554, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2011.05.002>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

CAI, Y. et al. Liver injury in COVID-19: Detection, pathogenesis, and treatment. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 22, p. 3022–3036, 2021. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v27/i22/3022.htm>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

CANÇADO, R. **COMENTÁRIO SOBRE O ESTUDO COVID-19: Attacks the 1-Beta Chain of Hemoglobin and Captures the Porphyrin to Inhibit Human Heme Metabolism. Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular**. [S.l.: s.n.], 2022. Disponível em: <https://abhh.org.br/wp-content/uploads/2020/04/COVID-19-Attacks-the-1-Beta-Chain-of-Hemoglobin-and-Captures-the-Porphyrin-to-Inhibit-Human-Heme-Metabolism-1-2.pdf>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

CANTUTI-CASTELVETRI, L. et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. **Science**, v. 370, n. 6518, p. 856–860, 13 nov. 2020. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abd2985>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

CDC. **People with Certain Medical Conditions**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

_____. **Symptoms of Coronavirus**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>.

CELESTE, A. et al. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. **Nature Cell Biology**, v. 5, n. 7, p. 675–679, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncb1004>. Acesso em: 02 de ago. de 2022.

CHAN, J. F.-W. et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, p. 221–236, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

CHEN, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507–513, fev. 2020. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7). Acesso em: 03 de ago. de 2022.

CHEN, R. et al. Cytokine Storm: The Primary Determinant for the Pathophysiological Evolution of COVID-19 Deterioration. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. 589095, p. 1–11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.589095>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

CHEN, W. et al. Effect of Direct Bilirubin Level on Clinical Outcome and Prognoses in Severely/Critically Ill Patients With COVID-19. **Frontiers in Medicine**, v. 9, n. 843505, p. 1–9, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.843505>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

CHEN, Y.; LIU, Q.; GUO, D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 418–423, abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

CHOU, J. P.; EFFROS, R. B. T CELL REPLICATIVE SENESENCE IN HUMAN AGING. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 9, p. 1680–1698, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/138161213805219711>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

COHEN, K. W. et al. Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells. **Cell Reports Medicine**, v. 2, n. 100354, p. 1-14e6, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100354>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

COPPÉ, J. et al. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 5, p. 99–118, 2010. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

COVRE, L. P. et al. Circulating Senescent T Cells Are Linked to Systemic Inflammation and Lesion Size During Human Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 3001, p. 1–12, jan. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03001>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

_____. The role of senescent T cells in immunopathology. **Aging Cell**, v. 19, n. 12, p. 1–9, 9 dez. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/accel.13272>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

CZESNIKIEWICZ-GUZIK, M. et al. T cell subset-specific susceptibility to aging. **Clin**

Immunol, v. 127, n. 1, p. 107–118, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2007.12.002>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

DALY, J. L. et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. **Scienc**e, v. 370, n. 6518, p. 861–865, 2020. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abd3072>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

DE SOUSA, C. D. K. et al. Epidemiological profile of COVID-19 in the State of Espírito Santo, Brazil, from march 2020 to june 2021. **Journal of Human Growth and Development**, v. 31, n. 3, p. 507–520, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.36311/jhgd.v31.12770>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

DIAO, B. et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 827, p. 1–7, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.00827/full>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

DOCK, J. N.; EFFROS, R. B. Role of CD8 T Cell Replicative Senescence in Human Aging and in HIV-mediated Immunosenescence. **Aging and disease**, v. 2, n. 5, p. 382–397, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22308228>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

DOLFI, D. V et al. Increased T-bet is associated with senescence of influenza virus-specific CD8 T cells in aged humans. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, p. 825–836, 2013. Disponível em: <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1189/jlb.0912438>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

DOMIZIO, J. Di et al. The cGAS–STING pathway drives type I IFN immunopathology in COVID-19. **Nature**, v. 603, n. 7899, p. 145–151, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04421-w>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

DONG, M. et al. ACE2, TMPRSS2 distribution and extrapulmonary organ injury in patients with COVID-19. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 131, n. 110678, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332220308714>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

FAJGENBAUM, D. C.; JUNE, C. H. Cytokine Storm. **The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE**, v. 382, n. 23, p. 2255–2273, 2020. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra2026131>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

FANTECELLE, C. H. et al. Transcriptomic landscape of skin lesions in cutaneous leishmaniasis reveals a strong CD8 + T cell immunosenescence signature linked to immunopathology. **Immunology**, v. 00, p. 1–12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/imm.13410>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

FARHEEN, S. et al. Patho-Physiology of Aging and Immune-Senescence: Possible Correlates With Comorbidity and Mortality in Middle-Aged and Old COVID-19 Patients. **Frontiers in Aging**, v. 2, n. 748591, p. 1–20, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fragi.2021.748591>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

FENG, Z. et al. The Novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Directly Decimates Human Spleens and Lymph Nodes. **medRxiv**, v. 12, n. 1, p. 1–18, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.03.27.20045427>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

FESSLER, J. et al. Senescent T-Cells Promote Bone Loss in Rheumatoid Arthritis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 95, p. 1–9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00095>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

FOTUHI, M. et al. Neurobiology of COVID-19. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 76, p. 3–19, 2020. Disponível em: <https://content.iospress.com/articles/journal-of-alzheimers-disease/jad200581>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

FRANZ, K. M. et al. STING-dependent translation inhibition restricts RNA virus replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 9, p. E2058–E2067, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1716937115>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

FREUND, A.; PATIL, C. K.; CAMPISI, J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 8, p. 1536–1548, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.69>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

FULOP, T. et al. On the immunological theory of aging. **Aging: Facts and Theories**, v. 39, p. 163–176, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000358904>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

GANGAEV, A. et al. Identification and characterization of a SARS-CoV-2 specific CD8+ T cell response with immunodominant features. **Nature Communications**, v. 12, n. 2593, p. 1–14, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22811-y>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

GARCIA-GASALLA, M. et al. Hyperinflammatory State and Low T1 Adaptive Immune Response in Severe and Critical Acute COVID-19 Patients. **Frontiers in Medicine**, v. 9, n. 828678, p. 1–12, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.828678>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

GATTINONI, L. et al. T memory stem cells in health and disease. **Nature Medicine**, v. 23, n. 1, p. 18–27, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm.4241>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

GORGOULIS, V. et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. **Cell**, v. 179,

n. 4, p. 813–827, 31 out. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

GORONZY, Jörg J. et al. Value of Immunological Markers in Predicting Responsiveness to Influenza Vaccination in Elderly Individuals. **Journal of Virology**, v. 75, n. 24, p. 12182–12187, dez. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.24.12182-12187.2001>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

GORONZY, Jörg J.; WEYAND, C. M. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. **Nature Immunology**, v. 14, n. 5, p. 428–436, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni.2588>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

GRAY, J. I.; WESTERHOF, L. M.; MACLEOD, M. K. L. The roles of resident, central and effector memory CD4 T-cells in protective immunity following infection or vaccination. **Immunology**, v. 154, n. 4, p. 574–581, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imm.12929>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

GREENHALGH, T. et al. Ten scientific reasons in support of airborne transmission of SARS-CoV-2. **The Lancet**, v. 397, n. 10285, p. 1603–1605, 2021. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00869-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00869-2). Acesso em: 03 de ago. de 2022.

GRIFONI, A. et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. **Cell**, v. 181, n. 7, p. 1489–1501, jun. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

GRIMES, J. M.; GRIMES, K. V. p38 MAPK inhibition: A promising therapeutic approach for COVID-19. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 144, p. 63–65, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.05.007>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

GUANÍ-GUERRA, E. et al. Diagnostic Accuracy of the RDW for Predicting Death in COVID-19. **Medicina (Lithuania)**, v. 58, n. 5, p. 1–9, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/medicina58050613>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

GUPTA, G. S. The Lactate and the Lactate Dehydrogenase in Inflammatory Diseases and Major Risk Factors in COVID - 19 Patients. **Inflammation**, p. 1–33, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10753-022-01680-7>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

HADJADJ, J. et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. **Science**, v. 369, p. 718–724, 2020. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abc6027>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

HAMMING, I. et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for

SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **Journal of Pathology**, v. 203, p. 631–637, 2004. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.1570>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

HARIHARAN, A. et al. The Role and Therapeutic Potential of NF-kappa-B Pathway in Severe COVID - 19 Patients. **Inflammopharmacology**, v. 29, n. 1, p. 91–100, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00773-9>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

HAZELDINE, J.; LORD, J. M. Immunesenescence: A Predisposing Risk Factor for the Development of COVID-19? **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 573662, p. 1–20, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.573662>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

HENRY, B. M. et al. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. **Clin Chem Lab Med**, v. 58, n. 7, p. 1021–1028, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0369>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

HENSON, S. M.; AKBAR, A. N. KLRG1-more than a marker for T cell senescence. **Age**, v. 31, n. 4, p. 285–291, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11357-009-9100-9>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

HENSON, S. M.; RIDDELL, N. E.; AKBAR, A. N. Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, n. 4, p. 476–481, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2012.04.001>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

HERNDLER-BRANDSTETTER, D. et al. KLRG1+ Effector CD8+ T Cells Lose KLRG1, Differentiate into All Memory T Cell Lineages, and Convey Enhanced Protective Immunity. **Immunity**, v. 48, n. 4, p. 716- 729.e8, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.015>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, p. 271–280, abr. 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420302294>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

HOU, Y. J. et al. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. **Cell**, v. 182, p. 429- 446.e14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.042>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, fev. 2020b. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620301835>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

HUANG, Y. et al. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, n. 9, p. 1141–1149, 2020a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

HUMPHREYS, D.; ELGHAZALY, M.; FRISAN, T. Senescence and Host–Pathogen Interactions. **Cells**, v. 9, n. 1747, p. 1–17, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells9071747>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

IFCC. **5. Biochemical Monitoring of COVID-19 Patients**. Disponível em: https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/mm6914e4.htm?s_cid=mm6914e4_w. Acesso em: 7 jun. 2022.

IWASAKI, A. What reinfections mean for COVID-19. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 3–5, jan. 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309920307830>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

JACKSON, C. B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, p. 3–20, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

JERAIKY, M. A. et al. Routine laboratory parameters predict serious outcome as well as length of hospital stay in COVID-19. **Saudi Medical Journal**, v. 42, n. 11, p. 1165–1172, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.15537/smj.2021.42.11.20210429>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

JIN, J. M. et al. Gender Differences in Patients With COVID-19: Focus on Severity and Mortality. **Frontiers in Public Health**, v. 8, n. 152, p. 1–6, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00152>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

KAECH, S. M.; CUI, W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 11, p. 749–761, 19 nov. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3307>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

KALIM, H. et al. Accelerated immune aging was correlated with lupus-associated brain fog in reproductive-age systemic lupus erythematosus patients. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 00, p. 1–7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1756-185X.13816>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

KANEKO, N. et al. Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. **Cell**, v. 183, p. 143–157, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.025>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

KANG, C. K. et al. Aberrant hyperactivation of cytotoxic T-cell as a potential determinant of COVID-19 severity. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 97, p. 313–321, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.05.106>.

Acesso em: 03 de ago. de 2022.

KARED, H. et al. CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 65, n. 4, p. 441–452, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1803-z>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

KARLSSON, A. C.; HUMBERT, M.; BUGGERT, M. The known unknowns of T cell immunity to COVID-19. **Science Immunology**, v. 5, n. eabr8063, p. 1–7, 2020. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.abe8063>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

KAUL, D. An overview of coronaviruses including the SARS-2 coronavirus – Molecular biology, epidemiology and clinical implications. **Current Medicine Research and Practice**, v. 10, n. 2, p. 54–64, mar. 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352081720300398>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

KHAN, M. et al. Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. **Cell**, v. 184, p. 5932–5949.e15, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.027>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

KLENERMAN, P. The (gradual) rise of memory inflation. **Immunological Reviews**, p. 99–112, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/imr.12653>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

KOCH, S. et al. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. **Immunity and Ageing**, v. 5, n. 6, p. 1–12, 25 jul. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1742-4933-5-6>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

KREUTMAIR, S. et al. Distinct immunological signatures discriminate severe COVID-19 from non-SARS-CoV-2-driven critical pneumonia. **Immunity**, v. 54, n. 7, p. 1578–1593.e5, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.05.002>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

KRONSTEIN-WIEDEMANN, R. et al. SARS-CoV-2 Infects Red Blood Cell Progenitors and Dysregulates Hemoglobin and Iron Metabolism. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 18, p. 1809–1821, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10322-8>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

KUILMAN, T.; PEEPER, D. S. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. **Nature Reviews**, v. 9, p. 81–94, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc2560>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

LANNA, A. et al. IFN- α Inhibits Telomerase in Human CD8 + T Cells by Both hTERT Downregulation and Induction of p38 MAPK Signaling. **The Journal of Immunology**, v. 191, p. 3744–3752, 2013. Disponível em:

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301409>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

_____. The kinase p38 activated by the metabolic regulator AMPK and scaffold TAB1 drives the senescence of human T cells. **Nature Immunology**, v. 15, n. 10, p. 965–972, out. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni.2981>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

LEE, C. et al. Altered p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Expression in Different Leukocytes with Increment of Immunosuppressive Mediators in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 7841–7847, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.12.7841>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

LI, H.; ZHOU, F.; ZHANG, L. STING, a critical contributor to SARS-CoV-2 immunopathology. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 106, p. 1–3, 30 dez. 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-022-00967-3>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

LI, Z.; BUCK, M. Neuropilin-1 assists SARS-CoV-2 infection by stimulating the separation of Spike protein S1 and S2. **Biophysical Journal**, v. 120, p. 2828–2837, 2021a. Disponível em: [https://www.cell.com/biophysj/pdfExtended/S0006-3495\(21\)00455-0](https://www.cell.com/biophysj/pdfExtended/S0006-3495(21)00455-0). Acesso em: 03 de ago. de 2022.

_____. Neuropilin-1 assists SARS-CoV-2 infection by stimulating the separation of Spike protein S1 and S2. **Biophysical Journal** 120, v. 120, p. 2828–2837, jul. 2021b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.05.026>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

LIBRI, V. et al. Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional CD4⁺ CD45RA⁺ CD27⁻ T cells: the potential involvement of interleukin-7 in this process. **Immunology**, v. 132, n. 3, p. 326–339, mar. 2011. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2567.2010.03386.x>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

LIU, H. et al. T Cell Exhaustion and Senescence in Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoma Patients. **Research Square**, p. 1–16, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-23447/v1>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

LIU, Y.-C.; KUO, R.-L.; SHIH, S.-R. COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. **Biomedical Journal**, v. 43, p. 328–333, ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.04.007>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

LÖHR, P. et al. Impact of age and gender on lymphocyte subset counts in patients with COVID-19. **Cytometry**, v. 2, p. 1–9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24470>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

LUO, X.-H. et al. T cell immunobiology and cytokine storm of COVID-19. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 93, p. 1–15, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.1111/sji.12989>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

MACHADO, T. R.; MACHADO, T. R.; PASCUTTI, P. G. The p38 MAPK Inhibitors and Their Role in Inflammatory Diseases. **Chemistry Select**, v. 6, p. 5729–5742, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/slct.202100406>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

MANGALMURTI, N.; HUNTER, C. A. Cytokine Storms: Understanding COVID-19. **Immunity**, v. 53, p. 1–7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.017>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

MANN, E. R. et al. Longitudinal immune profiling reveals distinct features of COVID-19 pathogenesis. **medRxiv**, p. 1–17, 2020. Disponível em: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.06.13.20127605v1>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

MARTÍNEZ-LIMÓN, A. et al. The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, p. 1–18, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21061913>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

MARTINEZ, E. Z. et al. Comorbidities and the risk of death among individuals infected by COVID-19 in Espírito Santo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, n. e0138-2021, p. 1–6, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0138-2021>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

MATHEW, D. et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. **Science**, v. 369, n. 1209, p. 1–17, 2020. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abc8511>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

MAXMEN, A. WHO report into COVID pandemic origins zeroes in on animal markets, not labs. **Nature**, v. 592, n. 7853, p. 173–174, 8 abr. 2021. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/d41586-021-00865-8>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

MAZZONI, A. et al. Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 9, p. 4694–4703, 2020. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/138554>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

MCMAHAN, K. et al. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. **Nature**, v. 590, n. 7847, p. 630–634, 25 fev. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-03041-6>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

MDKHANA, B. et al. Nucleic Acid-Sensing Pathways During SARS-CoV-2 Infection: Expectations versus Reality. **Journal of Inflammation Research**, v. 14, p. 199–216, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/JIR.S277716>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

MEYER, N. J.; GATTINONI, L.; CALFEE, C. S. Acute respiratory distress syndrome. **The Lancet**, v. 398, n. 10300, p. 622–637, 2021. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00439-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00439-6). Acesso em: 03 de ago. de 2022.

MODERBACHER, C. R. et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. **Cell**, v. 183, n. 4, p. 996–1012.e19, nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.038>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

MONDAL, S. et al. Blood Gas Analysis among COVID-19 Patients: A Single Centre Retrospective Observational Study. **Journal Of Clinical and Diagnostic Research**, v. 15, n. 8, p. 1–4, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2021/49835.15185>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

MORENO-TORRES, V. et al. Red blood cell distribution width as a marker of hyperinflammation and mortality in COVID-19. **Annals of Palliative Medicine**, p. 1–13, 2022. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.21037/apm-22-119>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

MORI, Y. et al. KIM-1/TIM-1 is a Receptor for SARS-CoV-2 in Lung and Kidney. **medRxiv**, p. 1–28, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.09.16.20190694>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

MUÑOZ-ESPÍN, D.; SERRANO, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 7, p. 482–496, 23 jul. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3823>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

MURAKAMI, N.; RIELLA, L. V. Co-Inhibitory Pathways and Their Importance in Immune Regulation. **Transplantation**, v. 98, n. 1, p. 3–14, 2014. Disponível em: https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2014/07150/Co_Inhibitory_Pathways_and_Their_Importance_in.3.aspx. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

NADIM, M. K. et al. COVID-19- associated acute kidney injury: consensus report of the 25th Acute Disease Quality Initiative (ADQI) Workgroup. **Nature Reviews Nephrology**, v. 16, p. 747–764, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41581-020-00356-5>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

NEHME, J. et al. Cellular senescence as a potential mediator of COVID-19 severity in the elderly. **Aging Cell**, v. 19, n. 10, p. 1–14, 21 out. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/accel.13237>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

NEIDLEMAN, J. et al. SARS-CoV-2-Specific T Cells Exhibit Phenotypic Features of Helper Function, Lack of Terminal Differentiation, and High Proliferation Potential. **Cell Reports Medicine**, v. 1, n. 10081, p. 1–12.e4, set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100081>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

NISSL, J.; SEKINE, T.; BUGGERT, M. T cell immunity to SARS-CoV-2. **Seminars in Immunology**, n. 55, p. 1–11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2021.101505>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

PALLADINO, M. Complete blood count alterations in COVID-19 patients. **Biochemia medica**, v. 31, n. 3, p. 403–415, 15 out. 2021. Disponível em: <https://www.biochemia-medica.com/en/journal/31/3/10.11613/BM.2021.030501>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

PARK, A.; IWASAKI, A. Type I and Type III Interferons – Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. **Cell Host and Microbe**, v. 27, n. 6, p. 870–878, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.008>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

PATTERSON, H. et al. Protein kinase inhibitors in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 176, n. 1, p. 1–10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cei.12248>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

PAWELEC, G. Age and immunity: What is “immunosenescence”? **Experimental Gerontology**, v. 105, p. 4–9, 1 maio 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2017.10.024>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

_____. Immunosenescence: Role of cytomegalovirus. **Experimental Gerontology**, v. 54, p. 1–5, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2013.11.010>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

PEREIRA, B. I. et al. Senescent cells evade immune clearance via HLA-E-mediated NK and CD8+ T cell inhibition. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10335-5>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

_____. Sestrins induce natural killer function in senescent-like CD8+ T cells. **Nature Immunology**, v. 21, n. 6, p. 684–694, 30 jun. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-020-0643-3>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

QIU, P. et al. Clinical characteristics, laboratory outcome characteristics, comorbidities, and complications of related COVID-19 deceased: a systematic review and meta-analysis. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 32, p. 1869–1878, 1 set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40520-020-01664-3>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

RAGAB, D. et al. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 1446, p. 1–4, 16 jun. 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.01446/full>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

RAHIMMANESH, I. et al. Conceptual Framework for SARS-CoV-2 – Related Lymphopenia. **Advanced Biomedical Research**, v. 11, n. 16, p. 1–4, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8977610/>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

RAMOS-CASALS, M.; BRITO-ZERÓN, P.; MARIETE, X. Systemic and organ-specific immune-related manifestations of COVID-19. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 17, p. 315–332, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41584-021-00608-z>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

RANIERI, V. M. et al. Acute respiratory distress syndrome: The Berlin definition. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 307, n. 23, p. 2526–2533, 2012. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/1160659>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

RAPHAEL, I.; JOERN, R. R.; FORSTHUBER, T. G. Memory CD4+ T Cells in Immunity and Autoimmune Diseases. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 1–23, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells9030531>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

REDDY, R. K. et al. The effect of smoking on COVID-19 severity: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 2, p. 1045–1056, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jmv.26389>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

RHA, M.; SHIN, E. Activation or exhaustion of CD8+ T cells in patients with COVID-19. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 18, p. 2325–2333, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-021-00750-4>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

RICCI, D. et al. Innate Immune Response to SARS-CoV-2 Infection: From Cells to Soluble Mediators. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7017, p. 1–20, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22137017>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

RIPPERGER, T. J. et al. Orthogonal SARS-CoV-2 Serological Assays Enable Surveillance of Low-Prevalence Communities and Reveal Durable Humoral Immunity. **Immunity**, v. 53, n. 5, p. 925–933.e4, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.10.004>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

RODIER, F. et al. DNA-SCARS: Distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 1, p. 68–81, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jcs.071340>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

RODRIGUEZ, I. J. et al. Immunosenescence Study of T Cells: A Systematic Review. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 604591, p. 1–17, 15 jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604591>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

SABÓIA, G. et al. **Anvisa aprova uso emergencial das vacinas CoronaVac e**

AstraZeneca no Brasil. Disponível em: <https://noticias.uol.com.br/saude/ultimas-noticias/redacao/2021/01/17/anvisa-aprova-pedido-de-vacina-do-butantan-e-da-fiocruz.htm>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

SABOURI, A. H. et al. Impaired function of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)– specific CD8+ T cells in HTLV-1 – associated neurologic disease. **IMMUNOBIOLOGY**, v. 112, n. 6, p. 2411–2420, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-140335>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

SAHA, A. et al. Evolving Paradigm of Prothrombin Time Diagnostics with Its Growing Clinical Relevance towards Cardio-Compromised and COVID-19 Affected Population. **Sensors**, v. 21, n. 2636, p. 1–33, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/s21082636>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. CENTRAL MEMORY AND EFFECTOR MEMORY TCELL SUBSETS: Function, Generation, and Maintenance. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 745–763, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

SBAC. **Alterações laboratoriais em pacientes com Covid-19.** Disponível em: <https://www.sbac.org.br/blog/2020/03/26/alteracoes-laboratoriais-em-pacientes-com-covid19/>. Acesso em: 7 jun. 2022.

SCHULIEN, I. et al. Characterization of pre-existing and induced SARS-CoV-2-specific CD8+ T cells. **Nature Medicine**, v. 27, p. 78–85, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-01143-2>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

SEGUNDO, D. S. et al. Innate and adaptive immune assessment at admission to predict clinical outcome in covid-19 patients. **Biomedicines**, v. 9, n. 917, p. 1–13, 1 ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080917>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

SEKINE, T. et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. **Cell**, v. 183, p. 158–168, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.017>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

SETTE, A.; CROTTY, S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. **Cell**, v. 184, n. 4, p. 861–880, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.007>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

SHI, L. et al. KLRG1 Impairs CD4 + T Cell Responses via p16 ink4a and p27 kip1 Pathways: Role in Hepatitis B Vaccine Failure in Individuals with Hepatitis C Virus Infection. **The Journal of Immunology**, v. 192, p. 649–657, 2014. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/192/2/649>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

SOBRAL, M. F. F. et al. A retrospective cohort study of 238,000 COVID-19 hospitalizations and deaths in Brazil. **Scientific Reports**, v. 12, n. 3529, p. 1–11,

2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07538-0>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

SONG, J. et al. Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19. **Nature Communications**, v. 11, n. 3410, p. 1–10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17240-2>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

SOUZA, F. S. H. de et al. On the analysis of mortality risk factors for hospitalized COVID-19 patients: A data-driven study using the major Brazilian database. **PLoS ONE**, p. 1–21, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248580>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

STAHL, E. C.; BROWN, B. N. Cell Therapy Strategies to Combat Immunosenescence. **Organogenesis**, v. 11, p. 159–172, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15476278.2015.1120046>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

SUNGNAK, W. et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. **Nature Medicine**, v. 26, n. 5, p. 681–687, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0868-6>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

SURMA, S.; BANACH, M.; LEWEK, J. COVID-19 and lipids. The role of lipid disorders and statin use in the prognosis of patients with SARS-CoV-2 infection. **Lipids in Health and Disease**, v. 20, n. 141, p. 1–14, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12944-021-01563-0>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

SWAIN, S. L.; MCKINSTY, K. K.; STRUTT, T. M. Expanding roles for CD4 + T cells in immunity to viruses. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. February, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri3152>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

TEDESCHI, V. et al. CD8+ T Cell Senescence: Lights and Shadows in Viral Infections, Autoimmune Disorders and Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3374, p. 1–14, 1 mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23063374>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

THORNE, L. G. et al. SARS-CoV-2 sensing by RIG-I and MDA5 links epithelial infection to macrophage inflammation. **The EMBO Journal**, v. 40, n. 15, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.15252/embj.2021107826>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

TOVAR-SALAZAR, A. et al. Regulatory function of cytomegalovirus-specific CD4 + CD27 – CD28 – T cells. **Virology**, v. 398, p. 158–167, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.038>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

TOVAR-SALAZAR, A.; WEINBERG, A. Cytomegalovirus infection in HIV-infected and uninfected individuals is characterized by circulating regulatory T cells of unconstrained antigenic specificity. **PLoS ONE**, p. 1–14, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180691>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

TROY, S. B. et al. Association of CMV, HBV, or HCV co-infection with vaccine response in adults with well-controlled HIV infection. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 12, n. 5, p. 1295–1299, 3 maio 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2015.1121336%0ASHORT>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

URRA, J. M. et al. Selective CD8 cell reduction by SARS-CoV-2 is associated with a worse prognosis and systemic inflammation in COVID-19 patients. **Clinical Immunology**, v. 217, 1 ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108486>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

VABRET, N. et al. Review Immunology of COVID-19: Current State of the Science. **Immunity**, v. 52, p. 910–941, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.002%0A>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

VARDHANA, S. A.; WOLCHOK, J. D. The many faces of the anti-COVID immune response. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 6, p. 1–10, 1 jun. 2020. Disponível em: <https://rupress.org/jem/article/doi/10.1084/jem.20200678/151725/The-many-faces-of-the-antiCOVID-immune-responseA>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

VELAVAN, T. P.; MEYER, C. G. Mild versus severe COVID-19: Laboratory markers. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 95, p. 304–307, 1 jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.061>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

VUKMANOVIC-STEJIC, M. et al. The Characterization of Varicella Zoster Virus-Specific T Cells in Skin and Blood during Aging. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 7, p. 1752–1762, jul. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2015.63>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

WANG, F. et al. The laboratory tests and host immunity of COVID-19 patients with different severity of illness. **JCI Insight**, v. 5, n. 10, p. 1–11, 21 maio 2020. Disponível em: <https://insight.jci.org/articles/view/137799>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

WANG, S. et al. AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells. **Cell Research**, v. 31, n. 2, p. 126–140, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00460-y>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

WEISKOPF, D. et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. **Science Immunology**, v. 5, n. 48, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.abd2071>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

WEITZMAN, M. D.; WEITZMAN, J. B. What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity. **Cell Host and Microbe**, v. 15, n. 3, p. 283–294, 12 mar. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.010>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

WENZHONG, L.; HUALAN, L. COVID-19: Attacks the 1-beta Chain of Hemoglobin to Disrupt Respiratory Function and Escape Immunity. **ChemRxiv**, p. 1–31, 2022. Disponível em: <https://chemrxiv.org/engage/chemrxiv/article-details/61ec153b8d70c3d3600a0e6b>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

WESTMEIER, J. et al. Impaired cytotoxic CD8+ T cell response in elderly COVID-19 patients. **mBio**, v. 11, n. 5, p. 1–13, 1 set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.02243-20>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

WHO. **Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it**. Disponível em: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it). Acesso em: 4 jan. 2021c.

_____. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 1 abr. 2021a.

_____. **WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020**. Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>. Acesso em: 1 abr. 2021b.

WOOL, G. D.; MILLER, J. L. The Impact of COVID-19 Disease on Platelets and Coagulation. **Pathobiology**, v. 88, n. 1, p. 15–27, 1 jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000512007>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

WU, J. et al. Immunological Profiling of COVID-19 Patients with Pulmonary Sequelae. **mBio**, v. 12, n. 5, p. 1–16, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.01599-21>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

XINHUA. **New-type coronavirus causes pneumonia in Wuhan: expert**. Disponível em: http://www.xinhuanet.com/english/2020-01/09/c_138690570.htm. Acesso em: 5 abr. 2021.

XU, Z. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 4, p. 420–422, abr. 2020. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X). Acesso em: 03 de ago. de 2022.

YAMADA, Taisho et al. RIG-I triggers a signaling-abortive anti-SARS-CoV-2 defense in human lung cells. **Nature Immunology**, v. 22, n. 7, p. 820–828, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-021-00942-0>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

YAMADA, Takayuki et al. Value of leukocytosis and elevated C-reactive protein in predicting severe coronavirus 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. **Clinica Chimica Acta**, v. 509, p. 235–243, 1 out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.008>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

YANG, J. et al. Seroprevalence and dynamics of anti-SARS-CoV-2 antibodies: a longitudinal study based on patients with underlying diseases in Wuhan. **Respiratory Research**, v. 23, n. 188, p. 1–12, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02096-5>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

YAO, Z. et al. Immune environment modulation in pneumonia patients caused by coronavirus: SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2. **Aging**, v. 12, n. 9, p. 7639–7651, 2 maio 2020. Disponível em: <https://www.aging-us.com/lookup/doi/10.18632/aging.103101>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

YIN, T. et al. Prevalence of comorbidity in Chinese patients with COVID-19: systematic review and meta-analysis of risk factors. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 200, p. 1–13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-021-05915-0>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

ZHANG, J. et al. Clinical, radiological, and laboratory characteristics and risk factors for severity and mortality of 289 hospitalized COVID-19 patients. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 76, n. 2, p. 533–550, 1 fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/all.14496>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

ZHANG, N.; BEVAN, M. J. CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. **Immunity**, v. 35, n. 2, p. 161–168, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.010>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

ZHANG, Y. et al. Telomere Length in Peripheral Blood Lymphocytes Contributes to the Development of HPV-Associated Oropharyngeal Carcinoma. **Cancer Res**, v. 73, n. 19, p. 20–24, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0881>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

ZHOU, F. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult in patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, 2020b. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3). Acesso em: 03 de ago. de 2022.

ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 12 mar. 2020a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

ZHOU, Y. et al. Aberrant pathogenic GM-CSF+ T cells and inflammatory CD14+CD16+ monocytes in severe pulmonary syndrome patients of a new coronavirus. **bioRxiv preprint**, p. 1–10, 2020c. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.02.12.945576>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

ZHUANG, Z. et al. Mapping and role of T cell response in SARS-CoV-2-infected mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 4, p. 1–13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20202187>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

ZIEGLER, C. G. K. et al. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. **Cell**, v. 181, n. 5, p. 1016–1035, maio 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420305006>. Acesso em: 03 de ago. de 2022.

APÊNDICE A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

UFES - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO CASSIANO
ANTÔNIO DE MORAES DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
ESPIRITO SANTO -
HUCAM/UFES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do papel de células T citotóxicas terminalmente diferenciadas na imunopatogênese da COVID-19.

Pesquisador: Daniel Claudio de Oliveira Gomes

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 32171120.0.0000.5071

Instituição Proponente: Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.049.345

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo com recrutamento de 45 pacientes testados positivos para COVID-19 por meio de RT-PCR e/ou teste rápido IgG e IgM, com idade entre 18 e 65 anos e que apresentam diferentes estágios de manifestação da doença (assintomático ou pouco sintomático, moderado e severo. Serão coletados 25 mL de sangue de cada voluntário para o processamento e obtenção do soro e de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) e para o isolamento de células será utilizado seleção positiva com beads magnéticas.

O protocolo de estudo quer testar a hipótese de que os pacientes com COVID-19 possuem linfócitos T CD8+ circulantes altamente diferenciadas e que expressam receptores de morte celular não específica, contribuindo assim para a imunopatogênese da doença.

O estudo será realizado com instituição parceira (hospital referencia para COVID-19 no Estado do Espírito Santo)

Objetivo da Pesquisa:

Compreender os mecanismos associados ao desenvolvimento e atividade funcional

Endereço: Avenida Marechal Campos, 1355

Bairro: Santos Dumont

CEP: 29.043-900

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7326

E-mail: cep@hucam.edu.br

UFES - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO CASSIANO
ANTÔNIO DE MORAES DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
ESPIRITO SANTO -
HUCAM/UFES



Continuação do Parecer: 4.049.345

das células T CD8+ citotóxicas terminalmente diferenciadas durante a infecção pelo SARS-CoV-2 em humanos;

Investigar o perfil fenotípico das células T CD8+ durante os diferentes estágios clínicos da COVID-19 (assintomático ou pouco sintomático, moderado e severo), relacionado ao estado de diferenciação e expressão de receptores de células NK.

- Avaliar a atividade citotóxica e inflamatória de células T CD8+-TD circulantes nos diferentes estágios clínicos da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores esclarecem sobre riscos e benefícios adequadamente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo factível, viável e importante para geração de conhecimento na área pretendida.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sem óbices éticos.

Recomendações:

Dar crédito institucional nas publicações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em relatórios parciais e ou final ao CEP avaliador, sugiro o pesquisador responsável indicar sobre destinação das amostras de sangue.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1551952.pdf	20/05/2020 17:01:08		Aceito
Outros	AnuenciaJaymeSN.pdf	20/05/2020 17:00:38	Daniel Claudio de Oliveira Gomes	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	20/05/2020 16:56:07	Daniel Claudio de Oliveira Gomes	Aceito

Endereço: Avenida Marechal Campos, 1355

Bairro: Santos Dumont

CEP: 29.043-900

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7326

E-mail: cep@hucam.edu.br

UFES - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO CASSIANO
ANTÔNIO DE MORAES DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
ESPIRITO SANTO -
HUCAM/UFES



Continuação do Parecer: 4.049.345

Outros	TermodeAnuenciaPreviaSESA.pdf	13/05/2020 16:41:10	Daniel Claudio de Oliveira Gomes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2020COVID19Pacientes.pdf	13/05/2020 16:31:51	Daniel Claudio de Oliveira Gomes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCOVID19HospitalJaymeSantosN eves.pdf	13/05/2020 16:29:25	Daniel Claudio de Oliveira Gomes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

VITORIA, 26 de Maio de 2020

**Assinado por:
Claudio Piras
(Coordenador(a))**

Endereço: Avenida Marechal Campos, 1355

Bairro: Santos Dumont

UF: ES

Município: VITORIA

CEP: 29.043-900

Telefone: (27)3335-7326

E-mail: cep@hucam.edu.br

APÊNDICE B – MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas – UFES Núcleo de Doenças Infecciosas Laboratório de Imunobiologia

Projeto de Pesquisa: Avaliação do papel de células T citotóxicas terminalmente diferenciadas na imunopatogênese da COVID-19

Pesquisadores e suas funções:

Dr. Daniel Cláudio de O. Gomes – Coordenador – UFES
– Pesquisador executor

Nome do(a) voluntário(a) ou responsável: _____

Data de Nascimento: _____

O(a) Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), de uma pesquisa científica conduzida pelo Laboratório de Imunobiologia – UFES, que tem como objetivo compreender o papel de respostas imunológicas na COVID-19, uma importante doença que está afetando pessoas no mundo todo, incluindo o Brasil, e a qual ainda não se tem tratamento ou vacina.

Este documento procura fornecer ao(a) Sr.(a) as informações necessárias sobre todos os procedimentos a serem realizados e os benefícios. O(a) Sr.(a) poderá se recusar a participar da pesquisa ou dela se afastar a qualquer momento, sem que isso lhe venha causar constrangimento, prejuízo ou penalidade.

Antes de assinar este termo, o(a) Sr.(a) deve informar-se plenamente com o seu médico acompanhante e com os pesquisadores, perguntando sobre quaisquer dúvidas que achar importante.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES

- 1- **Procedimentos a serem realizados:** coleta de amostra de sangue. As amostras destinadas à pesquisa serão processadas no Laboratório de Imunologia da UFES (Av. Mal. Campos, 1468 – Santa Cecília, Vitória) e serão utilizadas apenas para a pesquisa.
- 2- **Benefícios:** os resultados encontrados pelo laboratório serão encaminhados ao seu médico na forma de um relato e contribuirão para um melhor entendimento da doença e para desenvolvimento futuro de novos tratamentos e vacinas.
- 3- **Riscos potenciais:** tontura, dor e manchas arroxeadas no braço podem ocorrer devido ao processo de coleta de sangue.
- 4- **Despesas e compensação financeira:** todos os procedimentos realizados na pesquisa não implicam em custo algum para você. Os procedimentos realizados também não envolverão nenhuma compensação financeira.
- 5- **Utilização de registros médicos e confidencialidade:** sua identidade será transformada em código. Todas as informações obtidas serão mantidas sob total anonimato e confidencialidade

(segredo), a menos que seja exigido por lei. Os registros médicos que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados pelo Comitê de Ética. Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

- 6- **Dúvidas:** uma cópia deste termo será entregue ao (à) Sr.(a) e em caso de dúvidas, no fim do documento encontra-se o contato do CEP e dos pesquisadores envolvidos no projeto que podem esclarecer qualquer assunto que achar pertinente.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, declaro estar ciente do inteiro teor deste **Termo de Consentimento Livre Esclarecido** e que decido participar, como paciente, da investigação proposta intitulada *“Avaliação do papel de células T citotóxicas terminalmente diferenciadas na imunopatogênese da COVID-19”*.

Declaro ainda que tive oportunidade de perguntar sobre a pesquisa e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa ou dela abandonar a qualquer momento e autorizo a utilização dos meus registros médicos (prontuários) pelos pesquisadores, autoridades regulatórias e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital. Os pesquisadores declaram ainda que cumprirão todo o conteúdo aqui apresentado.

Assinatura do participante:

Assinatura do investigador responsável:

RG: _____

Vitória – ES, ____ de _____ de 20____

Contatos

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas
Av. Marechal Campos, 1469, Maruípe, Vitória
E-mail: cep@hucam.edu.br

Prof. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes
Núcleo de Doenças Infecciosas - UFES
Telefones:
E-mail:

APÊNDICE C – ARTIGO DA DISSERTAÇÃO

ANÁLISE DO PERFIL DE IMUNOSSENESCÊNCIA EM CÉLULAS T DE PACIENTES EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA INFECÇÃO POR SARS-COV-2

ISABELA VALIM SARMENTO*, DANIEL CLAUDIO DE OLIVEIRA GOMES*

*PROGRAMA DE POS GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO (PPGDI/UFES)

INTRODUÇÃO

A COVID-19, doença da atual pandemia, causada pelo SARS-CoV-2 já fez mais de bilhões de mortes e ainda continua um problema mundial. Os contaminados ser assintomáticos, apresentar um estágio leve, moderado, grave/severo ou crítico (BRASIL, 2022, p. 11-12). Os sintomas costumam aparecer de 2 a 14 dias após a infecção e incluem desde tosse, febre, coriza, dor de garganta, dificuldade para respirar, anosmia e/ou disgeusia (CDC, 2021; CHEN et al., 2020). Também podem surgir falta de ar, dores musculares, confusão mental, dores no peito, diarreia e dependendo do estágio e da gravidade da doença podem levar a falência de vários órgãos e a morte (CHEN et al., 2020). Pacientes graves evoluem para o quadro de dispneia, hipoxemia e progressivamente para o quadro de síndrome respiratória aguda grave (ARDS).

As células T são observadas desde a fase aguda da infecção (WEISKOFF et al., 2020; SEKINE et al., 2020). As frequências relativas e os números absolutos de T CD4+ e T CD8+ foram mais baixos em pacientes moderados e graves em relação aos controles saudáveis (SEKINE et al., 2020). A linfopenia na fase aguda pode estar associada ao maior deslocamento dessas células aos órgãos afetados pela COVID-19 (NIESSL; SEKINE; BUGGERT, 2021; VABRET et al., 2020).

Existe um fenótipo (hiper)ativado através dos receptores CD69, CD38, CD44, HLA-DR altamente expressos em células T CD4+ e CD8+ de pacientes em diferentes estágios da COVID-19. Além disso, células T CD4+ co-expressando IFN- γ e GM-CSF estavam mais presentes em pacientes com COVID-19 internados em UTI, indicando que elas podem desempenhar um papel crítico nas respostas (hiper)inflamatórias da doença (ZHOU et al., 2020).

Pacientes acometidos com as formas mais graves da COVID-19 apresentam aumento de receptores inibitórios como PD-1/PDL1 e TIM-3 (BIASI et al., 2020; DIAO et al., 2020; SEKINE et al., 2020; SONG et al., 2020; WANG et al., 2020). Esses receptores estão associados na redução das capacidades efetoras das células T (MURAKAMI; RIELLA, 2014). Além disso, há acúmulo de células T altamente diferenciadas que re-expressam CD45RA (EMRA) e células efetoras terminalmente diferenciadas (TE) (ADAMO et al., 2021; BIASI et al., 2020; GARCIA-GASALLA et al., 2022; MATHEW et al., 2020); aumento de NKR em células T e receptores de células altamente diferenciadas, como CD57, KLRG1 e NKG2A (GANGAEV et al., 2021; SCHULIEN et al., 2021); aumento de citotoxicidade (BERGANTINI et al., 2021; KANG et al., 2020; SONG et al., 2020; WESTMEIER et al., 2020); e presença de danos no DNA nuclear e alterações no tamanho telomérico

(BALNIS et al., 2021; BENETOS et al., 2021). Características encontradas em um fenótipo de senescência celular.

Outros fatores envolvidos no fenótipo senescente são a perda progressiva de receptores co-estimuladores CD27 e CD28 (AIELLO et al., 2019; GATTINONI et al., 2017; GORONZY, Jörg J.; WEYAND, 2013); redução no tamanho de telômeros e alterações na atividade da enzima telomerase (MUÑOZ-ESPÍN; SERRANO, 2014); bem como aquisição do fenótipo secretório associado a senescência (SASP) (COPPÉ et al., 2010). O SASP é caracterizado pelo aumento na produção de citocinas pro-inflamatórias (interleucinas (ILs) como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α), quimiocinas (CXCL-1 e CXCL-2) e mediadores inflamatórios (GM-CSF) (COPPÉ et al., 2010). Um dos mecanismos envolvidos no SASP é através da fosforilação da MAPK p38, que ativa o fator de transcrição NF- κ B (FREUND; PATIL; CAMPISI, 2011). Acredita-se também que alguns vírus como SARS-CoV-2 podem ativar a via da MAPK p38, liberando algumas citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , IL-1 β), que aumentam a regulação da via NF- κ B (HARIHARAN et al., 2021).

Desse modo, este estudo tem como interesse avaliar como estão os diferentes fenótipos e atividade funcional das células T, CD4+ e CD8+, além de analisar a diferenciação e senescência dessas células na infecção pelo SARS-CoV-2 de humanos em diferentes estágios da COVID-19. Visto que o acúmulo de células T senescentes estão associadas a imunopatogênese de diversas infecções (COVRE et al., 2019; DOLFI et al., 2013; LIU, H. et al., 2020; TEDESCHI et al., 2022; TROY et al., 2016) e os acometidos pela COVID-19 apresentam inúmeros fatores que podem estar associados a imunossenescência como aumento de frequência de EMRA, NKRs, SASP e citotoxicidade.

MÉTODOS

ASPECTOS ÉTICOS E SELEÇÃO DE PACIENTES

O projeto teve aprovação ética do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Cassiano Moraes (HUCAM) – UFES, número referencial # 32171120.0.0000.5071. Foram selecionados pacientes entre 18 e 65 anos, positivamente diagnosticados com COVID-19 (diagnóstico molecular RT-PCR (*swab* nasofaríngeo) e/ou diagnóstico imunológico por ELISA para IgM/IgG) para SARS-CoV-2), atendidos nos serviços dos hospitais HUCAM (Vitória, ES), do Hospital Jayme dos Santos Neves (Serra, ES) e do Hospital Dório Silva (Serra, ES). Os pacientes e/ou familiares que consentiram em participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Classificados em 3 grupos de estudo (Oligossintomáticos, Moderados e Graves), segundo as diretrizes para diagnóstico e tratamento da COVID-19 do Ministério da Saúde do Brasil. Indivíduos com histórico de neoplasia, desordens imunossupressivas e/ou que estiveram em uso crônico de retrovirais foram excluídos do estudo.

ANÁLISES DOS PRONTUÁRIOS E EXAMES LABORATORIAIS

Exames como hemograma, bioquímicos, gasométricos e as imunoglobulinas foram incluídos no estudo e os valores de referência de cada exame foram extraídos dos laboratórios de análises clínicas dos hospitais e clínicas em que foram realizados.

COLETA DE AMOSTRAS E ISOLAMENTO DE CÉLULAS

As PBMC foram obtidas do tubo de coleta com heparina, separadas por meio de gradiente de concentração utilizando Ficoll-Hypaque (GE Healthcare) e posteriormente armazenadas em meio de congelamento celular (10%

Dimetilsulfóxido (DMSO) em Soro Fetal Bovino (SFB) até o uso. Para a realização dos experimentos, as células foram descongeladas, feito a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer e posto em estufa de CO₂ com RPMI completo por no mínimo 4h. **CITOMETRIA DE FLUXO E FENOTIPAGEM**

Cerca de 1 x 10⁶ células/ml foram transferidas para uma placa de 96 poços de fundo cônico e centrifugadas. Após o processo, as células foram ressuspensas e incubadas com marcação para viabilidade celular Live/Dead (Zombie NIR) por 15 min (para mais detalhes ver **TABELA 1**). Após isso, foram incubadas com os anticorpos para marcação de superfície extracelular por cerca de 15min (**TABELA 1**). Depois esses anticorpos foram fixados e as células adquiridas no citômetro. Para outra marcação extracelular foi fixada com PBS + 2% paraformaldeído por 10min a 37°C e permeabilizadas com BD Phosflow™ Perm Buffer III [BD Biosciences cat# 558050] por 30min no gelo (freezer -20°C) para anticorpos p-p38 (PE) e p-yH2Ax (FITC) por 30min (**TABELA 1**), após isso foram adquiridas no citômetro. A aquisição se deu de 100.000 a 150.000 células/eventos por amostra dentro do *gate single cells* no equipamento CytoFLEX LX [Beckman Coulter Life Sciences, USA] e analisadas no software FlowJo versão 10.8.1 para Mac OS X.

TABELA 7. Descrição dos anticorpos usados para marcação da PBMC para citometria.

ANTICORPO	CONJUGADO	CLONE	ISOTIPO	CATÁLOGO #	MARCA	DILUIÇÃO
CD57	BV421	NK-1	Mouse IgM	563896	BD Pharmingen	1:50
CD3	BV510	OKT3	Mouse IgG2a	317332,	BioLegend	1:50, 1:40*
CD45RA	BV605	HI100	Mouse IgG2b	304134	BioLegend	1:50
CD28	PE	CD28.2	Mouse (C3H x BALB/c) IgG1	555729	BD Pharmingen	1:50
CD56	PE/Dazzle 594	HCD56	Mouse IgG1	318348	BioLegend	1:100
CD4	PerCP-Cy5.5, PE-Cy 5*	RPA-T4	Mouse IgG1	300530, 15-0049-42	BioLegend, eBioscience	1:50
CD27	PE-Cy7	M-T271	Mouse BALB/c IgG1	560609	BD Pharmingen	1:50
KLRG1	APC	REA261	Recombinant human IgG1	130-103-639	REAFinity	1:50
CD8	Alexa Fluor 700	RPA-T8	Mouse IgG1	557945	BD Pharmingen	1:50
p-p38	Alexa Fluor 647	36/p38 (pT180/pY182)	Mouse IgG1	612595	BD Pharmingen	1:20
p-yH2Ax	FITC	2F3	Mouse IgG1	613404	BioLegend	1:20
Fixable Viability Kit	Zombie NIR			77184	BioLegend	1:1000

DETERMINAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS T

Estratégia de análise geral para determinação das populações de linfócitos se deu primeiramente por tamanho (FSC-H) e granulosidade (SSC-H), *singles cells* (FSC-H x FSC-A), células viáveis (DEAD-, FSC-H x NIR), população de células T CD3+ (CD56 PE/Dazzle 594 x CD3 BV510) e determinação das populações T CD4+ e T CD8+ totais (CD4 PerCP-Cy5.5 ou PE-Cy5 x CD8 Alexa Fluor 700) (**FIGURA 1**).

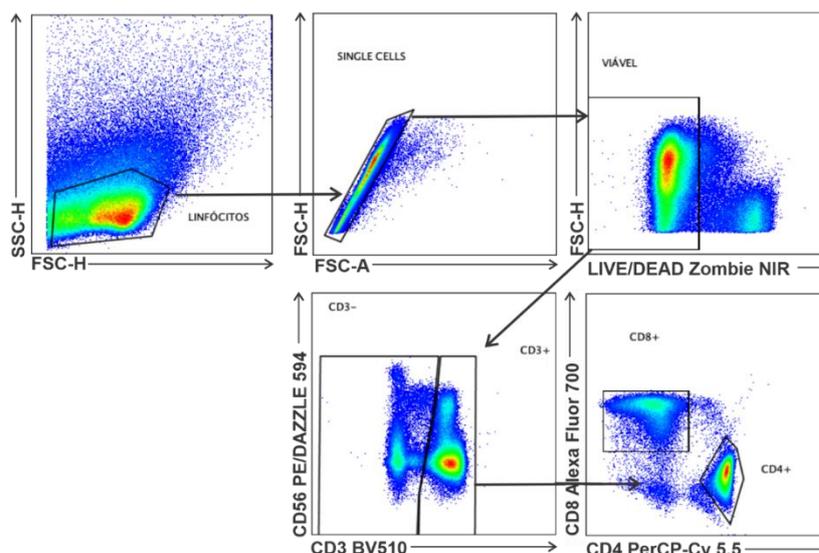


FIGURA 37. Estratégia de análise para definição das populações de células T.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism versão 9.1.1 para Mac OS X. Os dados foram representados por média \pm erro padrão da média em tabelas e/ou gráficos. Os valores considerados significativos quando $p < 0,05$. Para retirada/exclusão de *outliers* foi utilizado o método de ROUT ($Q = 1\%$). O teste de Mann-Whitney para dados não pareados e o Teste Wilcoxon para dados pareados foram realizados para todas as variáveis contínuas não paramétricas. Para mais de três variáveis não paramétricas foram realizados o Teste de Kruskal-Wallis para dados não pareados, Teste de Friedman para dados pareados e *post-hoc* "Original FDR method of Benjamini and Hochberg".

RESULTADOS

DADOS GERAIS DOS PACIENTES

Foram arrolados ao todo cerca de 108 pacientes para análises de exames laboratoriais, a **TABELA 2** resume as características gerais dos pacientes, sexo biológico e a idade cronológica média dos grupos arrolados na pesquisa.

TABELA 8. Características gerais dos pacientes do grupo oligo ($n = 42$) arrolados do HUCAM e dos pacientes dos grupos moderado ($n = 40$) e grave ($n = 26$) arrolados do Hospital Dr. Jayme dos Santos Neves e do Hospital Dório Silva.

	OLIGO	MODERADO	GRAVE
MASCULINO	12	20	16
FEMININO	30	20	10
IDADE	39,74 \pm 1,61	51,15 \pm 2,16	48,08 \pm 1,65

DADOS DE INTERNAÇÃO

A porcentagem dos pacientes que obtiveram alta médica durante o período do estudo foi de 73,53% (25 de 34) no grupo moderado e 30,77% (8 de 26) no grupo grave. Já a porcentagem dos pacientes que foram à óbito durante o período do estudo no grupo moderado foi de 11,76% (4 de 34) e no grave foi de 62,54% (16 de 26). O restante dos pacientes que ou foram transferidos ou não tiveram informações sobre a internação foi de 14,71% (5 de 34) no grupo moderado e 7,36% (2 de 26) no

grupo grave (**FIGURA 2A**). O tempo médio em dias de internação do grupo moderado e grave foi de $7,72 \pm 0,83$ ($n = 29$) e $15,33 \pm 1,45$ ($n = 21$), respectivamente. Ainda, o tempo médio de internação do grupo grave foi significativamente maior do que os observados no grupo moderado ($**** p < 0,0001$, **FIGURA 2B**).

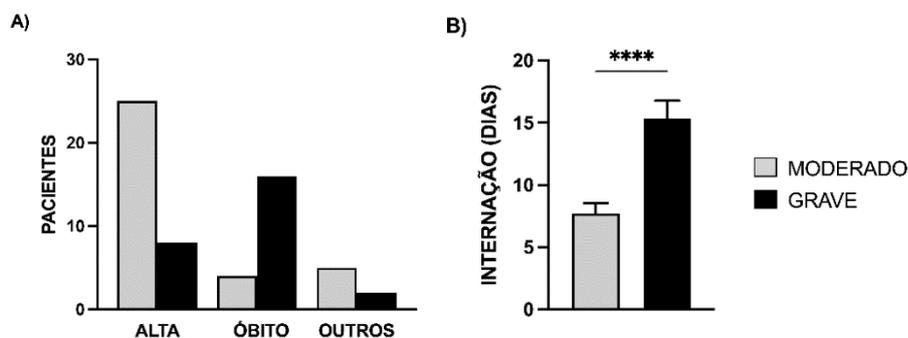


FIGURA 38. A) Dados de alta, óbitos e outros dos grupos moderado e grave. **B)** Tempo médio de internação do grupo moderado e grave do Hospital Dr. Jayme dos Santos Neves. Moderado ($n = 29$) e grave ($n = 21$). Teste de Mann-Whitney, $**** p < 0,0001$.

EXAMES LABORATORIAIS HEMOGRAMA E COMPONENTES

Os dados de hemograma e componentes estão resumidos na **TABELA 3**. Houve diminuição dos níveis de CHCM, de linfócito e de monócito no grupo grave em relação ao moderado. Em contrapartida, houve um aumento dos níveis de RDW, leucócito, neutrófilo bastão, segmentado, bastão global e segmentado global no grupo grave em relação ao moderado. Quando observados os valores de hemoglobina estavam ligeiramente diminuídos nos dois grupos em relação aos valores de referência para esse analito. Enquanto para leucócitos e monócitos, esses apresentaram níveis aumentados em relação aos valores de referência, principalmente no grupo grave. Os valores de neutrófilo segmentado estavam aumentados no grupo grave em relação aos valores de referência. Já os níveis de linfócitos estavam diminuídos em relação aos valores de referência nos dois grupos.

TABELA 9. Dados laboratoriais de hemograma e componentes dos pacientes moderados e graves do Hospital Estadual Dr. Jayme Santos Neves. Teste de Mann-Whitney.

	MODERADO	GRAVE	p	VALORES DE REFERÊNCIA
HEMOGLOBINA	11,56 ± 0,38 (n = 34)	11,04 ± 0,38 (n = 26)	0,3039	12,00 ~ 17,50
CHCM	33,51 ± 0,19 (n = 33)	32,95 ± 0,24 (n = 26)	< 0,05*	32,00 ~ 34,90
RDW	14,00 ± 0,24 (n = 32)	14,58 ± 0,23 (n = 24)	< 0,05*	11,80 ~ 15,60
PLAQUETAS	288.559 ± 20.152 (n = 34)	279.192 ± 17.422 (n = 26)	0,8969	150.000 ~ 450.000
LEUCÓCITOS	10.889 ± 938,2 (n = 32)	12.204 ± 434,0 (n = 24)	< 0,05*	4.000 ~ 10.500
NEUTRÓFILO BASTÃO	2,00 ± 0,00 (n = 27)	2,38 ± 0,13 (n = 25)	0,0013**	0,00 ~ 4,00
NEUTRÓFILO SEGMENTADO	74,84 ± 1,85 (n = 33)	83,87 ± 0,90 (n = 26)	< 0,0001****	45,00 ~ 75,00
LINFÓCITOS	14,56 ± 1,40 (n = 33)	8,03 ± 0,57 (n = 26)	0,0012 ***	22,00 ~ 45,00
EOSINÓFILOS	1,36 ± 0,24 (n = 34)	0,69 ± 0,13 (n = 26)	0,0574	1,00 ~ 5,00
MONÓCITOS	6,81 ± 0,55 (n = 34)	4,80 ± 0,39 (n = 26)	< 0,05*	1,00 ~ 3,00
BASTÃO GLOBAL	230,2 ± 20,83 (n = 31)	286,7 ± 21,27 (n = 24)	< 0,05*	~
SEGMENTADO GLOBAL	7.551 ± 800,6 (n = 31)	10.985 ± 606,7 (n = 26)	0,0001***	~
LINFÓCITO GLOBAL	1.452 ± 152,9 (n = 33)	1.030 ± 83,46 (n = 26)	0,0745	~
EOSINÓFILO GLOBAL	79,99 ± 16,22 (n = 27)	76,97 ± 14,87 (n = 25)	0,8853	~
MONÓCITO GLOBAL	639,4 ± 59,11 (n = 33)	579,2 ± 48,51 (n = 25)	0,6043	~

BIOQUÍMICOS E GASOMETRIA

Os dados estão resumidos na **TABELA 4**. Destacam-se o aumento dos níveis de DHL, bilirrubina direta, proteína C reativa, ureia e creatinina no grupo grave em relação ao moderado. Os valores de DHL, TAP, ureia, creatinina e triglicerídeos estavam aumentados em relação aos valores de referência nos grupos moderado e grave.

TABELA 10. Exames bioquímicos dos pacientes moderados e graves do Hospital Estadual Dr. Jayme Santos Neves. TAP = Tempo de Protrombina, INR = Razão Normalizada Internacional, PTTK = Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. Teste de Mann-Whitney.

	MODERADO	GRAVE	p	VALORES DE REFERÊNCIA
DHL	446,2 ± 43,15 (n = 29)	749,2 ± 66,48 (n = 21)	0,0002***	110,00 ~ 248,00
BILIRRUBINA TOTAL	0,45 ± 0,04 (n = 29)	0,58 ± 0,08 (n = 20)	0,3249	~
BILIRRUBINA DIRETA	0,087 ± 0,01 (n = 23)	0,18 ± 0,03 (n = 19)	< 0,05*	~
BILIRRUBINA INDIRETA	0,33 ± 0,02 (n = 30)	0,34 ± 0,031 (n = 19)	0,7720	~
TAP	16,48 ± 0,72 (n = 12)	15,14 ± 0,30 (n = 12)	0,0773	12,00 ~ 14,00
TAP - INR	1,15 ± 0,03 (n = 12)	1,28 ± 0,07 (n = 12)	0,1438	1,00 ~ 1,2
PROTEÍNA C REATIVA	95,34 ± 11,73 (n = 32)	162,6 ± 21,29 (n = 20)	0,0083**	~
UREIA	53,97 ± 5,54 (n = 32)	85,80 ± 10,60 (n = 25)	0,0077**	17,00 ~ 43,00
CREATININA	0,86 ± 0,07 (n = 31)	2,43 ± 0,42 (n = 26)	< 0,05*	0,66 ~ 1,09
TRIGLICERÍDEOS	234,2 ± 48,86 (n = 10)	192,9 ± 27,36 (n = 15)	0,8488	0,10 ~ 175,00

As performances pulmonar e metabólica do grupo grave parecem estar mais prejudicadas com a diminuição do pH e aumento da Pressão Parcial de Gás Carbônico (PCO₂), inclusive em relação aos valores de referência desses analitos. A saturação de ambos os grupos estava ligeiramente diminuída em relação aos valores de referência para esse analito (**TABELA 5**).

TABELA 11. Gasometria arterial dos pacientes moderados e graves do Hospital Estadual Dr. Jayme Santos Neves. PO₂ = Pressão Parcial de Oxigênio. Teste de Mann-Whitney.

	MODERADO	GRAVE	p	VALORES DE REFERÊNCIA
pH	7,38 ± 0,02 (n = 33)	7,29 ± 0,02 (n = 26)	0,0002***	7,35 ~ 7,45
PO₂	86,85 ± 4,69 (n = 33)	94,08 ± 5,39 (n = 26)	0,2495	83,00 ~ 108,00
PCO₂	42,03 ± 0,92 (n = 32)	55,82 ± 2,97 (n = 26)	< 0,0001****	35,00 ~ 45,00
BICARBONATO	23,82 ± 0,42 (n = 32)	25,08 ± 0,78 (n = 25)	0,5255	21,00 ~ 28,00
BASE	-0,56 ± 0,57 (n = 33)	-1,72 ± 1,08 (n = 26)	0,1816	-3,00 ~ 3,00
SATURAÇÃO	94,48 ± 0,73 (n = 34)	95,06 ± 0,58 (n = 25)	0,9363	96,00 ~ 110,00

IMUNOGLOBULINAS

Para avaliar a titulação das classes de anticorpos envolvidos na COVID-19, IgM e IgG foram mensurados nos tempos D15, D30, D45, D60, D90/120 e D180 após a infecção por SARS-CoV-2 (**FIGURA 3A e B**). Houve uma diminuição dos níveis de IgG e IgM conforme passaram os dias, as diferenças estatísticas estão representadas na **FIGURA 3A e B**.

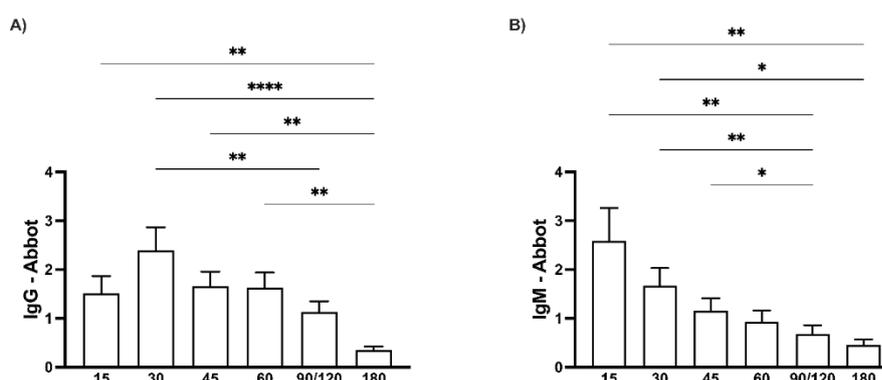


FIGURA 39. Níveis de **A)** IgG e **B)** IgM marca Abbot dos pacientes oligossintomáticos do HUCAM nos tempos D15, D30, D45, D60, D90/D120 e D180. Teste de Friedman, post-hoc de FDR Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, **** $p < 0,0001$.

ESCOLHA DA AMOSTRA PARA EXPERIMENTOS DE CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

Dos 108 pacientes arrolados na pesquisa, foram escolhidos 36 indivíduos divididos nos três grupos de estudo (n = 12, cada). Foram equiparados por idade e tempo de infecção viral (>10 dias de sintomas). A **TABELA 6** resume os dados de identificação (ID), idade (anos), sexo biológico e origem hospitalar dos pacientes dos

grupos oligo, moderado e grave escolhidos para as análises de citometria de fluxo *ex vivo*.

TABELA 12. Dados clínicos dos pacientes dos grupos oligo, moderado e grave (n = 12, cada) para as análises de citometria. † = veio a óbito.

PACIENTES	ID	IDADE (ANOS)	SEXO	HOSPITAL	PACIENTES	ID	IDADE (ANOS)	SEXO	HOSPITAL	PACIENTES	ID	IDADE (ANOS)	SEXO	HOSPITAL
	OLIGO1	32	F	HUCAM		MOD1	54	M	DÓRIO		GRAVE1	47	F	JAYME
	OLIGO2	30	F	HUCAM		MOD2	47	M	JAYME		GRAVE2†	42	M	JAYME
	OLIGO3	53	F	HUCAM		MOD3†	63	M	JAYME		GRAVE3†	47	M	JAYME
	OLIGO4	37	M	HUCAM		MOD4	57	M	DÓRIO		GRAVE4†	44	F	JAYME
	OLIGO5	51	M	HUCAM		MOD5	41	M	JAYME		GRAVE5	59	M	JAYME
OLIGO	OLIGO6	26	M	HUCAM	MODERADO	MOD6	63	M	JAYME	GRAVE	GRAVE6†	47	M	JAYME
	OLIGO7	53	M	HUCAM		MOD7	48	M	JAYME		GRAVE7	44	M	JAYME
	OLIGO8	41	F	HUCAM		MOD8	47	F	DÓRIO		GRAVE8†	59	F	JAYME
	OLIGO9	43	F	HUCAM		MOD9	49	M	JAYME		GRAVE9	41	M	JAYME
	OLIGO10	49	F	HUCAM		MOD10	48	M	DÓRIO		GRAVE10†	42	F	JAYME
	OLIGO11	48	M	HUCAM		MOD11	43	F	DÓRIO		GRAVE11	44	M	JAYME
	OLIGO12	38	F	HUCAM		MOD12	46	M	JAYME		GRAVE12†	48	M	JAYME
		41,75 ± 2,68					50,42 ± 2,10					47 ± 1,75		

DIMINUIÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS NOS GRUPOS MODERADO E GRAVE

Destacou-se uma diminuição de frequência de células viáveis nos grupos moderado e grave em relação ao grupo oligo, mas não foi observado diferenças entre o grupo moderado e severo (**FIGURA 4A e B**).

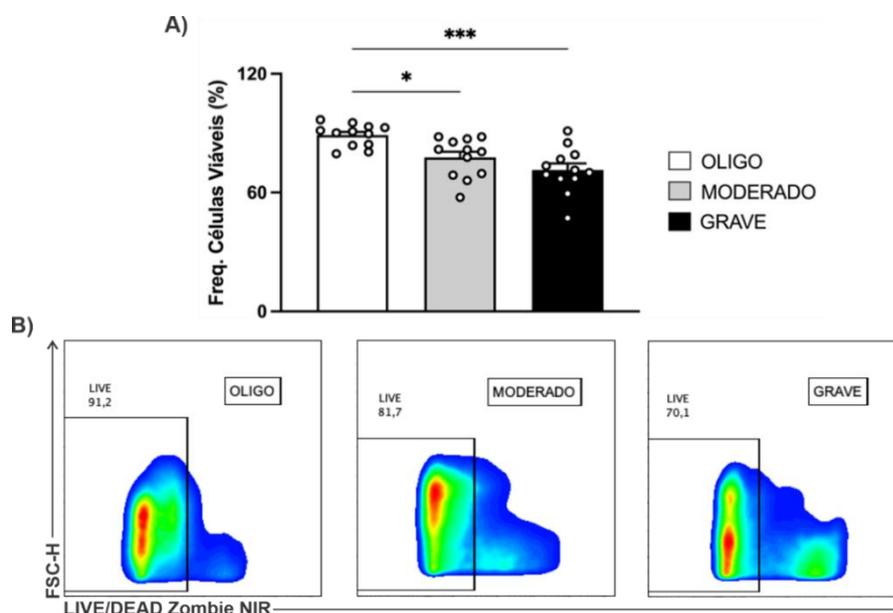


FIGURA 40. Comparação das frequências de células viáveis entre os grupos oligo, moderado e grave. **A)** Frequência em porcentagem nos três grupos (n = 12, cada). Teste de Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg, * $p < 0,05$, *** $p < 0,0005$. **B)** Estratégia de análise de células viáveis dos três grupos.

CÉLULAS T DOS GRUPOS OLIGO, MODERADO E GRAVE

A análise das frequências de células T CD3+ não demonstrou diferença entre eles. Enquanto a frequência de células T CD4+ do grupo moderado foi maior em relação aos grupos oligo e grave, no entanto entre os grupos oligo e grave não houve

diferença. Já a frequência de células T CD8+ foi menor no grupo moderado em relação ao oligo, mas não apresentaram diferença entre os grupos oligo e grave, também entre os grupos moderado e grave (**FIGURAS 5A, B e C**).

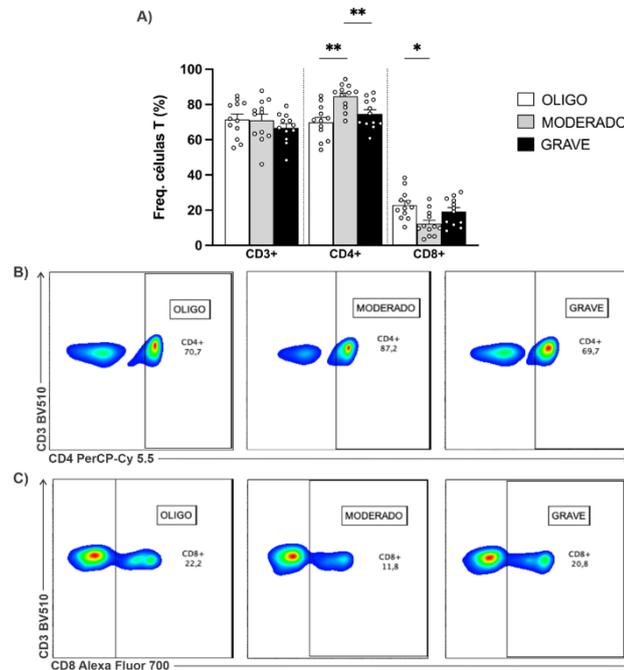


FIGURA 41. A) Gráfico das frequências totais das células T CD3+, T CD4+ e T CD8+ dos grupos oligo, moderado e grave (n = 12, cada). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg, * $p < 0,05$, ** $p < 0,0098$. Estratégia de análise e comparação das frequências de células B) T CD4+ e C) T CD8+ nos três grupos.

AVALIAÇÃO DE DANOS NO DNA E EXPRESSÃO DE P38 EM CÉLULAS T

A imunossenescência também caracterizada fenotipicamente pelo aumento de danos ao DNA e expressão de p38. Deste modo, os resultados demonstram um aumento da frequência de T CD4+ γ H2Ax+ no grupo moderado em relação ao grupo oligo, no grupo grave em relação ao oligo e ao moderado (**FIGURAS 6A e B**). Evidenciado então que no grupo grave houve um maior aumento da expressão de γ H2Ax, ou seja, uma maior expressão de danos ao DNA em células T CD4+.

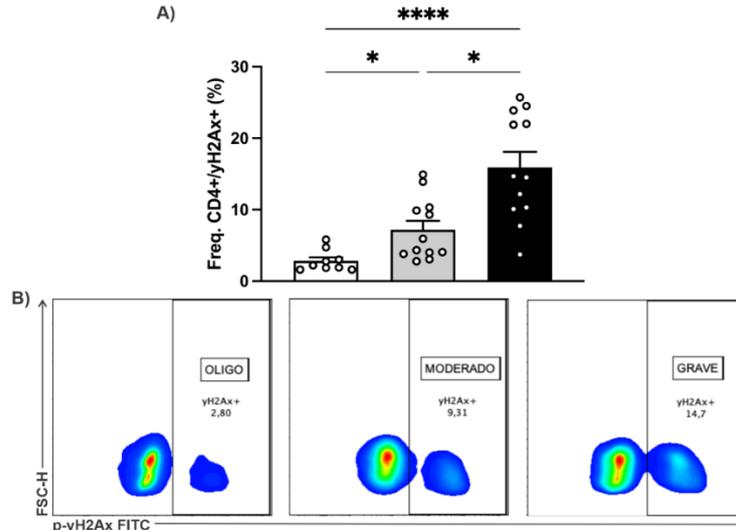


FIGURA 42. A) Gráfico das frequências de células T CD4+ γH2Ax+ nos grupos oligo (n = 9), moderado (n = 12) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$. **B)** Estratégia de análise para células T CD4+ γH2Ax nos três grupos.

Em relação ao p38 em células T CD4+ totais, houve aumento das frequências de T CD4+ p-p38+ nos grupos moderado e grave em relação ao grupo oligo (**FIGURAS 7**).

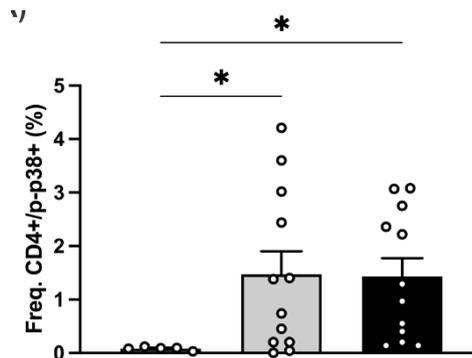


FIGURA 43. Gráfico das frequências de células T CD4+ p-p38+ dos grupos oligo (n = 5), moderado (n = 12) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$.

Em relação as células T CD8+, observou-se um aumento da frequência de T CD8+ γH2Ax+ nos grupos moderado e grave em relação ao oligo, mas não houve diferença na frequência de T CD8+ γH2Ax+ entre os grupos moderado e grave (**FIGURAS 8A e B**).

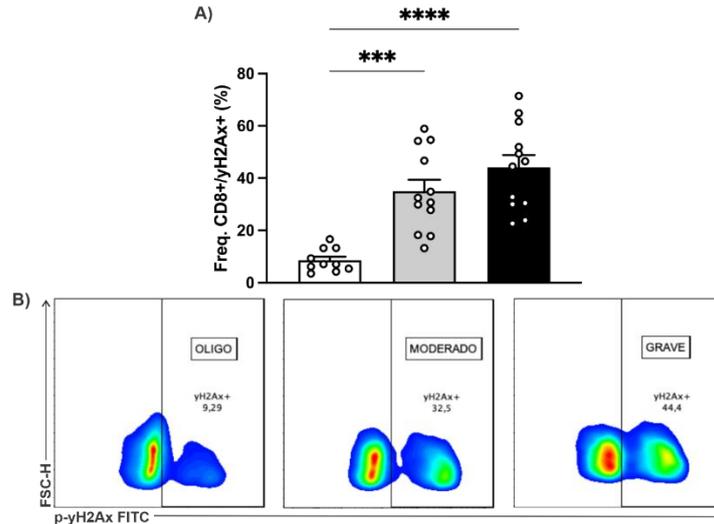


FIGURA 44. A) Gráfico das frequências de células T CD8+ γH2Ax+ dos grupos oligo (n = 10), moderado (n = 12) e grave (n = 12). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. *** p = 0,0008, **** p < 0,0001. **B)** Estratêgia de análise das frequências de células T CD8+ γH2Ax+ nos três grupos.

ANÁLISE DO PERFIL DE DIFERENCIAÇÃO DOS COMPARTIMENTOS DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA NOS DIFERENTES GRUPOS COM COVID-19

Para avaliação do perfil de diferenciação das populações das células T de memória, realizou-se a marcação utilizando CD45RA (BV605) e CD27 (PE-Cy7), que permite identificar as populações conforme demonstrado na **FIGURA 9**.

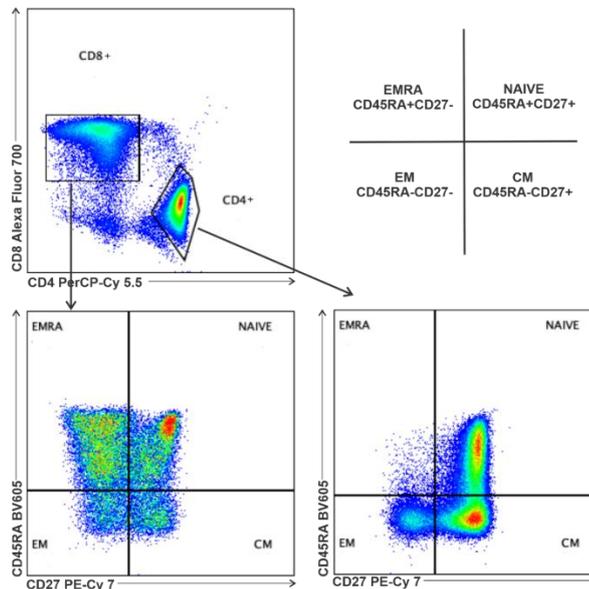


FIGURA 45. Estratêgia de análise para determinação das populações de memória NAIVE, CM, EM e EMRA de linfócitos T CD4+ e T CD8+.

Assim não houve diferença nas frequências de T CD4+ NAIVE, CM e EM entre os grupos oligo, moderado e grave (**FIGURA 10A**). Houve diminuição das frequências conforme havia a perda do receptor CD27 e a re-expressão do receptor CD45RA de NAIVE, CM, EM até EMRA como observado na **FIGURA 10A**. Já no compartimento

das células mais terminalmente diferenciadas destacou-se aumento das frequências de células T CD4+ EMRA no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado (FIGURAS 10A e B), mas não houve diferença entre os grupos oligo e moderado (FIGURA 10A).

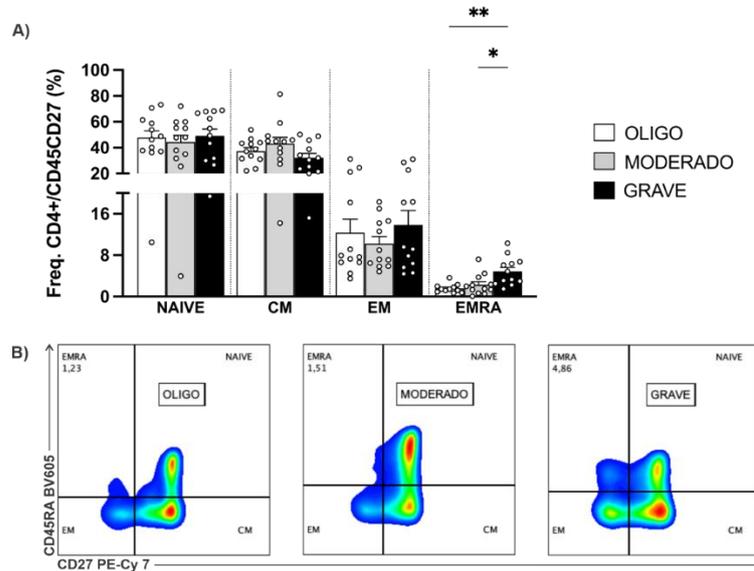


FIGURA 10. A) Gráfico das frequências de T CD4+ NAIVE (n = 12, cada), CM (n = 12, cada), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg, * $p < 0,05$, ** $p = 0,002$. **B)** Comparação das populações de memória, principalmente EMRA, de T CD4+ entre os três grupos.

Em células T CD8+ não houve diferença de frequências de T CD8+ NAIVE, EM e EMRA entre os três grupos (FIGURA 11A). Todavia destacou-se uma diminuição da frequência de T CD8+ CM no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado (FIGURAS 11A e B), sem diferença entre os grupos oligo e moderado (FIGURA 11A).

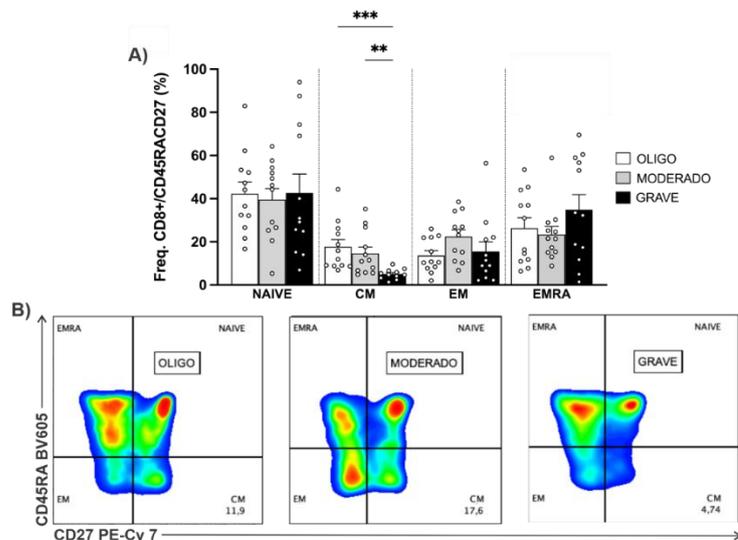


FIGURA 11. A) Gráfico das frequências de T CD8+ NAIVE (n = 12, cada), CM (n = 12 oligo e moderado, n = 11 grave), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 12, cada) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg, ** $p < 0,005$, *** $p = 0,0004$. **B)** Comparação das populações de memória de T CD8+ CM entre os três grupos.

RECEPTORES CO-ESTIMULADORES CD27 E CD28 EM CÉLULAS T

Células T senescentes perdem receptores CD28 e CD27. Para avaliar as frequências desses receptores co-estimuladores foram feitas análises para definição das populações CD28+CD27+, CD28+CD27-, CD28-CD27+ e CD28-CD27- (**FIGURAS 12A e 13A**). Dentro das populações de linfócitos T CD4+ houve uma diminuição das frequências de CD28+CD27+ no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado (**FIGURAS 12B e C**). Houve um aumento das frequências de células T CD4+ CD28-CD27- no grupo grave em relação ao moderado (**FIGURA 12B e C**). Também se destacou um aumento da frequência de CD28-CD27+ no grupo grave em relação ao grupo moderado (**FIGURAS 12B e C**).

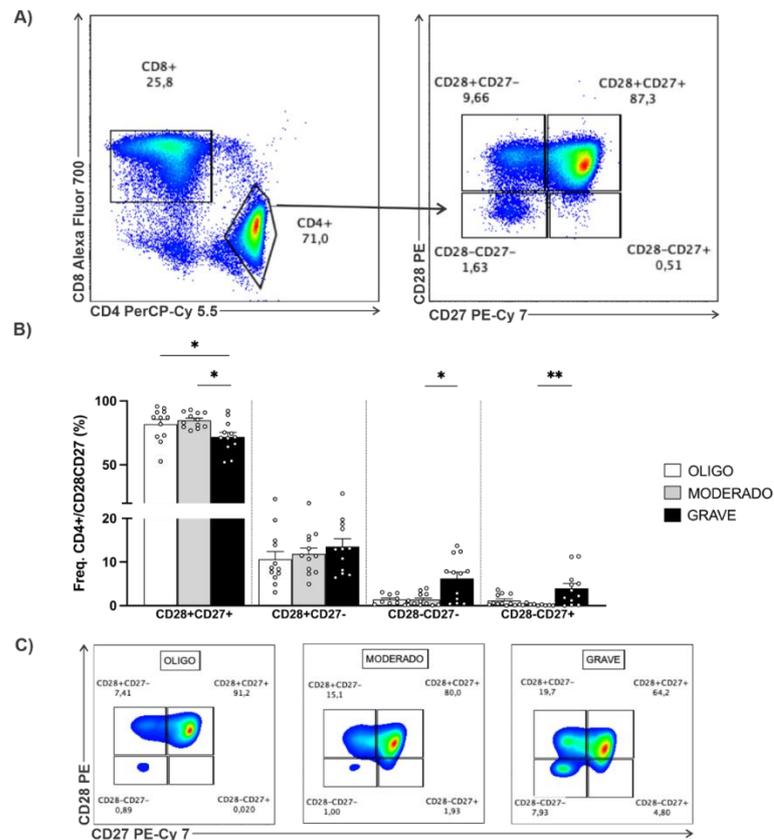


FIGURA 12. Estratégias de análise para A) determinação das populações CD28+CD27-, CD28+CD27+, CD28-CD27+, CD28-CD27- dentro da população de células T CD4+. **B)** Gráfico das frequências de T CD4+ CD28+CD27+ (n = 12, cada), CD28+CD27- (n = 12, cada), CD28-CD27- (n = 9 oligo, n = 12 moderado e grave) e CD28-CD27+ (n = 12 oligo e grave, n = 9 moderado) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg, * $p < 0,05$, ** $p = 0,0054$. **C)** Comparação das populações de células T CD4+ CD28+CD27-, CD28+CD27+, CD28-CD27+, CD28-CD27- entre os três grupos.

Em linfócitos T CD8+ não houve diferença entre as frequências de CD28+CD27+, CD28-CD27+ e CD28-CD27- nos três grupos (**FIGURAS 13B e C**). Mas foi

observada CD28+CD27- com diminuição da frequência no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado (**FIGURAS 13B e C**).

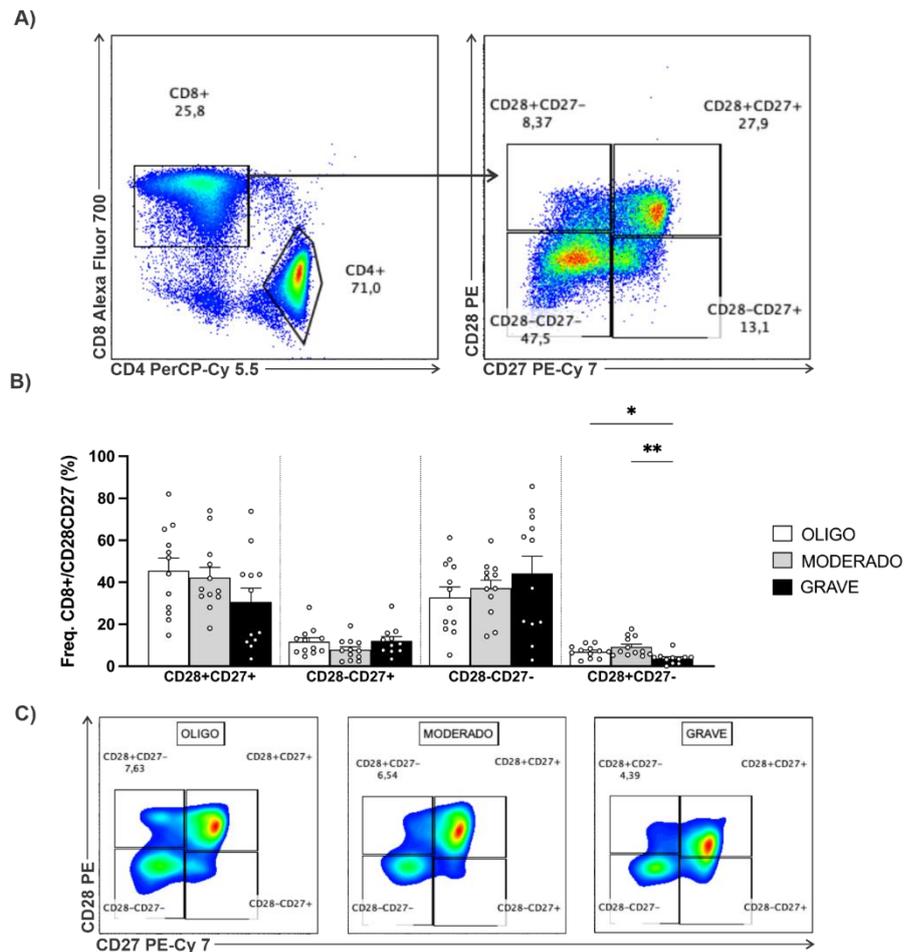


FIGURA 13. Estratégia de análise para **A)** determinação das populações CD28+CD27-, CD28+CD27+, CD28-CD27+, CD28-CD27- dentro da população de células T CD8+. **B)** Gráfico das frequências de T CD8+ CD28+CD27+ (n = 12, cada), CD28-CD27+ (n = 12 oligo e moderado, n = 11 grave), CD28-CD27- (n = 12, cada), CD28+CD27- (n = 12 oligo e moderado, n = 11 grave). Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg, * $p < 0,05$, ** $p = 0,0017$. **C)** Comparação das populações de células T CD8+ CD28+CD27-, CD28+CD27+, CD28-CD27+, CD28-CD27- entre os três grupos.

RECEPTORES DE IMUNOSSENESCÊNCIA CD57 E KLRG1 NOS SUBSETS DE CD28CD27 DE CÉLULAS T

Visto que células T apresentam alterações no *subsets* CD28CD27, foram analisados os receptores ligados a imunossenescência CD57 e KLRG1 nessas populações.

Não houve diferença nas frequências de T CD8+ CD28+CD27+ CD57+ entre os três grupos, assim como das populações de células T CD8+ CD28+CD27- CD57+ e células T CD8+ CD28-CD27- CD57+ (**FIGURA 14B**). Também foram observados um aumento gradual das frequências de CD57+ conforme havia perda dos receptores CD28 e CD27 (**FIGURAS 14A e B**). Já quando analisado o MFI T CD8+ CD28+CD27- CD57+ houve uma diminuição no grupo grave em relação ao moderado (**FIGURAS 14C e D**), mas não houve diferença entre os dois grupos oligo

e moderado (**FIGURA 14C**). Os demais MFI T CD8+ CD28+CD27+ CD57+ e CD28-CD27- CD57+ não apresentaram diferença entre os grupos, mas apresentaram aumento gradual conforme havia perda dos receptores CD28 e CD27 (**FIGURA 14C**).

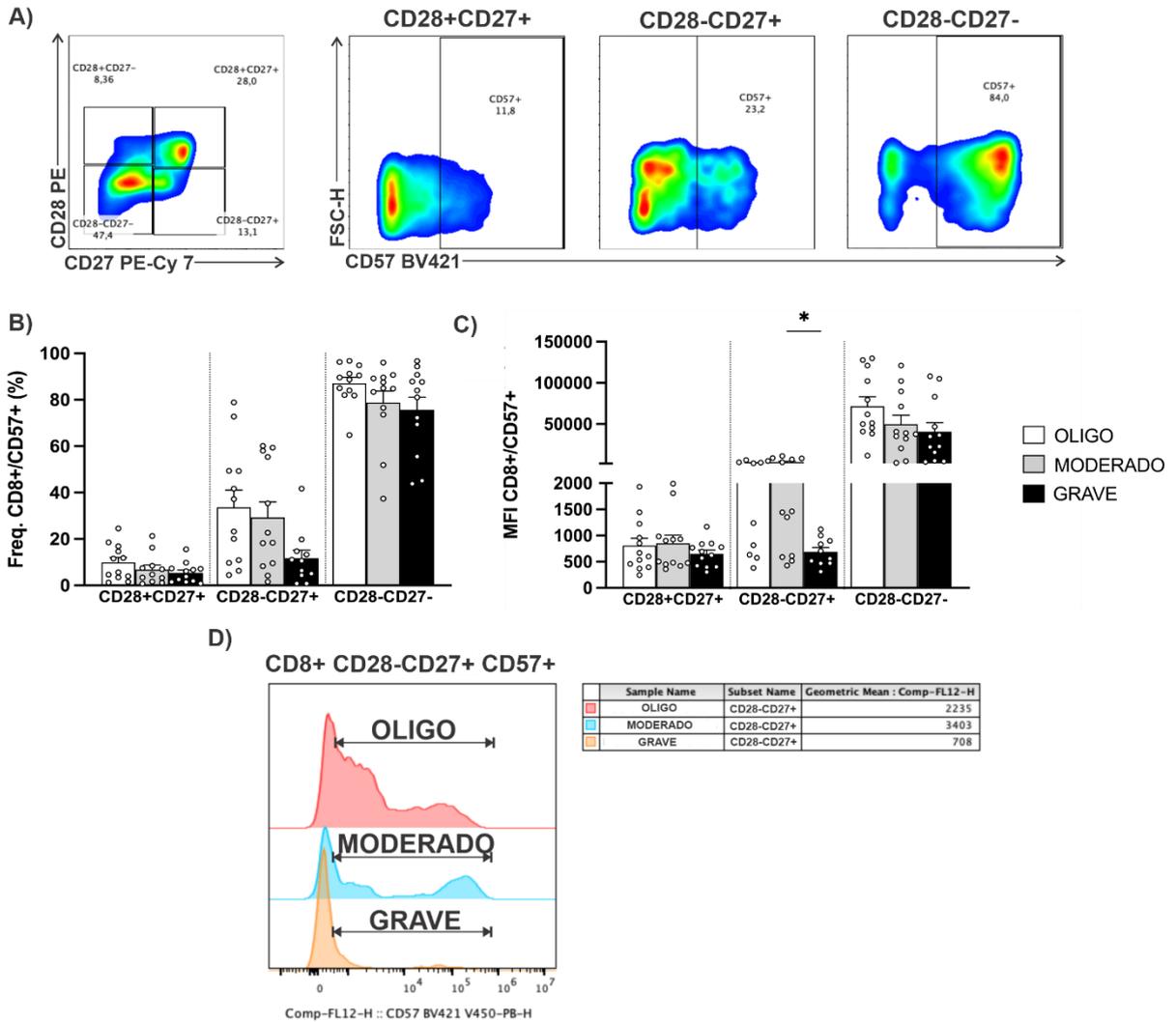


FIGURA 14. Estratégia de análise de **A)** células T CD8+ CD28+CD27+ CD57+, CD28-CD27+ CD57+ e CD28-CD27- CD57+. **B)** Gráfico das frequências de células T CD8+ CD28+CD27+ CD57+ (n = 12 oligo e grave, n = 11 moderado), CD28-CD27+ CD57+ (n = 12 oligo e moderado, n = 11 grave), CD28-CD27- CD57+ (n = 12, cada) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. **C)** Gráfico do MFI das células T CD8+ CD28+CD27+ CD57+ (n = 12, cada), CD28-CD27+ CD57+ (n = 10 oligo e grave, n = 12 moderado), CD28-CD27- CD57+ (n = 12, cada) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* Benjamini e Hochberg, * $p < 0,05$. **D)** Comparação de MFI das células T CD8+ CD28-CD27+ CD57+ nos três grupos.

Com KLRG1 houve diminuição das frequências de células T CD8+ CD28+CD27+ KLRG1+ no grupo grave em relação ao oligo (**FIGURAS 15A e B**). Houve diminuição das frequências de células T CD8+ CD28-CD27+ KLRG1+ no grupo grave em relação ao grupo oligo e moderado (**FIGURAS 15A e C**). Também se destacou uma diminuição das frequências de células T CD8+ CD28-CD27- KLRG1+ no grupo grave em relação ao oligo (**FIGURAS 15A e D**). Os resultados então sugerem que

houve um aumento de KLRG1 no grupo oligo nos diferentes *subsets* de CD28CD27 de células T CD8+.

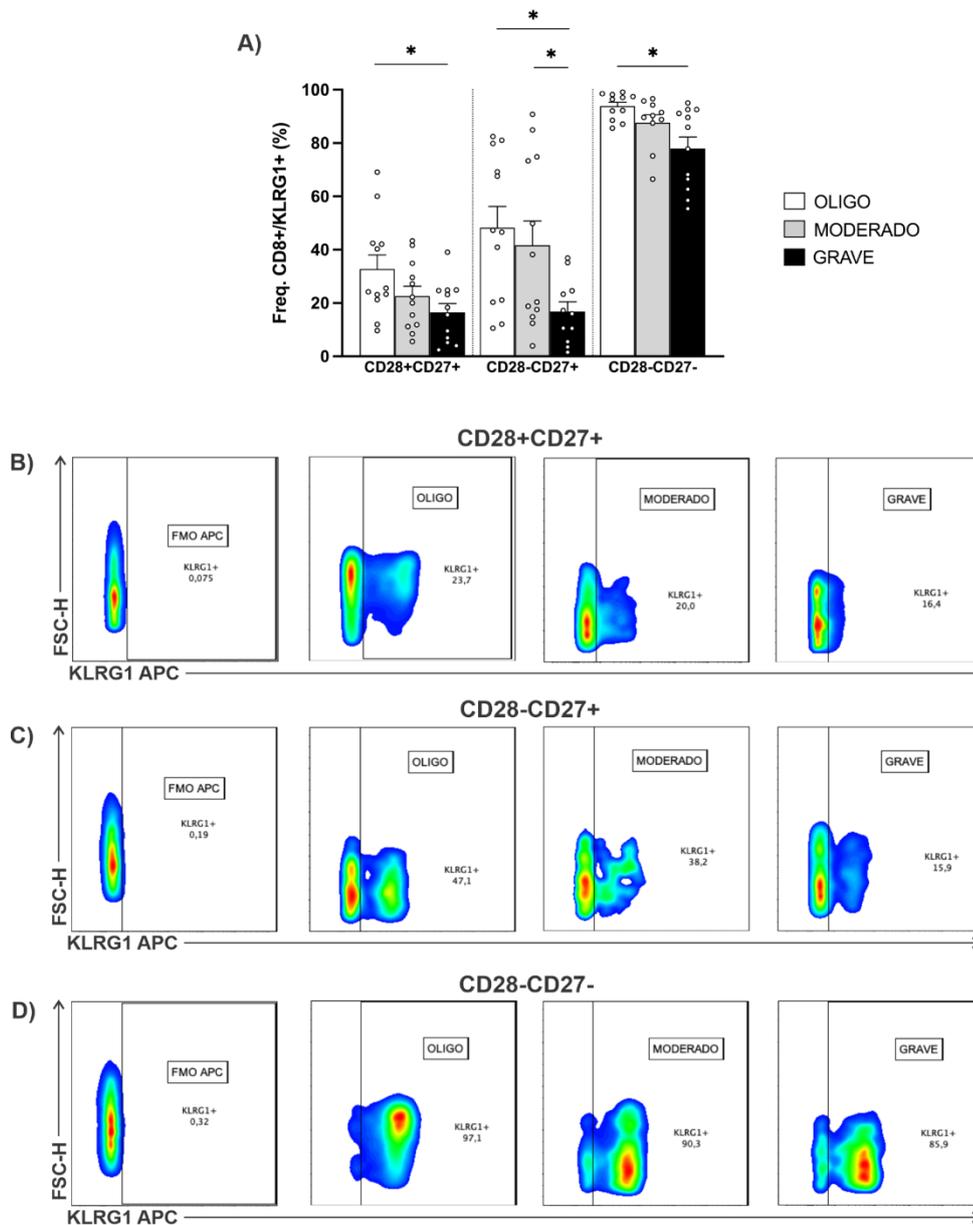


FIGURA 15. A) Gráfico das frequências de células T CD8+ CD28+CD27+ KLRG1+ (n = 12, cada), CD28-CD27+ KLRG1+ (n = 12 oligo e moderado, n = 11 grave), CD28-CD27- KLRG1+ (n = 11 oligo, n = 10 moderado, n = 12 grave) nos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$. Comparação das frequências de células **B)** T CD8+ CD28+CD27+ KLRG1+; **C)** T CD8+ CD28-CD27+ KLRG1+ e **D)** T CD8+ CD28-CD27- KLRG1+ nos três grupos.

RECEPTORES DE IMUNOSSENESCÊNCIA CD57, KLRG1 E DANOS AO DNA DOS COMPARTIMENTOS DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA DE CÉLULAS T CD4+

O receptor CD57 nas populações de células T de memória não apresentou diferença das frequências de linfócitos T CD4+ NAIVE, CM e EM CD57+ entre os três grupos (**FIGURA 16A**). Enquanto as frequências de células T CD4+ EMRA CD57+

apresentou um aumento no grupo oligo em relação ao moderado, no grupo grave em relação ao moderado (**FIGURAS 16A e B**).

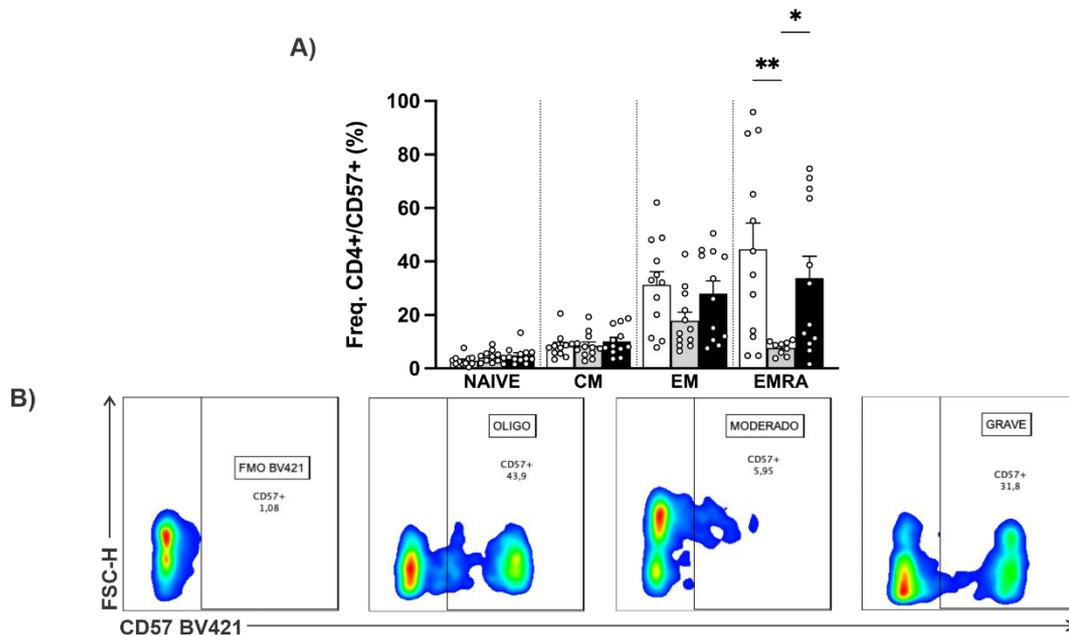


FIGURA 16. A) Gráfico das frequências de T CD4+ NAIVE (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave), CM (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 12 oligo e grave, n = 9 moderado) CD57+. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg, * $p < 0,05$, ** $p = 0,0077$. **B)** Estratégia de análise de células T CD4+ EMRA CD57+ em comparação com FMO BV421.

Quanto ao KLRG1, não houve diferença das frequências de linfócitos T CD4+ NAIVE, CM e EM KLRG1+ entre os três grupos (**FIGURA 17A**). A frequência de células T CD4+ EMRA KLRG1+ apresentou um aumento no grupo oligo em relação ao moderado (**FIGURAS 17A e B**). Dessa forma houve uma maior expressão de KLRG1 no grupo oligo em células T CD4+ EMRA.

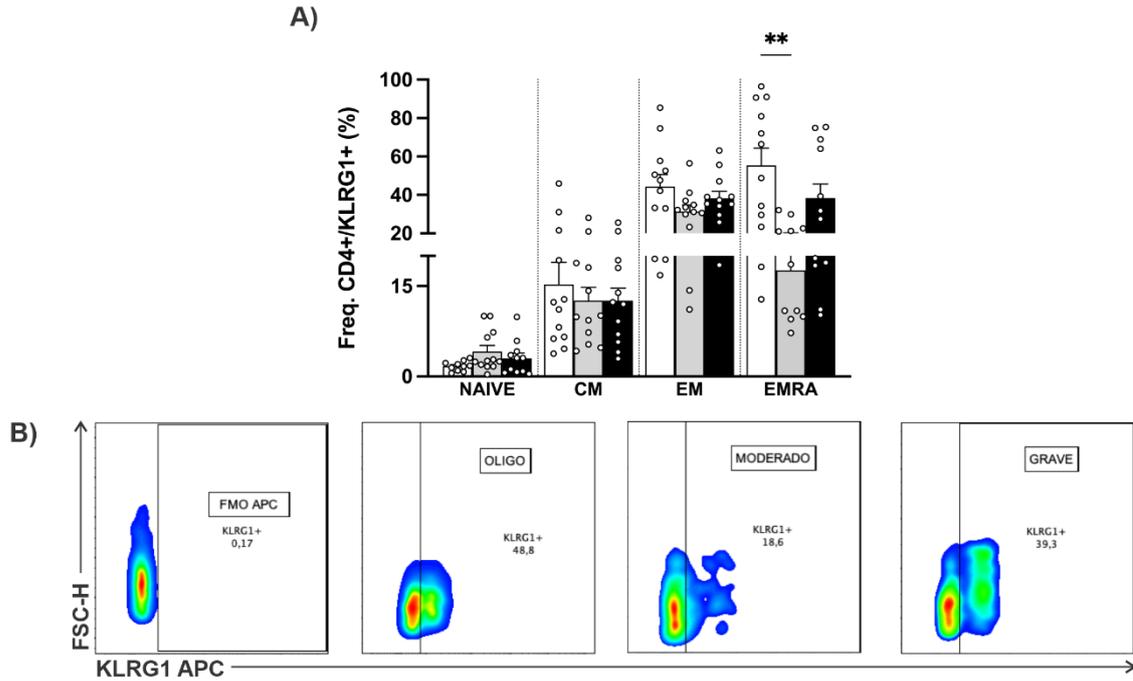


FIGURA 17. A) Gráfico das frequências de células T CD4+ NAIVE (n = 10 oligo, n = 12 moderado, n = 11 grave), CM (n = 12, cada), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 12 oligo e grave, n = 11 moderado) KLRG1+. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg, ** $p = 0,0038$. **B)** Comparação das frequências de células T CD4+ EMRA KLRG1+ em relação ao FMO de APC nos três grupos.

Visto que houve aumento da expressão de γ H2Ax em células T totais, foram analisados danos ao DNA nos compartimentos de memória de células T. Assim houve aumento das frequências de γ H2Ax+ em todas as subpopulações de células T CD4+ NAIVE, CM, EM e EMRA no grupo grave em relação ao grupo oligo (**FIGURAS 18A, B, C, D e E**). Destacam-se também aumento das frequências de células T CD4+ NAIVE γ H2Ax+ e de T CD4+ CM γ H2Ax+ no grupo grave em relação ao moderado (**FIGURAS 18A, B e C**). Mais uma vez evidenciando que no grupo grave houve aumento de danos ao DNA em diferentes populações celulares de T CD4+.

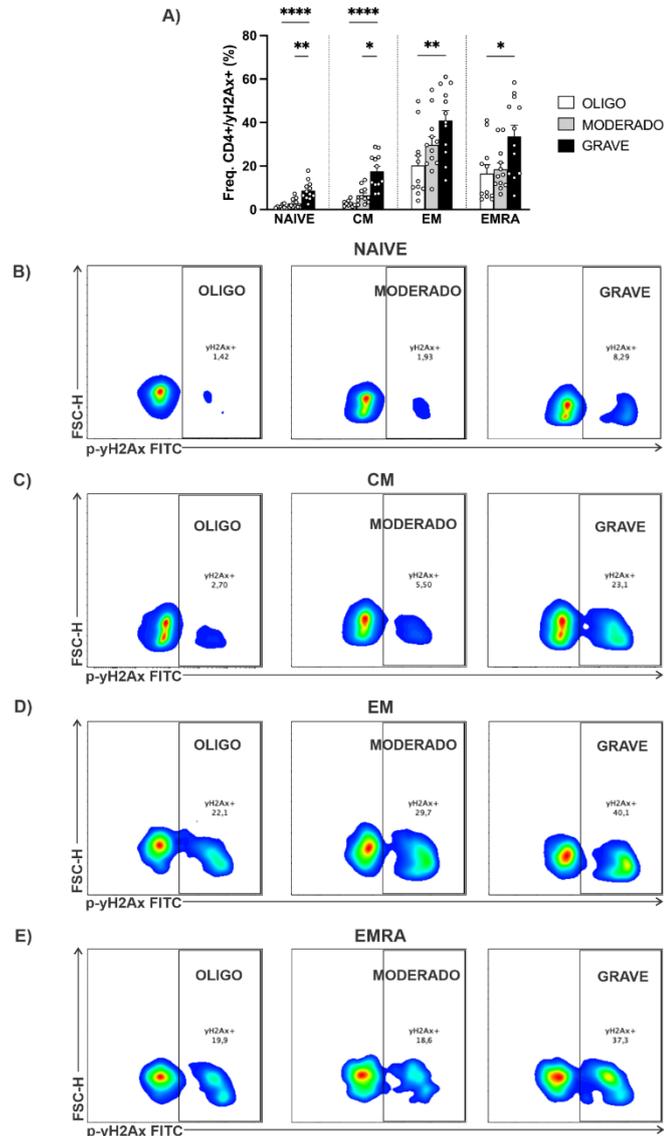


FIGURA 18. A) Gráfico das frequências das populações de células T CD4+ NAIVE (n = 9 oligo, n = 12 moderado e grave), CM (n = 9 oligo, n = 11 moderado, n = 12 grave), EM (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave) e EMRA (n = 11 oligo, n = 12 moderado e grave) γH2A+ dos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* FDR Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,009$, **** $p < 0,0001$. Comparação das frequências de células **B)** T CD4+ NAIVE γH2A+; **C)** T CD4+ CM γH2A+; **D)** T CD4+ EM γH2A+ e **E)** T CD4+ EMRA γH2A+ entre os três grupos.

RECEPTORES DE IMUNOSSENESCÊNCIA KLRG1 E DANOS AO DNA DOS COMPARTIMENTOS DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA DE CÉLULAS T CD8+

Não houve diferença das frequências de células T CD8+ NAIVE KLRG1+ entre os três grupos (**FIGURA 19A**). Houve diminuição das frequências de células T CD8+ CM KLRG1+ nos grupos moderado e grave em relação ao oligo (**FIGURAS 19A e B**). Assim como, nas populações de células T CD8+ EM KLRG1+ apresentaram esse mesmo perfil (**FIGURAS 19A e C**). Destacou-se também uma diminuição das frequências de células T CD8+ EMRA KLRG1+ no grupo grave em relação ao oligo (**FIGURAS 19A e D**). Dessa forma, houve aumento da expressão de KLRG1 em diferentes populações de memória de células T CD8+ no grupo oligo.

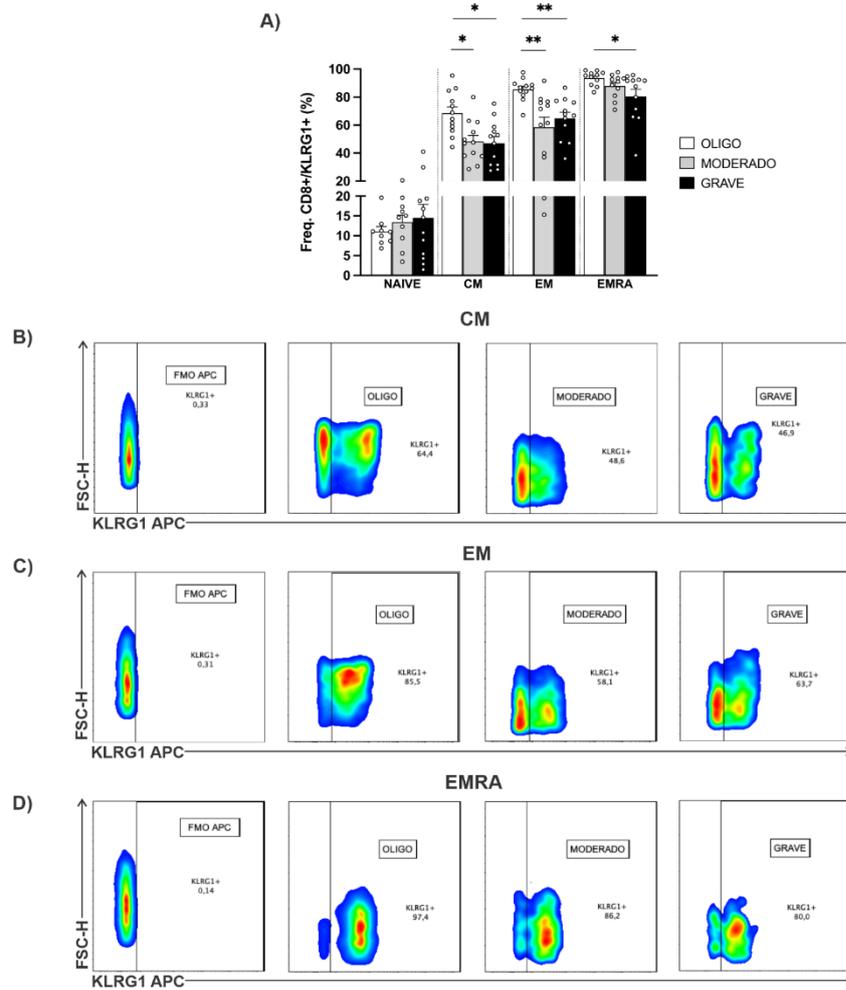


FIGURA 19. A) Gráfico das frequências de células T CD8+ NAIVE (n = 9 oligo, n = 10 moderado, n = 12 grave), CM (n = 12, cada), EM (n = 12, cada) e EMRA (n = 11 oligo e moderado, n = 12 grave) KLRG1+ dos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$. Comparação das frequências de células **B)** T CD8+ CM KLRG1+ **C)** T CD8+ EM KLRG1+ **D)** T CD8+ EMRA KLRG1+ com FMO de APC nos três grupos.

Assim como em linfócitos CD4, houve aumento das frequências de γ H2Ax+ em todas as populações de memória de T CD8+ no grupo grave em relação ao oligo (**FIGURAS 20A, B, C, D e E**). Evidenciaram-se também aumento da frequência de células T CD8+ NAIVE γ H2Ax+ no grupo grave em relação ao grupo moderado (**FIGURAS 20A e B**). Assim como um aumento das frequências de células T CD8+ CM γ H2Ax+ no grupo moderado em relação ao grupo oligo e no grupo grave em relação ao moderado (**FIGURAS 20A e C**). Com especial destaque do aumento das frequências de células T CD8+ EM γ H2Ax+ e de células T CD8+ EMRA γ H2Ax+ no grupo moderado em relação ao oligo (**FIGURAS 20A, D e E**).

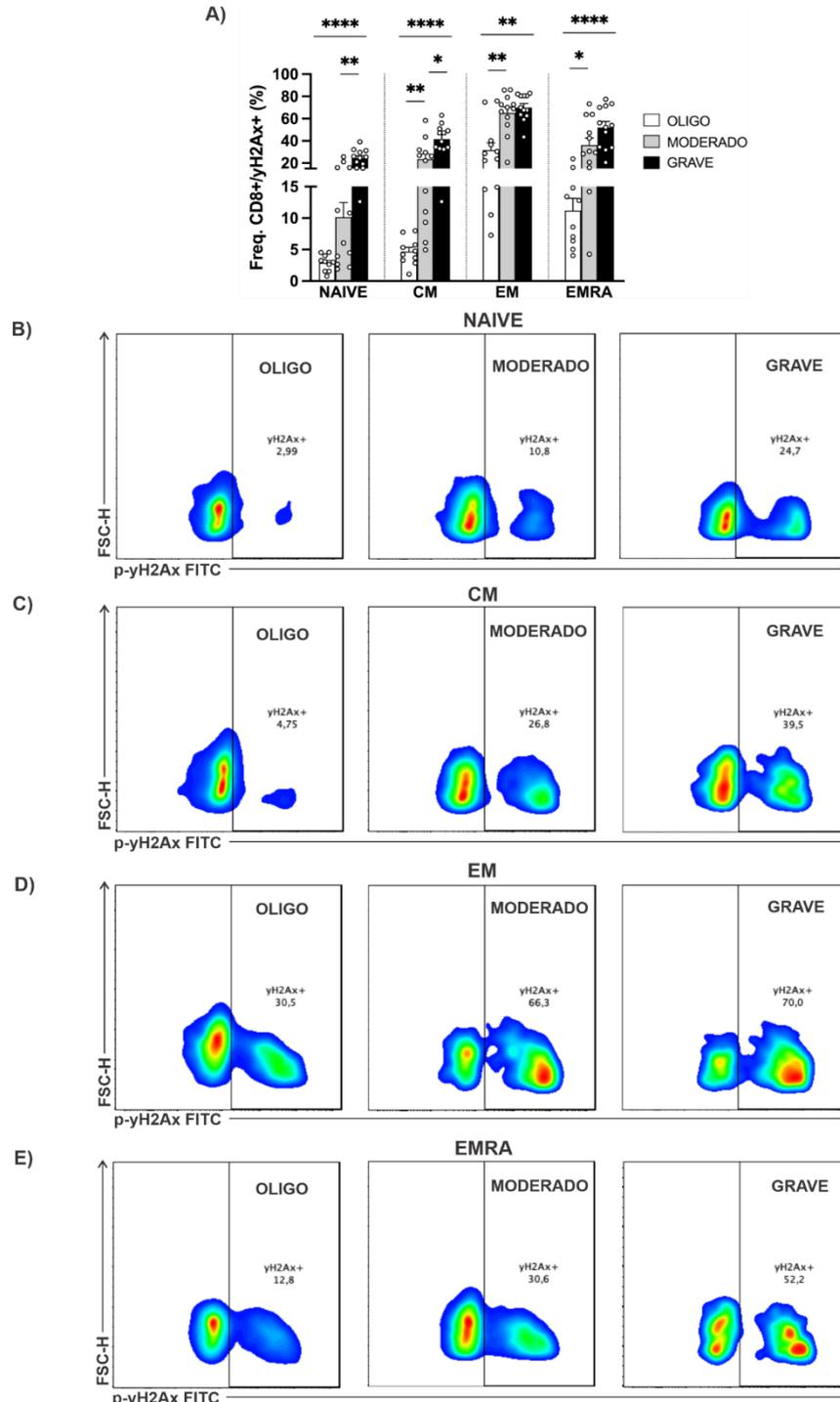


FIGURA 20. A) Gráfico das frequências de células T CD8+ NAIVE ($n = 10$ oligo, $n = 12$ moderado e grave), CM ($n = 10$ oligo, $n = 12$ moderado e grave), EM ($n = 12$, cada) e EMRA ($n = 10$ oligo, $n = 12$ moderado e grave) γ H2Ax+ dos três grupos. Teste Kruskal-Wallis, *post-hoc* Benjamini e Hochberg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$. **B)** Comparação das frequências de células T CD8+ NAIVE; **C)** CM; **D)** EM e **E)** EMRA γ H2Ax+ nos três grupos.

DISCUSSÃO

No estado do Espírito Santo, entre o período de março de 2020 a junho de 2021 houve 524.496 casos com 11.516 óbitos acumulados (DE SOUSA et al., 2021).

Houve maior percentual de casos confirmados entre as pessoas de 30 a 39 anos, enquanto os óbitos foram mais prevalentes entre os idosos (DE SOUSA et al., 2021). Dos 108 indivíduos arrolados para pesquisa, grande parte foi composta pelo sexo feminino, tendo a idade média entre os grupos composta por indivíduos maiores de 38 anos (TABELA 2). Entre os indivíduos hospitalizados a porcentagem dos pacientes que foram à óbito no grupo grave foi de 62,54% (FIGURA 2A).

Um estudo de coorte retrospectivo sobre hospitalizações de COVID-19 no Brasil demonstrou que pacientes que se recuperaram da COVID-19 permaneceram na UTI por $10,69 \pm 12,36$ dias, enquanto os que vieram a óbito foi de $12,84 \pm 13,37$ (SOBRAL et al., 2022). Ainda, a probabilidade de sobrevivência média diária diminuiu 3,27% por dia durante os 15 primeiros dias, sendo que aqueles que ficaram mais de 14 dias na UTI tiveram menos de 50% de probabilidade de sobreviver (SOBRAL et al., 2022). Isso corrobora que conforme a gravidade da doença se intensifica, maior tempo de internação e óbito associados encontrados no grupo grave (FIGURAS 2A e B).

As primeiras confirmações de COVID-19 na China evidenciaram alterações de exames laboratoriais de rotina como exames hematológicos e bioquímicos (CHEN et al, 2020; HUANG et al, 2020; ZHOU et al, 2020). Quanto aos resultados para hemoglobina, não houve diferença estatística entre os grupos, mas apresentaram níveis ligeiramente mais baixos nos dois grupos em relação aos valores de referência para esse analito (TABELA 3). Um estudo demonstrou que o SARS-CoV-2 pode ser capaz de infectar as células progenitoras dos glóbulos vermelhos levando uma síntese prejudicada da hemoglobina (KRONSTEIN-WIEDEMANN et al, 2022). Outro estudo defendeu que o SARS-CoV-2 parece codificar proteínas não-estruturais capazes de atuar diretamente nas cadeias beta-globínicas da hemoglobina (WENZHONG; HUALAN, 2022). CHCM apresentou um aumento nos valores do grupo moderado em relação ao grave, no entanto, ambos os grupos exibiram níveis dentro dos valores de referência (TABELA 3). Um estudo sobre parâmetros laboratoriais associados ao tempo de permanência hospitalar por COVID-19 demonstrou que CHCM era um preditor negativo (JERAIBY et al., 2021). Os níveis de RDW nos pacientes graves estavam mais aumentados que no grupo moderado, mas ambos os grupos não apresentaram parâmetros fora dos valores de referência (TABELA 3). Os valores de RDW parecem exibir maior significância na admissão e hospitalização na UTI e podem indicar mortalidade de pacientes com COVID-19, como também podem ser considerados um marcador associado a (hiper)inflamação sistêmica (BILGIR et al., 2021; GUANÍ-GUERRA et al., 2022; MORENO-TORRES et al., 2022).

Pacientes dos grupos moderado e grave apresentaram aumento dos níveis de leucócitos (leucocitose) em relação aos valores de referência, enquanto o grupo grave estava mais aumentado em relação ao moderado (TABELA 3). Uma metanálise sobre níveis de leucócitos descreveu que a leucocitose estava associada a desfechos ruins enquanto a leucopenia foi associada a um melhor prognóstico para doença (YAMADA, Takayuki et al., 2020). Os níveis de neutrófilo bastão se encontraram dentro dos valores de referência nos dois grupos, no entanto, no grupo grave apresentavam mais elevados em relação ao grupo moderado. Já os neutrófilos segmentados estavam dentro dos valores de referência apenas no grupo moderado, enquanto no grupo grave estavam mais aumentados tanto em relação ao moderado quanto em relação aos valores de referência, assim indicando uma

neutrofilia no grupo grave. Quando visto global, os níveis de neutrófilo bastão e segmentado estavam aumentados no grupo grave em relação ao moderado (TABELA 3).

Nossos dados demonstram que houve alteração dos níveis de linfócitos de ambos os grupos, sendo que os parâmetros se encontraram abaixo dos valores de referência para esse analito, e no grupo grave houve diminuição dos linfócitos em relação ao grupo moderado. No entanto, quanto ao global os níveis de linfócitos não apresentaram diferença entre os grupos. Houve uma tendência de diminuição dos valores de eosinófilos nos pacientes graves que se encontrou abaixo dos valores de referência e estavam diminuídos em relação ao grupo moderado. Enquanto o eosinófilo global não apresentou diferença entre os grupos (TABELA 3). A leucocitose, eosinopenia e linfopenia parecem estar associadas à progressão do estado inflamatório, no mais, a eosinopenia persistente pode ser um preditor de gravidade da doença como também de desfecho clínico adverso durante a hospitalização (ZHANG, J. et al., 2021). Houve aumento dos valores de monócitos em ambos os grupos em relação aos valores de referência, destacando o grupo moderado com níveis mais elevados em relação ao grupo grave. Enquanto os valores de monócito global não houve diferença entre os grupos (TABELA 3). O aumento do número de monócitos GM-CSF+ e monócitos IL-6+ sugerem um risco potencialmente alto de tempestades de citocinas pro-inflamatórias, migração e acúmulo dessas células em tecidos afetados pela doença (ZHOU et al., 2020).

Houve aumento dos níveis de DHL nos grupos moderado e grave em relação aos valores de referência, enquanto o grupo grave apresentou níveis mais elevados em relação ao moderado (TABELA 4). Quando há dano celular e/ou tecidual, essa enzima é liberada na corrente sanguínea, todavia, é um marcador inespecífico de morte celular e tecidual, por isso unicamente esse exame não traz muitas informações clínicas (GUPTA, 2022). Houve aumento de bilirrubina direta no grupo grave em relação ao grupo moderado (TABELA 4). Acredita-se que a lesão hepática em pacientes com COVID-19 seja multifatorial (CAI et al., 2021). Para mais, pacientes com níveis elevados de bilirrubina direta tiveram uma proporção maior de serem pacientes críticos, tiveram maiores chances de admissão em UTI, apresentaram maiores incidências de complicações clínicas e tiveram maiores chances de mortalidade (CHEN et al., 2022). Observamos aumento de triglicerídeos em ambos os grupos em relação aos valores de referência (TABELA 4). Aparentemente a COVID-19 influencia no metabolismo de lipídios de forma indireta causando prejuízos da função de HDL refletindo em concentrações aumentadas de triglicerídeos na corrente sanguínea (SURMA; BANACH; LEWEK, 2021).

Embora os valores de TAP não diferiram entre os grupos moderado e grave, esse analito estava ligeiramente aumentado em relação aos valores de referência para ambos os grupos (TABELA 4). Como os valores de TAP podem variar dependendo da quantidade e tipo de agente coagulante usado para desencadear a coagulação, o TAP (INR) é a medida mais adequada para comparação (SAHA et al., 2021). O TAP (INR) nesse caso não estava alterado entre os grupos (TABELA 4).

Os valores de proteína C reativa foram maiores no grupo grave em relação ao moderado (TABELA 4). Proteína C reativa é uma proteína originalmente produzida pelo fígado e fica aumentada quando há um estado inflamatório, como no caso de pacientes mais graves com COVID-19 (VELAVAN; MEYER, 2020). Os valores de ureia foram maiores no grupo grave e ambos os grupos apresentaram níveis acima

dos valores de referência. O mesmo perfil foi encontrado para creatinina (TABELA 4). Assim, a COVID-19 também é uma doença que acomete os rins e está associada à lesões renais agudas, tanto por conta do vírus quanto por conta do tratamento da doença e do agravamento da infecção (NADIM et al., 2020).

Quanto aos exames gasométricos, houve diminuição do pH no grupo grave em relação ao moderado, resultado também está abaixo dos valores de referência para o grupo grave. Houve aumento de PCO₂ no grupo grave em relação ao moderado, esse valor também se encontra aumentado em relação aos valores de referência (TABELA 5). O PCO₂ e o pH são inversamente proporcionais, assim quando há aumento das concentrações de PCO₂ o pH tende a diminuir, que é o que foi encontrado no grupo grave. Não houve diferença entre os grupos moderado e grave nos níveis de saturação, entretanto, se encontravam abaixo dos valores de referência para ambos os grupos de acordo com esse analito (TABELA 5). A baixa saturação de oxigênio é indicativo de lesão pulmonar que pode evoluir para ARDS (RANIERI et al., 2012).

Por fim, os resultados de IgM e IgG demonstram que houve uma diminuição gradual dos títulos dessas imunoglobulinas de D15 a D180 no grupo oligo (FIGURA 3A e B). Geralmente na COVID-19 IgM e IgG diminuem com tempo, enquanto a proporção de anticorpos neutralizantes produzidos de forma estável por pelo menos 5 a 7 meses após a infecção por SARS-CoV-2 (RIPPERGER et al., 2020; YANG et al., 2022). Contudo, como outros coronavírus, os indivíduos podem ser re-infectados e contrair COVID-19 novamente, ainda mais por outra variante do SARS-CoV-2 (IWASAKI, 2021).

As primeiras análises dos resultados de citometria demonstram uma diminuição das frequências de viabilidade celular de linfócitos totais nos grupos moderado e grave em relação ao grupo oligo (FIGURAS 4A e B). Há uma hipótese de que depleção de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD⁺) causada pela superexpressão de CD38 em células T estaria associada na regulação de distúrbios metabólicos e viabilidade celular (RAHIMMANESH et al., 2022). Altos níveis de IL-6 podem promover a morte de linfócitos, além do SARS-CoV-2 atuar diretamente nos linfonodos e baço contribuindo para redução dessas células no sangue periférico (FENG et al., 2020). Especificamente em relação as células T, não houve diferença entre as frequências de células T CD3⁺ nos grupos oligo, moderado e grave (FIGURA 5A). As contagens de linfócitos T CD3⁺ totais podem diminuir se comparados aos indivíduos saudáveis e/ou com formas menos graves da COVID-19, no entanto, as frequências parecem não diferir entre os acometidos pela doença (LÖHR et al., 2021; MANN et al., 2020; SONG et al., 2020). Nossos dados apontaram que a frequência de células T CD4⁺ totais foi maior no grupo moderado em relação aos grupos oligo e grave. Enquanto a frequência de células T CD8⁺ totais foi menor nesse grupo em relação ao grupo oligo (FIGURAS 5A e C). Comparações entre estágios leves/moderados com estágios graves/críticos, houve um aumento das frequências de T CD3⁺CD4⁺ nas formas de menor gravidade da COVID-19 (GARCIA-GASALLA et al., 2022). Geralmente, as frequências de células T CD4⁺ são maiores que de T CD8⁺ na circulação, enquanto cada população celular, CD4 e CD8, vão variar conforme o recrutamento desses linfócitos para os locais de lesão tecidual (KARLSSON; HUMBERT; BUGGERT, 2020).

Houve aumento da frequência de células T CD4⁺ EMRA no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado (FIGURAS 10A e B). Essa população celular carrega

características de células terminalmente diferenciadas, perdem a expressão de receptor co-estimulador, se acumulam com a idade como também perante a infecções como visto na COVID-19 (GARCIA-GASALLA et al., 2022; HENSON; RIDDELL; AKBAR, 2012).

Nossos dados demonstraram que houve diminuição da frequência de células T CD8+ CM no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado (FIGURA 11A e B). As células T CM normalmente têm pouca ou nenhuma função efetora e baixa capacidade citotóxica, mas essa população é a responsável por se proliferar e se diferenciar em células efectoras em resposta à estimulação antigênica (CZESNIKIEWICZ-GUZIK et al., 2008; KAECH; CUI, 2012; SALLUSTO; GEGINAT; LANZAVECCHIA, 2004). Pacientes com COVID-19 tendem a apresentar baixas frequências de células T CD8+ CM em relação a indivíduos saudáveis sem a doença (BERGANTINI et al., 2021; BIASI et al., 2020; MAZZONI et al., 2020).

As frequências dos receptores CD28 e CD27 em células T CD4+ apresentaram uma diminuição da frequência de CD28+CD27+ no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado, enquanto a frequência de CD28-CD27- no grupo grave aumentou em relação ao grupo moderado, o mesmo perfil foi encontrado para CD28-CD27+ (FIGURAS 12A, B e C). Essas células podem estar promovendo prejuízos diretos e indiretos com aumento de atividade inflamatória e citotóxica, além de poder regular e manter a imunossenescência nesses indivíduos (LANNA et al., 2014)

Populações de células T CD28-CD27- e EMRA apresentaram aumento de receptores de imunossenescência, por isso foram avaliados dentro de cada população a expressão de CD57 e KLRG1 mediante aos diferentes estágios da COVID-19. Foi visto um aumento de MFI de CD57 em células T CD8+ CD28-CD27+ no grupo moderado em relação ao grupo grave, mas não houve alteração de frequência nessa e nas demais populações (FIGURAS 14A, B, C e D). Quando observado o receptor KLRG1, houve aumento de frequência em células T CD8+ CD28+CD27+ no grupo oligo em relação ao grave, aumento de frequência em células T CD8+ CD28+CD27- nos grupos oligo e moderado em relação ao grave e aumento de frequência em células T CD8+ CD28-CD27- no grupo oligo em relação ao grave (FIGURA 15A, B, C e D).

Houve aumento da frequência de CD57 em células T CD4+ EMRA nos grupos oligo e grave em relação ao grupo moderado (FIGURAS 16A e B). Sendo assim CD57 mais aumentado na forma mais grave da COVID-19. Em relação ao outro receptor, houve aumento de KLRG1 em frequência células T CD4+ EMRA no grupo oligo em relação ao grupo moderado (FIGURAS 17A, B, C e D). Assim como houve aumento de KLRG1 em células T CD8+ CM e EM (FIGURAS 19A, B e C, 32A, B e C) no grupo oligo em relação aos grupos moderado e grave, houve também aumento de frequência de KLRG1 em células T CD8+ EMRA no grupo oligo em relação ao grupo grave (FIGURA 19A e D). Em modelo animal, células T CD8+ KLRG1+ efectoras são capazes de regular negativamente seu próprio receptor em condições pró-inflamatórias, sendo essencial para o desenvolvimento de células de memória periféricas com capacidade proliferativa aumentada (HERNDLER-BRANDSTETTER et al., 2018). Dessa forma o aumento de KLRG1 no grupo oligo pode não estar diretamente relacionado a imunossenescência, pelo menos em células T CD8+. Enquanto em células T CD4+ EMRA de pacientes oligo apresentam aumento dos CD57 e KLRG1 caracterizando que nesse grupo possa haver um princípio de

fenótipo senescente. No mais, aumento desses receptores estão relacionados à prejuízos na resposta vacinal (BOWYER et al., 2020; SHI et al., 2014).

Em células T CD4+ totais houve aumento da frequência de γ H2Ax+ no grupo moderado em relação ao oligo, no grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado (FIGURA 6A e B). Em células T CD8+ houve aumento de frequência de γ H2Ax nos grupos moderado e grave em relação ao grupo oligo (FIGURA 8A e B). Nossos resultados também evidenciaram aumento de frequência de γ H2Ax em populações de memória de células T CD4+ e T CD8+ NAIVE, CM, EM e EMRA no grupo grave (FIGURAS 18A, B, C, D e E, 20A, B, C, D). O aumento de γ H2Ax indica aumento de danos ao DNA e que de alguma forma as células T de pacientes no grupo grave com COVID-19 apresentam prejuízos no reparo do seu material genético (CELESTE et al., 2003).

Quando observado p38+ de células T CD4+ totais houve aumento da frequência nos grupos moderado e grave em relação ao grupo oligo (FIGURA 7). Os coronavírus são capazes de ativar a via da MAPK p38 (LEE et al., 2004), que é uma das responsáveis pela SASP (FREUND; PATIL; CAMPISI, 2011) e em linfócitos mantém e regula características de senescência celular (LANNA et al., 2014). Mesmo que o vírus não esteja diretamente regulando essa via, a inflamação provocada pela COVID-19 pode estar envolvida direta e/ou indiretamente nesse processo (GRIMES; GRIMES, 2020).

Os resultados demonstram que pacientes moderados e graves apresentam diversas alterações clínicas e laboratoriais hematológicas, gasométricas e bioquímicas. Esses dados evidenciam aumento inflamatório e danos sistêmicos como danos pulmonares, hepáticos, cardiovasculares e renais. No mais, os títulos de IgM e IgG decaíram ao longo do tempo em pacientes oligossintomáticos, podendo ser indicativo de prejuízos da resposta imune em pacientes convalescentes. Por conta dessas alterações que podem levar a uma resposta imune prejudicada, foram avaliados como estavam fenotipicamente as células T de pacientes oligo, moderado e grave. Assim de acordo com os resultados da citometria, pacientes com COVID-19, principalmente do grupo grave, apresentaram uma série de características que condizem com fenótipo de células T senescentes como menor viabilidade celular, aumento de danos ao DNA visto pelo aumento de γ H2Ax em diferentes populações celulares, acúmulo de células com perdas de receptores co-estimuladores CD28 e CD27, aumento de p38, alterações nas frequências de populações de células T de memória, aumento da frequência de EMRA e aumento de CD57+ EMRA. Essas características foram mais evidenciadas em linfócitos T CD4 do grupo grave em relação aos grupos oligo e moderado. Além disso, pacientes do grupo oligo apresentaram aumento de KLRG1 e CD57, um indicativo que a COVID-19 possa estar modulando um perfil de imunossenescência desde graus mais leves da doença. Assim esse trabalho contribui para caracterização fenotípica de células T senescentes em indivíduos de diferentes graus de acometimento da COVID-19.

REFERÊNCIAS

ADAMO, S. et al. Signature of long-lived memory CD8+ T cells in acute SARS-CoV-2 infection. *Nature*, v. 602, n. 7895, p. 148–155, 3 fev. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04280-x>>.

AIELLO, A. et al. Immunosenescence and its hallmarks: How to oppose aging strategically? A review

- of potential options for therapeutic intervention. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 2247, p. 1–19, 1 set. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02247/full>>.
- AKBAR, A. N.; FLETCHER, J. M. Memory T cell homeostasis and senescence during aging. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, p. 480–485, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.07.019>>.
- ALANIO, C. et al. Cytomegalovirus Latent Infection is Associated with an Increased Risk of COVID-19-Related Hospitalization. **The Journal of Infectious Diseases**, v. XX, n. XX XX, p. 1–11, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/infdis/jiac020>>.
- ALEEM, A.; SAMAD, A. B. A.; SLENKER, A. K. **Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19)**. [S.l.]: StatPearls [Internet], 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570580/>>.
- ALI, E. T. et al. Extensive Study on Hematological, Immunological, Inflammatory Markers, and Biochemical Profile to Identify the Risk Factors in COVID-19 Patients. **International Journal of Inflammation**, v. 2022, p. 1–11, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2022/5735546>>.
- AMYES, E. et al. Characterization of the CD4+ T Cell Response to Epstein-Barr Virus during Primary and Persistent Infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 6, p. 903–911, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1084/jem.20022058>>.
- APPAY, V. et al. Memory CD8+T cells vary in differentiation phenotype indifferent persistent virus infections. **Nature Medicine**, v. 8, n. 4, p. 379–385, abr. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nm0402-379>>.
- ARCANJO, A. et al. Critically Ill Coronavirus Disease 2019 Patients Exhibit Hyperactive Cytokine Responses Associated With Effector Exhausted Senescent T Cells in Acute Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 224, p. 1672–1683, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/infdis/jiab425>>.
- BALNIS, J. et al. Blood DNA methylation and COVID-19 outcomes. **Clinical Epigenetics**, v. 13, n. 118, p. 1–16, 1 dez. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13148-021-01102-9>>.
- BALUSHI, A. Al et al. Immunological predictors of disease severity in patients with COVID-19. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 110, p. 83–92, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.06.056>>.
- BARASHDI, M. A. Al et al. Protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC or CD45). **Journal of Clinical Pathology**, p. 548–552, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2020-206927>>.
- BAYATI, A. et al. SARS-CoV-2 infects cells after viral entry via clathrin-mediated endocytosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, n. 100306, p. 1–12, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100306>>.
- BENETOS, A. et al. The Nexus between Telomere Length and Lymphocyte Count in Seniors Hospitalized with COVID-19. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 76, n. 8, p. E97–E101, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/gerona/glab026>>.
- BERGANTINI, L. et al. Nk and t cell immunological signatures in hospitalized patients with covid-19. **Cells**, v. 10, n. 3182, p. 1–14, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/cells10113182>>.
- BEZUIDENHOUT, M. C. et al. Correlating arterial blood gas, acid–base and blood pressure abnormalities with outcomes in COVID-19 intensive care patients. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 58, n. 2, p. 95–101, 1 mar. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0004563220972539>>.
- BIASI, S. De et al. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. **Nature Communications**, v. 11, n. 3434, p. 1–17, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-020-17292-4>>.
- BILGIR, F. et al. Roles of certain biochemical and hematological parameters in predicting mortality and ICU admission in COVID-19 patients. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 67, p. 67–73, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1806-9282.67.Suppl1.20200788>>.
- BOSS, A. N. et al. Development of a Mortality Prediction Model in Hospitalised SARS-CoV-2 Positive Patients Based on Routine Kidney Biomarkers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7260, p. 1–13, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms23137260>>.
- BOWYER, G. et al. Reduced Ebola vaccine responses in CMV+ young adults is associated with expansion of CD57+KLRG1+ T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 7, p. 1–11, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1084/jem.20200004>>.
- BRASIL. **Guia de vigilância epidemiológica: emergência de saúde pública de importância nacional pela doença pelo coronavírus 2019 - covid-19**. 1. ed. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2022. v. 1. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/publicacoes>>.

- tecnicas/guias-e-planos/guia-de-vigilancia-epidemiologica-covid-19/view>.
- BUCHHOLZ, V. R.; NEUENHAHN, M.; BUSCH, D. H. CD8 + T cell differentiation in the aging immune system: until the last clone standing. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 4, p. 549–554, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2011.05.002>>.
- CAI, Y. et al. Liver injury in COVID-19: Detection, pathogenesis, and treatment. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 22, p. 3022–3036, 2021. Disponível em: <<https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v27/i22/3022.htm>>.
- CANÇADO, R. **COMENTÁRIO SOBRE O ESTUDO COVID-19: Attacks the 1-Beta Chain of Hemoglobin and Captures the Porphyrin to Inhibit Human Heme Metabolism. Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular.** [S.l.: s.n.], 2022. Disponível em: <<https://abhh.org.br/wp-content/uploads/2020/04/COVID-19-Attacks-the-1-Beta-Chain-of-Hemoglobin-and-Captures-the-Porphyrin-to-Inhibit-Human-Heme-Metabolism-1-2.pdf>>.
- CANTUTI-CASTELVETRI, L. et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. **Science**, v. 370, n. 6518, p. 856–860, 13 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.abd2985>>.
- CDC. **People with Certain Medical Conditions.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html>>.
- _____. **Symptoms of Coronavirus.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>>.
- CELESTE, A. et al. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. **Nature Cell Biology**, v. 5, n. 7, p. 675–679, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ncb1004>>.
- CHAN, J. F.-W. et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, p. 221–236, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>>.
- CHEN, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507–513, fev. 2020. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)>.
- CHEN, R. et al. Cytokine Storm: The Primary Determinant for the Pathophysiological Evolution of COVID-19 Deterioration. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. 589095, p. 1–11, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.589095>>.
- CHEN, W. et al. Effect of Direct Bilirubin Level on Clinical Outcome and Prognoses in Severely/Critically Ill Patients With COVID-19. **Frontiers in Medicine**, v. 9, n. 843505, p. 1–9, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmed.2022.843505>>.
- CHEN, Y.; LIU, Q.; GUO, D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 418–423, abr. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jmv.25681>>.
- CHOU, J. P.; EFFROS, R. B. T CELL REPLICATIVE SENEESCENCE IN HUMAN AGING. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 9, p. 1680–1698, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/138161213805219711>>.
- COHEN, K. W. et al. Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells. **Cell Reports Medicine**, v. 2, n. 100354, p. 1-14e6, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100354>>.
- COPPÉ, J. et al. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 5, p. 99–118, 2010.
- COVRE, L. P. et al. Circulating Senescent T Cells Are Linked to Systemic Inflammation and Lesion Size During Human Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 3001, p. 1–12, jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03001>>.
- _____. The role of senescent T cells in immunopathology. **Ageing Cell**, v. 19, n. 12, p. 1–9, 9 dez. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/accel.13272>>.
- CZESNIKIEWICZ-GUZIŁ, M. et al. T cell subset-specific susceptibility to aging. **Clin Immunol**, v. 127, n. 1, p. 107–118, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.clim.2007.12.002>>.
- DALY, J. L. et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. **Science**, v. 370, n. 6518, p. 861–865, 2020. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.abd3072>>.
- DE SOUSA, C. D. K. et al. Epidemiological profile of COVID-19 in the State of Espírito Santo, Brazil,

- from march 2020 to june 2021. **Journal of Human Growth and Development**, v. 31, n. 3, p. 507–520, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.36311/jhgd.v31.12770>>.
- DIAO, B. et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 827, p. 1–7, 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.00827/full>>.
- DOCK, J. N.; EFFROS, R. B. Role of CD8 T Cell Replicative Senescence in Human Aging and in HIV-mediated Immunosenescence. **Aging and disease**, v. 2, n. 5, p. 382–397, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22308228>>.
- DOLFI, D. V et al. Increased T-bet is associated with senescence of influenza virus-specific CD8 T cells in aged humans. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, p. 825–836, 2013.
- DOMIZIO, J. Di et al. The cGAS–STING pathway drives type I IFN immunopathology in COVID-19. **Nature**, v. 603, n. 7899, p. 145–151, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41586-022-04421-w>>.
- DONG, M. et al. ACE2, TMPRSS2 distribution and extrapulmonary organ injury in patients with COVID-19. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 131, n. 110678, p. 1–13, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332220308714>>.
- FAJGENBAUM, D. C.; JUNE, C. H. Cytokine Storm. **The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE**, v. 382, n. 23, p. 2255–2273, 2020. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra2026131>>.
- FANTECELLE, C. H. et al. Transcriptomic landscape of skin lesions in cutaneous leishmaniasis reveals a strong CD8 + T cell immunosenescence signature linked to immunopathology. **Immunology**, v. 00, p. 1–12, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/imm.13410>>.
- FARHEEN, S. et al. Patho-Physiology of Aging and Immune-Senescence: Possible Correlates With Comorbidity and Mortality in Middle-Aged and Old COVID-19 Patients. **Frontiers in Aging**, v. 2, n. 748591, p. 1–20, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fragi.2021.748591>>.
- FENG, Z. et al. The Novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Directly Decimates Human Spleens and Lymph Nodes. **medRxiv**, v. 12, n. 1, p. 1–18, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/2020.03.27.20045427>>.
- FESSLER, J. et al. Senescent T-Cells Promote Bone Loss in Rheumatoid Arthritis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 95, p. 1–9, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00095>>.
- FOTUHI, M. et al. Neurobiology of COVID-19. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 76, p. 3–19, 2020. Disponível em: <<https://content.iospress.com/articles/journal-of-alzheimers-disease/jad200581>>.
- FRANZ, K. M. et al. STING-dependent translation inhibition restricts RNA virus replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 9, p. E2058–E2067, 2018.
- FREUND, A.; PATIL, C. K.; CAMPISI, J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 8, p. 1536–1548, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.69>>.
- FULOP, T. et al. On the immunological theory of aging. **Aging: Facts and Theories**, v. 39, p. 163–176, 2014.
- GANGAEV, A. et al. Identification and characterization of a SARS-CoV-2 specific CD8+ T cell response with immunodominant features. **Nature Communications**, v. 12, n. 2593, p. 1–14, 2021.
- GARCIA-GASALLA, M. et al. Hyperinflammatory State and Low T1 Adaptive Immune Response in Severe and Critical Acute COVID-19 Patients. **Frontiers in Medicine**, v. 9, n. 828678, p. 1–12, 2022.
- GATTINONI, L. et al. T memory stem cells in health and disease. **Nature Medicine**, v. 23, n. 1, p. 18–27, 2017.
- GORGOUULIS, V. et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. **Cell**, v. 179, n. 4, p. 813–827, 31 out. 2019.
- GORONZY, Jörg J. et al. Value of Immunological Markers in Predicting Responsiveness to Influenza Vaccination in Elderly Individuals. **Journal of Virology**, v. 75, n. 24, p. 12182–12187, dez. 2001.
- GORONZY, Jörg J.; WEYAND, C. M. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. **Nature Immunology**, v. 14, n. 5, p. 428–436, 2013.
- GRAY, J. I.; WESTERHOF, L. M.; MACLEOD, M. K. L. The roles of resident, central and effector memory CD4 T-cells in protective immunity following infection or vaccination. **Immunology**, v. 154, n. 4, p. 574–581, 2018.
- GREENHALGH, T. et al. Ten scientific reasons in support of airborne transmission of SARS-CoV-2. **The Lancet**, v. 397, n. 10285, p. 1603–1605, 2021.
- GRIFONI, A. et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-

- 19 Disease and Unexposed Individuals. **Cell**, v. 181, n. 7, p. 1489–1501, jun. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>>.
- GRIMES, J. M.; GRIMES, K. V. p38 MAPK inhibition: A promising therapeutic approach for COVID-19. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 144, p. 63–65, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.05.007>>.
- GUANÍ-GUERRA, E. et al. Diagnostic Accuracy of the RDW for Predicting Death in COVID-19. **Medicina (Lithuania)**, v. 58, n. 5, p. 1–9, 2022.
- GUPTA, G. S. The Lactate and the Lactate Dehydrogenase in Inflammatory Diseases and Major Risk Factors in COVID - 19 Patients. **Inflammation**, p. 1–33, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10753-022-01680-7>>.
- HADJADJ, J. et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. **Science**, v. 369, p. 718–724, 2020.
- HAMMING, I. et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **Journal of Pathology**, v. 203, p. 631–637, 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/path.1570>>.
- HARIHARAN, A. et al. The Role and Therapeutic Potential of NF-kappa-B Pathway in Severe COVID - 19 Patients. **Inflammopharmacology**, v. 29, n. 1, p. 91–100, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10787-020-00773-9>>.
- HAZELDINE, J.; LORD, J. M. Immunesenescence: A Predisposing Risk Factor for the Development of COVID-19? **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 573662, p. 1–20, 2020.
- HENRY, B. M. et al. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. **Clin Chem Lab Med**, v. 58, n. 7, p. 1021–1028, 2020.
- HENSON, S. M.; AKBAR, A. N. KLRG1-more than a marker for T cell senescence. **Age**, v. 31, n. 4, p. 285–291, 2009.
- HENSON, S. M.; RIDDELL, N. E.; AKBAR, A. N. Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, n. 4, p. 476–481, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2012.04.001>>.
- HERNDLER-BRANDSTETTER, D. et al. KLRG1+ Effector CD8+ T Cells Lose KLRG1, Differentiate into All Memory T Cell Lineages, and Convey Enhanced Protective Immunity. **Immunity**, v. 48, n. 4, p. 716- 729.e8, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.015>>.
- HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, p. 271–280, abr. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420302294>>.
- HOU, Y. J. et al. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. **Cell**, v. 182, p. 429- 446.e14, 2020.
- HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, fev. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620301835>>.
- HUANG, Y. et al. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, n. 9, p. 1141–1149, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>>.
- HUMPHREYS, D.; ELGHAZALY, M.; FRISAN, T. Senescence and Host–Pathogen Interactions. **Cells**, v. 9, n. 1747, p. 1–17, 2020.
- IFCC. **5. Biochemical Monitoring of COVID-19 Patients**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/mm6914e4.htm?s_cid=mm6914e4_w>. Acesso em: 7 jun. 2022.
- IWASAKI, A. What reinfections mean for COVID-19. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 3–5, jan. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309920307830>>.
- JACKSON, C. B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, p. 3–20, 2022.
- JERAIBY, M. A. et al. Routine laboratory parameters predict serious outcome as well as length of hospital stay in COVID-19. **Saudi Medical Journal**, v. 42, n. 11, p. 1165–1172, 2021.
- JIN, J. M. et al. Gender Differences in Patients With COVID-19: Focus on Severity and Mortality. **Frontiers in Public Health**, v. 8, n. 152, p. 1–6, 2020.
- KAECH, S. M.; CUI, W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 11, p. 749–761, 19 nov. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3307>>.

- KALIM, H. et al. Accelerated immune aging was correlated with lupus-associated brain fog in reproductive-age systemic lupus erythematosus patients. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 00, p. 1–7, 2020.
- KANEKO, N. et al. Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. **Cell**, v. 183, p. 143–157, 2020.
- KANG, C. K. et al. Aberrant hyperactivation of cytotoxic T-cell as a potential determinant of COVID-19 severity. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 97, p. 313–321, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.05.106>>.
- KARED, H. et al. CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 65, n. 4, p. 441–452, 2016.
- KARLSSON, A. C.; HUMBERT, M.; BUGGERT, M. The known unknowns of T cell immunity to COVID-19. **Science Immunology**, v. 5, n. eabr8063, p. 1–7, 2020.
- KAUL, D. An overview of coronaviruses including the SARS-2 coronavirus – Molecular biology, epidemiology and clinical implications. **Current Medicine Research and Practice**, v. 10, n. 2, p. 54–64, mar. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352081720300398>>.
- KHAN, M. et al. Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. **Cell**, v. 184, p. 5932–5949.e15, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.027>>.
- KLENERMAN, P. The (gradual) rise of memory inflation. **Immunological Reviews**, p. 99–112, 2018.
- KOCH, S. et al. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. **Immunity and Ageing**, v. 5, n. 6, p. 1–12, 25 jul. 2008.
- KREUTMAIR, S. et al. Distinct immunological signatures discriminate severe COVID-19 from non-SARS-CoV-2-driven critical pneumonia. **Immunity**, v. 54, n. 7, p. 1578–1593.e5, 2021.
- KRONSTEIN-WIEDEMANN, R. et al. SARS-CoV-2 Infects Red Blood Cell Progenitors and Dysregulates Hemoglobin and Iron Metabolism. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 18, p. 1809–1821, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12015-021-10322-8>>.
- KUILMAN, T.; PEEPER, D. S. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. **Nature Reviews**, v. 9, p. 81–94, 2009.
- LANNA, A. et al. IFN- α Inhibits Telomerase in Human CD4 + T Cells by Both hTERT Downregulation and Induction of p38 MAPK Signaling. **The Journal of Immunology**, v. 191, p. 3744–3752, 2013.
- _____. The kinase p38 activated by the metabolic regulator AMPK and scaffold TAB1 drives the senescence of human T cells. **Nature Immunology**, v. 15, n. 10, p. 965–972, out. 2014.
- LEE, C. et al. Altered p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Expression in Different Leukocytes with Increment of Immunosuppressive Mediators in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 7841–7847, 2004.
- LI, H.; ZHOU, F.; ZHANG, L. STING, a critical contributor to SARS-CoV-2 immunopathology. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 106, p. 1–3, 30 dez. 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41392-022-00967-3>>.
- LI, Z.; BUCK, M. Neuropilin-1 assists SARS-CoV-2 infection by stimulating the separation of Spike protein S1 and S2. **Biophysical Journal**, v. 120, p. 2828–2837, 2021a. Disponível em: <[https://www.cell.com/biophysj/pdfExtended/S0006-3495\(21\)00455-0](https://www.cell.com/biophysj/pdfExtended/S0006-3495(21)00455-0)>.
- _____. Neuropilin-1 assists SARS-CoV-2 infection by stimulating the separation of Spike protein S1 and S2. **Biophysical Journal** 120, v. 120, p. 2828–2837, jul. 2021b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.05.026>>.
- LIBRI, V. et al. Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional CD4+ CD45RA+ CD27– T cells: the potential involvement of interleukin-7 in this process. **Immunology**, v. 132, n. 3, p. 326–339, mar. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2567.2010.03386.x>>.
- LIU, H. et al. T Cell Exhaustion and Senescence in Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoma Patients. **Research Square**, p. 1–16, 2020.
- LIU, Y.-C.; KUO, R.-L.; SHIH, S.-R. COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. **Biomedical Journal**, v. 43, p. 328–333, ago. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.04.007>>.
- LÖHR, P. et al. Impact of age and gender on lymphocyte subset counts in patients with COVID-19. **Cytometry**, v. 2, p. 1–9, 2021.
- LUO, X.-H. et al. T cell immunobiology and cytokine storm of COVID-19. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 93, p. 1–15, 2021.
- MACHADO, T. R.; MACHADO, T. R.; PASCUTTI, P. G. The p38 MAPK Inhibitors and Their Role in

- Inflammatory Diseases. **Chemistry Select**, v. 6, p. 5729–5742, 2021.
- MANGALMURTI, N.; HUNTER, C. A. Cytokine Storms: Understanding COVID-19. **Immunity**, v. 53, p. 1–7, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.017>>.
- MANN, E. R. et al. Longitudinal immune profiling reveals distinct features of COVID-19 pathogenesis. **medRxiv**, p. 1–17, 2020. Disponível em: <<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.06.13.20127605v1>>.
- MARTÍNEZ-LIMÓN, A. et al. The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, p. 1–18, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms21061913>>.
- MARTINEZ, E. Z. et al. Comorbidities and the risk of death among individuals infected by COVID-19 in Espírito Santo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, n. e0138-2021, p. 1–6, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0138-2021>>.
- MATHEW, D. et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. **Science**, v. 369, n. 1209, p. 1–17, 2020. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.abc8511>>.
- MAXMEN, A. WHO report into COVID pandemic origins zeroes in on animal markets, not labs. **Nature**, v. 592, n. 7853, p. 173–174, 8 abr. 2021. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/d41586-021-00865-8>>.
- MAZZONI, A. et al. Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 9, p. 4694–4703, 2020.
- MCMAHAN, K. et al. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. **Nature**, v. 590, n. 7847, p. 630–634, 25 fev. 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-03041-6>>.
- MDKHANA, B. et al. Nucleic Acid-Sensing Pathways During SARS-CoV-2 Infection: Expectations versus Reality. **Journal of Inflammation Research**, v. 14, p. 199–216, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.2147/JIR.S277716>>.
- MEYER, N. J.; GATTINONI, L.; CALFEE, C. S. Acute respiratory distress syndrome. **The Lancet**, v. 398, n. 10300, p. 622–637, 2021. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00439-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00439-6)>.
- MODERBACHER, C. R. et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. **Cell**, v. 183, n. 4, p. 996–1012.e19, nov. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.038>>.
- MONDAL, S. et al. Blood Gas Analysis among COVID-19 Patients: A Single Centre Retrospective Observational Study. **Journal Of Clinical and Diagnostic Research**, v. 15, n. 8, p. 1–4, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.7860/JCDR/2021/49835.15185>>.
- MORENO-TORRES, V. et al. Red blood cell distribution width as a marker of hyperinflammation and mortality in COVID-19. **Annals of Palliative Medicine**, p. 1–13, 2022. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.21037/apm-22-119>>.
- MORI, Y. et al. KIM-1/TIM-1 is a Receptor for SARS-CoV-2 in Lung and Kidney. **medRxiv**, p. 1–28, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/2020.09.16.20190694>>.
- MUÑOZ-ESPÍN, D.; SERRANO, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 7, p. 482–496, 23 jul. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3823>>.
- MURAKAMI, N.; RIELLA, L. V. Co-Inhibitory Pathways and Their Importance in Immune Regulation. v. 98, n. 1, p. 3–14, 2014. Disponível em: <https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2014/07150/Co_Inhibitory_Pathways_and_Their_Importance_in.3.aspx>.
- NADIM, M. K. et al. COVID-19- associated acute kidney injury: consensus report of the 25th Acute Disease Quality Initiative (ADQI) Workgroup. **Nature Reviews Nephrology**, v. 16, p. 747–764, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41581-020-00356-5>>.
- NEHME, J. et al. Cellular senescence as a potential mediator of COVID-19 severity in the elderly. **Ageing Cell**, v. 19, n. 10, p. 1–14, 21 out. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/accel.13237>>.
- NEIDLEMAN, J. et al. SARS-CoV-2-Specific T Cells Exhibit Phenotypic Features of Helper Function, Lack of Terminal Differentiation, and High Proliferation Potential. **Cell Reports Medicine**, v. 1, n. 10081, p. 1–12.e.4, set. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100081>>.
- NISSL, J.; SEKINE, T.; BUGGERT, M. T cell immunity to SARS-CoV-2. **Seminars in Immunology**, n. 55, p. 1–11, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.smim.2021.101505>>.
- PALLADINO, M. Complete blood count alterations in COVID-19 patients. **Biochemia medica**, v. 31, n.

- 3, p. 403–415, 15 out. 2021. Disponível em: <<https://www.biochemia-medica.com/en/journal/31/3/10.11613/BM.2021.030501>>.
- PARK, A.; IWASAKI, A. Type I and Type III Interferons – Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. **Cell Host and Microbe**, v. 27, n. 6, p. 870–878, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.008>>.
- PATTERSON, H. et al. Protein kinase inhibitors in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 176, n. 1, p. 1–10, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/cei.12248>>.
- PAWELEC, G. Age and immunity: What is “immunosenescence”? **Experimental Gerontology**, v. 105, p. 4–9, 1 maio 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2017.10.024>>.
- _____. Immunosenescence: Role of cytomegalovirus. **Experimental Gerontology**, v. 54, p. 1–5, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2013.11.010>>.
- PEREIRA, B. I. et al. Senescent cells evade immune clearance via HLA-E-mediated NK and CD8+ T cell inhibition. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10335-5>>.
- _____. Sestrins induce natural killer function in senescent-like CD8+ T cells. **Nature Immunology**, v. 21, n. 6, p. 684–694, 30 jun. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41590-020-0643-3>>.
- QIU, P. et al. Clinical characteristics, laboratory outcome characteristics, comorbidities, and complications of related COVID-19 deceased: a systematic review and meta-analysis. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 32, p. 1869–1878, 1 set. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40520-020-01664-3>>.
- RAGAB, D. et al. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 1446, p. 1–4, 16 jun. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.01446/full>>.
- RAHIMMANESH, I. et al. Conceptual Framework for SARS-CoV-2 – Related Lymphopenia. **Advanced Biomedical Research**, v. 11, n. 16, p. 1–4, 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8977610/>>.
- RAMOS-CASALS, M.; BRITO-ZERÓN, P.; MARIETE, X. Systemic and organ-specific immune-related manifestations of COVID-19. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 17, p. 315–332, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41584-021-00608-z>>.
- RANIERI, V. M. et al. Acute respiratory distress syndrome: The Berlin definition. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 307, n. 23, p. 2526–2533, 2012. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/1160659>>.
- RAPHAEL, I.; JOERN, R. R.; FORSTHUBER, T. G. Memory CD4+ T Cells in Immunity and Autoimmune Diseases. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 1–23, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/cells9030531>>.
- REDDY, R. K. et al. The effect of smoking on COVID-19 severity: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 2, p. 1045–1056, 2021.
- RHA, M.; SHIN, E. Activation or exhaustion of CD8+ T cells in patients with COVID-19. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 18, p. 2325–2333, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41423-021-00750-4>>.
- RICCI, D. et al. Innate Immune Response to SARS-CoV-2 Infection: From Cells to Soluble Mediators. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7017, p. 1–20, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms22137017>>.
- RIPPERGER, T. J. et al. Orthogonal SARS-CoV-2 Serological Assays Enable Surveillance of Low-Prevalence Communities and Reveal Durable Humoral Immunity. **Immunity**, v. 53, n. 5, p. 925–933.e4, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.10.004>>.
- RODIER, F. et al. DNA-SCARS: Distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 1, p. 68–81, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1242/jcs.071340>>.
- RODRIGUEZ, I. J. et al. Immunosenescence Study of T Cells: A Systematic Review. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 604591, p. 1–17, 15 jan. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604591>>.
- SABÓIA, G. et al. **Anvisa aprova uso emergencial das vacinas CoronaVac e AstraZeneca no Brasil**. Disponível em: <<https://noticias.uol.com.br/saude/ultimas-noticias/redacao/2021/01/17/anvisa-aprova-pedido-de-vacina-do-butantan-e-da-fiocruz.htm>>.
- SABOURI, A. H. et al. Impaired function of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)– specific CD8+ T cells in HTLV-1 – associated neurologic disease. **IMMUNOBIOLOGY**, v. 112, n. 6, p. 2411–

- 2420, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-140335>>.
- SAHA, A. et al. Evolving Paradigm of Prothrombin Time Diagnostics with Its Growing Clinical Relevance towards Cardio-Compromised and COVID-19 Affected Population. **Sensors**, v. 21, n. 2636, p. 1–33, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/s21082636>>.
- SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. CENTRAL MEMORY AND EFFECTOR MEMORY TCELL SUBSETS: Function, Generation, and Maintenance. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 745–763, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702>>.
- SBAC. **Alterações laboratoriais em pacientes com Covid-19**. Disponível em: <<https://www.sbac.org.br/blog/2020/03/26/alteracoes-laboratoriais-em-pacientes-com-covid19/>>. Acesso em: 7 jun. 2022.
- SCHULIEN, I. et al. Characterization of pre-existing and induced SARS-CoV-2-specific CD8+ T cells. **Nature Medicine**, v. 27, p. 78–85, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-01143-2>>.
- SEGUNDO, D. S. et al. Innate and adaptive immune assessment at admission to predict clinical outcome in covid-19 patients. **Biomedicines**, v. 9, n. 917, p. 1–13, 1 ago. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/biomedicines9080917>>.
- SEKINE, T. et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. **Cell**, v. 183, p. 158–168, 2020.
- SETTE, A.; CROTTY, S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. **Cell**, v. 184, n. 4, p. 861–880, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.007>>.
- SHI, L. et al. KLRG1 Impairs CD4 + T Cell Responses via p16 ink4a and p27 kip1 Pathways: Role in Hepatitis B Vaccine Failure in Individuals with Hepatitis C Virus Infection. **The Journal of Immunology**, v. 192, p. 649–657, 2014. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/192/2/649>>.
- SOBRAL, M. F. F. et al. A retrospective cohort study of 238,000 COVID-19 hospitalizations and deaths in Brazil. **Scientific Reports**, v. 12, n. 3529, p. 1–11, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-022-07538-0>>.
- SONG, J. et al. Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19. **Nature Communications**, v. 11, n. 3410, p. 1–10, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-020-17240-2>>.
- SOUZA, F. S. H. de et al. On the analysis of mortality risk factors for hospitalized COVID-19 patients: A data-driven study using the major Brazilian database. **PLoS ONE**, p. 1–21, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248580>>.
- STAHL, E. C.; BROWN, B. N. Cell Therapy Strategies to Combat Immunosenescence. **Organogenesis**, v. 11, p. 159–172, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15476278.2015.1120046>>.
- SUNGNACK, W. et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. **Nature Medicine**, v. 26, n. 5, p. 681–687, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41591-020-0868-6>>.
- SURMA, S.; BANACH, M.; LEWEK, J. COVID-19 and lipids. The role of lipid disorders and statin use in the prognosis of patients with SARS-CoV-2 infection. **Lipids in Health and Disease**, v. 20, n. 141, p. 1–14, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12944-021-01563-0>>.
- SWAIN, S. L.; MCKINSTRY, K. K.; STRUTT, T. M. Expanding roles for CD4 + T cells in immunity to viruses. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. February, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nri3152>>.
- TEDESCHI, V. et al. CD8+ T Cell Senescence: Lights and Shadows in Viral Infections, Autoimmune Disorders and Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3374, p. 1–14, 1 mar. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms23063374>>.
- THORNE, L. G. et al. SARS-CoV-2 sensing by RIG-I and MDA5 links epithelial infection to macrophage inflammation. **The EMBO Journal**, v. 40, n. 15, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.15252/emboj.2021107826>>.
- TOVAR-SALAZAR, A. et al. Regulatory function of cytomegalovirus-specific CD4 + CD27 – CD28 – T cells. **Virology**, v. 398, p. 158–167, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.038>>.
- TOVAR-SALAZAR, A.; WEINBERG, A. Cytomegalovirus infection in HIV-infected and uninfected individuals is characterized by circulating regulatory T cells of unconstrained antigenic specificity. **PLoS ONE**, p. 1–14, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180691>>.
- TROY, S. B. et al. Association of CMV, HBV, or HCV co-infection with vaccine response in adults with

- well-controlled HIV infection. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 12, n. 5, p. 1295–1299, 3 maio 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2015.1121336%0ASHORT>>.
- URRA, J. M. et al. Selective CD8 cell reduction by SARS-CoV-2 is associated with a worse prognosis and systemic inflammation in COVID-19 patients. **Clinical Immunology**, v. 217, 1 ago. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108486>>.
- VABRET, N. et al. Review Immunology of COVID-19 : Current State of the Science. **Immunity**, v. 52, p. 910–941, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.002%0A>>.
- VARDHANA, S. A.; WOLCHOK, J. D. The many faces of the anti-COVID immune response. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 6, p. 1–10, 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/doi/10.1084/jem.20200678/151725/The-many-faces-of-the-antiCOVID-immune-responseA>>.
- VELAVAN, T. P.; MEYER, C. G. Mild versus severe COVID-19: Laboratory markers. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 95, p. 304–307, 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.061>>.
- VUKMANOVIC-STEJIC, M. et al. The Characterization of Varicella Zoster Virus–Specific T Cells in Skin and Blood during Aging. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 7, p. 1752–1762, jul. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jid.2015.63>>.
- WANG, F. et al. The laboratory tests and host immunity of COVID-19 patients with different severity of illness. **JCI Insight**, v. 5, n. 10, p. 1–11, 21 maio 2020. Disponível em: <<https://insight.jci.org/articles/view/137799>>.
- WANG, S. et al. AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells. **Cell Research**, v. 31, n. 2, p. 126–140, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41422-020-00460-y>>.
- WEISKOPF, D.; SCHMITZ, K. S.; RAADSEN, M. P.; GRIFONI, A.; OKBA, N. M. A.; ENDEMAN, H.; VAN DEN AKKER, J. P. C.; et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. **Science Immunology**, v. 5, n. 48, p. 1–11, 2020. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.abd2071>>.
- WEISKOPF, D.; SCHMITZ, K. S.; RAADSEN, M. P.; GRIFONI, A.; OKBA, N. M. A.; ENDEMAN, H.; AKKER, J. P. C. van den; et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. **Science Immunology**, v. 2021, p. 1–15, 2020. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.abd2071>>.
- WEITZMAN, M. D.; WEITZMAN, J. B. What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity. **Cell Host and Microbe**, v. 15, n. 3, p. 283–294, 12 mar. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.010>>.
- WENZHONG, L.; HUALAN, L. COVID-19: Attacks the 1-beta Chain of Hemoglobin to Disrupt Respiratory Function and Escape Immunity. **ChemRxiv**, p. 1–31, 2022. Disponível em: <<https://chemrxiv.org/engage/chemrxiv/article-details/61ec153b8d70c3d3600a0e6b>>.
- WESTMEIER, J. et al. Impaired cytotoxic CD8+ T cell response in elderly COVID-19 patients. **mBio**, v. 11, n. 5, p. 1–13, 1 set. 2020.
- WHO. **Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it**. Disponível em: <[https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)>. Acesso em: 4 jan. 2021a.
- _____. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 1 abr. 2021.
- _____. **WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020**. Disponível em: <<https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>>. Acesso em: 1 abr. 2021b.
- WOOL, G. D.; MILLER, J. L. The Impact of COVID-19 Disease on Platelets and Coagulation. **Pathobiology**, v. 88, n. 1, p. 15–27, 1 jan. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1159/000512007>>.
- WU, J. et al. Immunological Profiling of COVID-19 Patients with Pulmonary Sequelae. **mBio**, v. 12, n. 5, p. 1–16, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/mBio.01599-21>>.
- XINHUA. **New-type coronavirus causes pneumonia in Wuhan: expert**. Disponível em: <http://www.xinhuanet.com/english/2020-01/09/c_138690570.htm>. Acesso em: 5 abr. 2021.
- XU, Z. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 4, p. 420–422, abr. 2020. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X)>.
- YAMADA, Taisho et al. RIG-I triggers a signaling-abortive anti-SARS-CoV-2 defense in human lung

- cells. **Nature Immunology**, v. 22, n. 7, p. 820–828, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41590-021-00942-0>>.
- YAMADA, Takayuki et al. Value of leukocytosis and elevated C-reactive protein in predicting severe coronavirus 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. **Clinica Chimica Acta**, v. 509, p. 235–243, 1 out. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.008>>.
- YANG, J. et al. Seroprevalence and dynamics of anti-SARS-CoV-2 antibodies: a longitudinal study based on patients with underlying diseases in Wuhan. **Respiratory Research**, v. 23, n. 188, p. 1–12, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12931-022-02096-5>>.
- YAO, Z. et al. Immune environment modulation in pneumonia patients caused by coronavirus: SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2. **Aging**, v. 12, n. 9, p. 7639–7651, 2 maio 2020. Disponível em: <<https://www.aging-us.com/lookup/doi/10.18632/aging.103101>>.
- YIN, T. et al. Prevalence of comorbidity in Chinese patients with COVID-19: systematic review and meta-analysis of risk factors. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 200, p. 1–13, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12879-021-05915-0>>.
- ZHANG, J. et al. Clinical, radiological, and laboratory characteristics and risk factors for severity and mortality of 289 hospitalized COVID-19 patients. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 76, n. 2, p. 533–550, 1 fev. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/all.14496>>.
- ZHANG, N.; BEVAN, M. J. CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. **Immunity**, v. 35, n. 2, p. 161–168, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.010>>.
- ZHANG, Y. et al. Telomere Length in Peripheral Blood Lymphocytes Contributes to the Development of HPV-Associated Oropharyngeal Carcinoma. **Cancer Res**, v. 73, n. 19, p. 20–24, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0881>>.
- ZHOU, F. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, 2020. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)>.
- ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 12 mar. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>>.
- ZHOU, Y. et al. Aberrant pathogenic GM-CSF+ T cells and inflammatory CD14+CD16+ monocytes in severe pulmonary syndrome patients of a new coronavirus. **bioRxiv preprint**, p. 1–10, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/2020.02.12.945576>>.
- ZHUANG, Z. et al. Mapping and role of T cell response in SARS-CoV-2-infected mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 4, p. 1–13, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1084/jem.20202187>>.
- ZIEGLER, C. G. K. et al. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. **Cell**, v. 181, n. 5, p. 1016–1035, maio 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420305006>>.