



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

PAOLA DE OLIVEIRA LOPES

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE DANO INESPECÍFICO MEDIADO POR
CÉLULAS T CD8 NO PULMÃO DE PACIENTES COM COVID-19**

VITÓRIA, ES

2022

PAOLA DE OLIVEIRA LOPES

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE DANO INESPECÍFICO MEDIADO POR
CÉLULAS T CD8 NO PULMÃO DE PACIENTES COM COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes

VITÓRIA, ES

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

L864a Lopes, Paola de Oliveira, 1996-
Análise da presença de dano inespecífico mediado por
células T CD8 no pulmão de pacientes com COVID-19 / Paola
de Oliveira Lopes. - 2022.
61 f. : il.

Orientador: Daniel Claudio de Oliveira Gomes.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Imunopatologia. I. Gomes, Daniel Claudio de Oliveira. II.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

ATA DE EXAME DE DEFESA DO MESTRADO

Ata da sessão de Defesa da Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, da discente **PAOLA DE OLIVEIRA LOPES**, realizada às 14:00h do dia doze de agosto do ano dois mil e vinte e dois, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. A sessão pública será realizada por meio de videoconferência, conforme Portaria Normativa 08/2021 da PRPPG que estabelece as diretrizes básicas para a realização de defesas por meio de videoconferência em atendimento à Resolução do Conselho Universitário no 31/2021 que regulamenta a reorganização das atividades acadêmicas, administrativas e eventos no âmbito da UFES como medida de prevenção à COVID-19. O presidente da Banca, Prof. Dr. **DANIEL CLÁUDIO DE OLIVEIRA GOMES**, apresentou os demais membros da comissão examinadora constituída pelos Doutores: **FAUSTO EDMUNDO LIMA PEREIRA**, da Universidade Federal do Espírito Santo, como membro titular interno; **RICARDO GONÇALVES**, da Universidade Federal de Minas Gerais, como membro titular externo, perante o qual **PAOLA DE OLIVEIRA LOPES**, aluna regularmente matriculada no Curso de Mestrado em Biotecnologia, defendeu seu exame de qualificação. A aluna apresentou a proposta de tese intitulada "Análise de p16, NKG2D e MICA/B na lesão pulmonar de pacientes com COVID-19 letal". Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a mestranda aprovada na defesa de Mestrado. Eu, Daniel Cláudio de Oliveira Gomes, que presidi a Banca de qualificação, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé.

Vitória, 12 de AGOSTO de 2022.

Prof. Dr. **DANIEL CLÁUDIO DE OLIVEIRA GOMES**
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

Prof. Dr. **FAUSTO EDMUNDO LIMA PEREIRA**
Universidade Federal do Espírito Santo – Titular Interno

Prof. Dr. **RICARDO GONÇALVES**
Universidade Federal de Minas Gerais - Titular Externo



PAOLA DE OLIVEIRA LOPES

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE DANO INESPECÍFICO MEDIADO POR
CÉLULAS T CD8 NO PULMÃO DE PACIENTES COM COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 12 de agosto de 2022.

Prof. Daniel Claudio de Oliveira Gomes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Ricardo Gonçalves
Universidade Federal de Minas Gerais

VITÓRIA, ES

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Imunobiologia do NDI, à Luciana, Renan e Carlos que me acolheram a equipe e sempre estiveram disponíveis para ajudar em todas as tarefas. Aos demais colegas de grupo Isabela, Pedro, Thalya, Júlia e Priscila pela companhia e atenção no dia a dia. E em especial ao meu orientador, prof. Daniel, que sempre esteve presente durante todos os passos desse mestrado. Obrigada pela confiança, incentivo e ensinamentos ao longo desses anos. Muito obrigada à todos por proporcionarem ótimos momentos durante essa trajetória!

À prof^a. Sandra e a Camila do Laboratório de Patologia Molecular da UFES pela parceria, ensinamentos e disponibilidade.

À prof^a. Marisa Dolhnikoff e prof^a. Thais Mauad do Laboratório de Patologia Pulmonar da USP por cederem as amostras utilizadas para esse estudo.

À minha família, meu namorado Thiago, por me encorajar, pelo companheirismo, paciência e apoio durante esses anos, seu apoio foi fundamental! Meu pai, José Márcio, minha mãe Sandra, e meu irmão Lucas, obrigada por me apoiarem sempre, pelo incentivo e compreensão dos momentos em que não pude estar presente. Devo tudo a vocês.

Por fim, agradeço a agência de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo.

RESUMO

LOPES, P.O. **Avaliação da presença de dano inespecífico mediado por células T CD8 no pulmão de pacientes com COVID-19.** 2022. 111f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

Os pacientes que desenvolvem sintomas mais graves da COVID-19 frequentemente apresentam quadros de lesão pulmonar inflamatória aguda. A lesão do epitélio pulmonar se relaciona a presença de alta atividade inflamatória mediada por citocinas e atividade citotóxica. Células senescentes se acumulam nos tecidos e apresentam distúrbios fenotípicos e funcionais, resultando na participação de processos patológicos, mediados pela intensa atividade inflamatória. Este último, favorecendo a aquisição de receptores de células *natural killer* (NKR) em células T CD8, e seus ligantes (NKRL) e outras populações celulares. Nesse trabalho, através de técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência avaliamos a presença de p16, importante marcador de senescência, e a expressão de NKG2D e seu ligante (MICA/MICB) por células da lesão pulmonar de pacientes com COVID-19 fatal. Nossas análises demonstram que pacientes com COVID-19 apresentam um intenso infiltrado inflamatório, com acúmulo de células TCD8 e macrófagos alveolares (CD68⁺) senescentes. Além disso, observamos acentuada expressão do ligante MICA/B, que foi significativamente mais associado a macrófagos, enquanto que, nenhuma expressão diferencial foi vista em células epiteliais pulmonares (AE1/AE3). Por fim, não observamos a presença, em pacientes, do receptor NKG2D expresso por células CD8⁺ em comparação a controles saudáveis. Isto sugere que possíveis danos mediados pela ativação antígeno inespecífica de células T CD8 poderiam ser intermediados por outros ligantes de células NK. Os resultados desse trabalho contribuem para melhor compreensão da participação da senescência e da atividade de NKRs expressos por células T senescentes na imunopatogênese da COVID-19.

Palavras-chave: Imunopatologia. Senescência. Imunosenescência. Receptores de células natural killers (NKR). Células T CD8

ANALYSIS OF P16, NKG2D AND MICA/B EXPRESSION IN PULMONARY INJURY OF PATIENTS WITH LETHAL COVID-19

ABSTRACT

LOPES, P.O. **Analysis of p16, NKG2D and MICA/B expression in pulmonary injury of patients with lethal COVID-19.** 2022. 111f. Dissertation (Master in Biotechnology) – Post-Graduate Program in Biotechnology, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Patients who develop more severe symptoms of COVID-19 often present an acute inflammatory lung injury characterized by the presence of acute respiratory distress syndrome (ARDS). The lung epithelium is related to the presence of immune system cells with high inflammatory activity, mediated by cytokines production and cytotoxicity. Senescent cells accumulate in tissues during ageing, chronic stimulatory processes and infections. These cells present phenotypic and functional disorders, resulting in the inability to control pathogens, as well as tissue pathogenesis mediated through intense inflammatory activity. The latter favours the acquisition of natural killer cell receptors (NKR) on CD8 T cells, and their ligands (NKRL) and other cell populations. In this work, using immunohistochemistry and immunofluorescence techniques using p16, we evaluated the presence of senescent cells in the lung injury of patients with fatal COVID-19. Our analyzes demonstrate diffuse alveolar damage (DAD) with intense inflammatory exudate in the intra-alveolar and interseptal regions. Compared to healthy controls, patients with COVID-19 showed an intense cellular inflammatory infiltrate, with an accumulation of CD8 T cells and senescent alveolar macrophages (CD68+). Complementary analyzes in patients' lungs demonstrate the presence of cells expressing the MICA/B ligand, which was significantly more associated with macrophages. Interesting, no differential expression was seen in lung epithelial cells (AE1AE3). The presence of cells expressing the NK cell receptor (NKG2D) was determined in the lung lesion, however, compared to healthy controls, we did not find its expression associated with infiltrating CD8 T lymphocytes. This suggests that possible damage mediated by nonspecific antigen activation of CD8 T cells may be mediated by other NK cell ligands. The results of this work contribute to a better understanding of the participation of senescence and the activity of NKR expressed by senescent T cells in the immunopathogenesis of COVID-19.

Key words: Immunopathology. Senescence. Immunosenescence. Natural killer receptors (NKR). T CD8 cell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de inibição do ciclo celular mediada por p16. Via de inibição do ciclo celular mediada por p16. A presença de p16 inibe a interação entre ciclina e CDK4/6 ao se ligar ao sítio de ativação da quinase. A ausência de fosforilação da proteína do retinoblastoma (Rb) faz com que o fator de transcrição E2F não esteja livre para regular a síntese de DNA. 26

Figura 2. Presença de dano alveolar difuso dos pacientes de COVID-19. As imagens coradas com eosina e hematoxilina representam os indícios de dano alveolar difuso presentes no pulmão dos pacientes arrolados neste estudo ($n=8$). Indicado pela seta preta a presença de membrana hialina (A e B). As figuras C e D apontam para ocorrência de coágulos sanguíneos (C) e extravasamento de hemácias (D). Alguns pacientes demonstraram áreas de fibrose no pulmão apontado na figura pela seta preta (E) e em F a ocorrência de proliferação de pneumócitos. Magnificação: 40X (D, E e F); 20X (B); 10X(A e C). 34

Figura 3. Padronização da marcação do anticorpo anti-MICA/MICB. Fotomicrografia representativa de imunofluorescência indireta. Os cortes foram marcados com DAPI (azul), anticorpo *anti*-MICA/MICB (vermelho). Recuperação antigênica realizada em solução de citrato pH 6 (A), tris EDTA pH 9 (B) e proteinase K (C). Marcação positiva para MICA/MICB demonstrada em B (seta branca). Magnificação: 40X (A e B) 20X (C). 36

Figura 4. Padronização da marcação do anticorpo anti-p16(CDKN2A/p16INK4a). Fotomicrografia representativa de imunofluorescência indireta. Os cortes foram marcados com DAPI (azul), anticorpo *anti*-p16 (vermelho). Recuperação antigênica realizada em solução de citrato pH 6 (A) e tris EDTA pH 9 (B). Marcação positiva para p16 demonstrada por seta branca. Magnificação: 40X (A e B). 37

Figura 5. Padronização da marcação do anticorpo anti-NKG2D. Fotomicrografia representativa de imunohistoquímica indireta. Recuperação antigênica realizada em solução de citrato pH 6 (A) e tris EDTA pH 9 (B). Marcação positiva para NKG2D demonstrada por seta preta. Magnificação: 40X (A e B). 37

Figura 6. Fotomicrografia representativa da expressão de p16. Imagem representativa de fotomicrografia de imunofluorescência indireta (A). Os cortes foram marcados com DAPI (azul), anticorpo *anti*-p16 (vermelho). A seta indica célula com marcação positiva para p16. A análise estatística foi realizada de acordo com teste de normalidade, e assim em B o teste paramétrico t com correção de Welch foi aplicado. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. CS: controle saudável. 39

Figura 7. Expressão de p16 em células CD68+ e CD8+ na lesão pulmonar de pacientes com COVID-19. Imagem representativa de fotomicrografia de imunofluorescência indireta (A). Os cortes foram marcados com DAPI (azul), anticorpo *anti*-p16 (vermelho), *anti*-CD68 (verde) e *anti*-CD8 (branco). Célula CD8+ está indicada com a seta branca, a seta amarela indica célula p16+. A presença de dupla positividade está indicada com a seta marrom para p16+ e CD68+ e a seta cinza para p16+ e CD8+. As análises estatísticas foram realizadas de acordo com teste de normalidade, em B e C o teste paramétrico t com correção de Welch foi aplicado e em

D e E foi performed o teste de Mann-Whitney. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. CS: controle saudável..... 40

Figura 8. Expressão de MICA/MICB no tecido pulmonar. As imagens representativas de imunohistoquímica correspondem a marcação do tecido do pulmão com anticorpo *anti*-MICA/MICB, as células positivas para MICA/MICB estão indicadas com seta preta. Amostra controle negativa marcada na ausência de anticorpo primário (A); controle saudável (B); pacientes (C, D, E e F). Magnificação: 10X (A, B, C e D); 40X (E, F). 42

Figura 9. Expressão de MICA/MICB em células AE1AE3+ na lesão pulmonar de pacientes com COVID-19. Imagem representativa de fotomicrografia de imunofluorescência indireta (A). Os cortes foram marcados com DAPI (azul), anticorpo *anti*-MICA/MICB (vermelho) e *anti*-AE1AE3 (verde) e utilizadas para contagem de células. As análises estatísticas foram realizadas de acordo com teste de normalidade, em B o teste paramétrico t com correção de Welch foi aplicado e em C e D foi performed o teste de Mann-Whitney. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. CS: controle saudável. 43

Figura 10. Expressão de MICA/MICB em macrófagos lesionais do pulmão. Imagem representativa de fotomicrografia de imunofluorescência indireta (A). Os cortes foram marcados com DAPI (azul), anticorpo *anti*-CD68 (vermelho) e *anti*-MICA/MICB (verde) e utilizadas para contagem de células. A dupla positividade para os marcadores está indicada com a seta branca. A seta amarela indica célula positiva apenas para MICA/MICB. As análises estatísticas foram realizadas de acordo com teste de normalidade, e com isso, em B foi realizado teste t com correção de Welch. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. CS: controle saudável. 44

Figura 11. Expressão de NKG2D no tecido pulmonar. As imagens representativas de imunohistoquímica correspondem a marcação do tecido do pulmão com anticorpo *anti*-NKG2D, as células positivas para NKG2D estão indicadas com seta preta. Controle saudável (B e D); paciente (A e C). Magnificação: 10X (A e B); 40X (C e D). 45

Figura 12. Análise da expressão de NKG2D no tecido pulmonar. Fotomicrografia representativa da expressão de NKG2D. Imagem representativa de fotomicrografia de imunofluorescência indireta (A). Os cortes foram marcados com DAPI (azul), anticorpo *anti*-CD8 (vermelho) e anticorpo *anti*-NKG2D (verde). Célula CD8+ e NKG2D+ está indicada com a seta branca. As análises estatísticas foram realizadas de acordo com teste de normalidade, em B o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi realizado e em C foi empregado o teste t com correção de Welch. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. CS: controle saudável..... 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características de pacientes COVID-19.....	35
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCL13	Ligante 13 da quimiocina (<i>sigla do inglês, C-C Motif Chemokine Ligand 13</i>)
CCL7	Ligante 7 da quimiocina (<i>sigla do inglês, C-C Motif Chemokine Ligand 7</i>)
CCL8	Ligante 8 da quimiocina (<i>sigla do inglês, C-C Motif Chemokine Ligand 8</i>)
CMV	Citomegalovírus
COVID 19	Doença do Coronavirus 2019 (do inglês <i>Coronavirus Disease 2019</i>)
CoVs	coronaviroses
CXCL 1	Ligante de quimiocina 1 (<i>sigla do inglês, C-X-C Motif Chemokine Ligand 1</i>)
CXCL 6	Ligante de quimiocina 6 (<i>sigla do inglês, C-X-C Motif Chemokine Ligand 6</i>)
CXCL-14	Ligante de quimiocina 14 (<i>sigla do inglês, C-X-C Motif Chemokine Ligand 14</i>)
CXCL2	Ligante de quimiocina 2 (<i>sigla do inglês, C-X-C Motif Chemokine Ligand 2</i>)
DAD	Dano alveolar difuso
DAMPs	Padrões moleculares associados a dano (do inglês <i>Damage-associated molecular pattern</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ECA2	Enzima conversora da angiotensina 2
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GM CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (<i>sigla do inglês, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
H&E	Hematoxila e eosina
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HLA-E	Sistema de histocompatibilidade humano (<i>sigla do inglês, human leukocyte antigens</i>)
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (do inglês <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)
IFN	Interferon
IGFBPs	Proteína de ligação de crescimento semelhante a insulina (<i>sigla do inglês, insulin-like growth factor-binding protein</i>)

IL - 2	Interleucina 2
IL- 18	Interleucina 18
IL- 1 β	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina 10
IL-15	Interleucina 15
IL-32	Interleucina 13
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IP-10	Proteína 10 induzida por interferon gamma (<i>sigla do inglês, interferon gamma-induced protein 10</i>)
ISGs	Genes estimulados por interferon (do inglês <i>interferon stimulated gene</i>)
MAS	Síndrome de ativação de macrófagos (<i>do inglês, Macrophage activation syndrome</i>)
mDC	Células dendríticas mielóides (do inglês <i>Myeloid dendritic cells</i>)
MERA	Memória efetora que reexpressa CD45RA
MERS-CoV	Síndrome respiratória do Oriente Médio (do inglês <i>Middle East Respiratory Syndrome</i>)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (<i>major histocompatibility complex</i>)
MIP1	Proteína inflamatória de macrófago 1 (<i>sigla do inglês, Macrophage inflammatory protein 1</i>)
mm	Milímetro
MMP10	Matriz metaloproteinase 10
NETs	Armadilhas extracelulares dos neutrófilos (do inglês <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>)
NK	Natural Killer
NKG2D	Grupo 2D natural killer (<i>sigla do inglês, natural killer group 2D</i>)
NKR	Receptor de célula natural killer (<i>sigla do inglês, Natural killer receptor</i>)
NLRP3	Domínio pirina da família NLR contendo 3 (<i>sigla do inglês, NLR family pyrin domain containing 3</i>)
p53	Proteína 53 do tumor (<i>sigla do inglês, tumor protein 53</i>)

PAMPs	Reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (do inglês <i>Pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBS	Tampão fosfato salino (<i>sigla do inglês, phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Proteína C reativa
pDC	Células dendríticas plasmocitóides (do inglês <i>Plasmacytoid dendritic cells</i>)
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrão (do inglês <i>Pattern recognition receptor</i>)
RBD	Domínio de Ligação ao Receptor da proteína Spike (do inglês <i>Receptor-Binding Domain</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
SARS-CoV	síndrome respiratória aguda grave coronavírus (do inglês <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>)
SARS-CoV-2	síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (do inglês <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>)
SASP	fenótipo secretor associado à senescência (do inglês <i>senescence associated secretory phenotyp</i>)
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
TBS	Tampão salino de tris (<i>sigla do inglês, tris buffered saline</i>)
TCR	Receptor de ativação de células T (do inglês <i>T-cell receptor</i>)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa (<i>sigla do inglês, Tumor necrosis factor alpha</i>)
ULBP	Proteína que se liga a UL16 1 (<i>sigla do inglês UL16 binding protein 1</i>)
VEGF	Fator de crescimento endotelial (<i>sigla do inglês, vascular endothelial growth factor</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	ASPECTOS GERAIS DA COVID-19	17
1.2	EPIDEMIOLOGIA.....	18
1.3	HISTOPATOLOGIA PULMONAR E COVID-19.....	19
1.4	IMUNOPATOLOGIA NA COVID-19	20
1.4.1	Resposta imune na COVID-19.....	20
1.4.2	Imunosenescência	25
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	OBJETIVO GERAL	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	MÉTODOS	30
3.1	ASPECTOS ÉTICOS E AMOSTRAS	30
3.2	IMUNOHISTOQUÍMICA.....	30
3.3	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	31
3.4	AQUISIÇÃO E ANÁLISE DE IMAGENS.....	31
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4	RESULTADOS.....	33
4.1	PERFIL CLÍNICO E DEMOGRÁFICO DOS PACIENTES	33
4.2	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA E IMUNOFLUORESCÊNCIA	35
4.3	EXPRESSÃO DE P16 EM MACRÓFAGOS ALVEOLARES E CÉLULAS CD8 ⁺ NA LESÃO PULMONAR.....	38
4.4	EXPRESSÃO DO RECEPTOR NKG2D E SEU LIGANTE (MICA/MICB) EM CÉLULAS EPITELIAIS E MACRÓFAGOS DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO	41
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÕES.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52
	ANEXO.....	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA COVID-19

A doença do coronavírus 2019 (COVID-19, sigla do inglês) é uma enfermidade causada por uma infecção viral e tem como característica geral a presença de sintomas respiratórios. Grande parte dos infectados permanecem assintomáticos ou apresentam sintomas leves, que frequentemente incluem, febre, tosse, dores de cabeça, perda momentânea dos sentidos de olfato e paladar, dores musculares e dores de garganta (SZABO *et al.*, 2020).

A transmissão da doença ocorre através da infecção por vírus pertencente ao grupo das coronavírus (CoVs) (HASÖKSÜZ; KILIÇ; SARAÇ, 2020). Por apresentar identidade de 79.6% com o vírus SARS-CoV (sigla do inglês para, *severe acute respiratory syndrome coronavirus*) (ZHOU *et al.*, 2020), o vírus causador da COVID-19, foi nomeado como síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (SARS-CoV-2, sigla do inglês) pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, sigla do inglês) (WHO, 2020).

Assim como os demais vírus da família *Coronaviridae*, o SARS-CoV-2 apresenta nucleocapsídeo, envelope e RNA fita simples de senso positivo. Estruturalmente, possui 4 proteínas principais, membrana (M), envelope (E), *spike* (S) e nucleocapsídeo (N) (WANG *et al.*, 2020b). A proteína S, formada pelas duas subunidades S1 e S2, possui papel fundamental na entrada do vírus na célula, o domínio S1 apresenta o sítio de ligação RBD (do inglês, *receptor binding domain*) que interage com o receptor da célula hospedeira (JACKSON *et al.*, 2022; YAO *et al.*, 2020). Esse processo de infecção, ocorre por meio da ligação com a enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2), presente em diversos tipos celulares, ou de maneira ECA2 independente, através do receptor de integrina $\alpha 5 \beta 1$ (LIU *et al.*, 2022).

Os pacientes infectados com o SARS-CoV-2 podem manifestar diferentes quadros clínicos da doença, sendo que, os índices de mortalidade aumentam com a idade e a presença de comorbidades, como diabetes, hipertensão, doenças renais, cardíacas e

pulmonares (LI *et al.*, 2021). Com o agravamento da doença, os pacientes tendem a apresentar manifestações sistêmicas, acarretando principalmente em complicações vasculares, cardíacas, pulmonares, neurológicas, hepáticas e renais (LIBBY; LÜSCHER, 2020). A progressão desses pacientes para quadro grave, é caracterizada pela presença de hipóxia, dispneia, pneumonia, falha respiratória, com presença da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e falência múltipla dos órgãos (RAHMAN *et al.*, 2021).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

A COVID-19 foi classificada como uma pandemia no dia 11 de março de 2020, apesar do primeiro caso ter sido confirmado na China, rapidamente ela se espalhou pelo mundo (ZHOU *et al.*, 2020). Desde o início da doença, 528.816.317 casos e mais de 6 milhões de mortes foram confirmadas globalmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Com exceção de alguns países que adotaram medidas restritivas rigorosas para conter as taxas de contaminação, a alta transmissibilidade do vírus propiciou a transmissão comunitária em vários locais, dificultando a ação das autoridades de saúde na contenção dos casos (KOELLE *et al.*, 2022).

O Brasil acumula 31.060.017 casos e 666.971 óbitos, segundo os dados das Secretarias Estaduais de Saúde, somente os estados Sul, Nordeste e Sudeste somados, representam mais de 25 mil casos. Dentre esse total, 12.227.318 casos correspondem apenas ao estado do Sudeste e o Espírito Santo apresenta 1.055.879 casos e 14.417 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

A mobilização global para que o número de óbitos diminuísse resultou no desenvolvimento de vacinas e na aprovação de seu uso emergencial. Contudo, apesar dos esforços da Organização Mundial da Saúde na divulgação da importância da vacina, muitos países ainda não atingiram a cobertura vacinal necessária, posto que, quase um bilhão de pessoas permanecem não vacinadas (OMS, 2022).

Dessa forma, as autoridades locais possuem papel fundamental na divulgação de campanhas de vacinação. O Brasil, por sua vez, possui 83,13% da sua população vacinada com a primeira dose, entretanto, o número de doses de reforço aplicadas está em queda, chegando a 43,58% da população apenas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Assim, com a baixa adesão às doses de reforço, a COVID-19 continua sendo uma enfermidade potencialmente alarmante.

1.3 HISTOPATOLOGIA PULMONAR E COVID-19

Os pacientes que desenvolvem sintomas mais graves da COVID-19 frequentemente apresentam quadros de lesão pulmonar inflamatória aguda caracterizada pela presença da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (POLIDORO *et al.*, 2020). De acordo com os critérios estabelecidos pela Sociedade Europeia de Cuidados Intensivos, o diagnóstico de SDRA é dado pela presença de início agudo de sintomas respiratórios, infiltrado bilateral em exame de imagem torácica e hipoxemia grave (BATAH; FABRO, 2021; VIANA, 2015).

As complicações respiratórias dos pacientes com quadro clínico de SDRA geram lesões pulmonares que histologicamente são chamadas de dano alveolar difuso (DAD). Por apresentarem um padrão de lesão, ele é classificado em três estágios patológicos: exsudativo, proliferativo e fibrótico. Apesar de refletirem a evolução da doença, salienta-se que elas não ocorrem necessariamente de forma sequencial já que podem coexistir nos pacientes (BÖSMÜLLER *et al.*, 2021; LOVETRO GALHARDO; BADDINI MARTINEZ, 2003).

A primeira fase, também chamada fase exsudativa, ocorre aproximadamente nas primeiras semanas (TOMASHEFSKI, 2000). Os componentes da resposta imune inata são responsáveis por identificar o patógeno e amplificar a resposta a partir de secreção de citocinas pró-inflamatórias (WONG *et al.*, 2019). Tais eventos, promovem o colapso da barreira entre epitélio e endotélio, havendo formação de membrana hialina, gerada pela polimerização de fibrina e debris celulares, advindos do extravasamento do plasma dos capilares. Como consequência da resposta

inflamatória, é possível observar histologicamente a presença de ductos alveolares dilatados, congestionamento de capilares, edema intersticial, hemorragia e infiltrado de células inflamatórias no espaço intra-alveolar (BATAH; FABRO, 2021).

A fase proliferativa é o estágio secundário do DAD, nesse momento, existe a tentativa de conter os edemas e restabelecer o tecido necrosado. As células epiteliais, são capazes de promover um gradiente osmótico pela ação de proteínas de transporte, e por isso, possuem papel fundamental para a reabsorção do edema (LOVETRO GALHARDO; BADDINI MARTINEZ, 2003). Os fibroblastos por sua vez, através da deposição de colágeno e fibrina promovem a produção de tecido conjuntivo como processo de cicatrização, que culminam na formação de fibrose e destruição do parênquima pulmonar. Sendo assim, essa fase é marcada pela proliferação de pneumócitos, fibroblastos e miofibroblastos, presença de espaços intra-alveolares pequenos ou até mesmo ausentes, atipias nucleares de células epiteliais e fibrose intersticial (BATAH; FABRO, 2021; TOMASHEFSKI, 2000).

A terceira fase, chamada fibrótica, decorre de pacientes que apresentaram a doença prolongada. Nela, há descaracterização do tecido pulmonar, que passa a ser composto por matriz extracelular de tecido conjuntivo com grande presença de fibras colágenas e fibrose difusa (LOVETRO GALHARDO; BADDINI MARTINEZ, 2003; TOMASHEFSKI, 2000).

1.4 IMUNOPATOLOGIA NA COVID-19

1.4.1 Resposta imune na COVID-19

A resposta imune cumpre papel fundamental na defesa do organismo contra patógenos. Em infecções virais, as partículas inaladas ou em contato com a mucosa, encontram o epitélio como barreira. Ao serem infectadas, as células do epitélio respiratório induzem a produção de muco e ativação do sistema imune (SUBBARAO; MAHANTY, 2020).

Macrófagos alveolares e células dendríticas presentes no pulmão são os primeiros componentes da resposta imune inata antiviral a serem ativados. A detecção do vírus, ou de danos causados por ele, é realizada por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs, sigla do inglês) que desencadeiam a liberação de citocinas e quimiocinas, culminando na ativação da resposta adaptativa (BOTTINO; PONCE, 2022).

A resposta adaptativa, composta pela imunidade celular e humoral, é assim, capaz de eliminar o vírus mais facilmente. Dessa forma, montar uma resposta imune complexa, envolvendo as diversas populações celulares do sistema imune é primordial para o sucesso da infecção (KOHLMEIER; WOODLAND, 2009).

De modo oposto, os desbalanços na resposta imune como uma ativação prolongada ou exagerada dos mecanismos de defesa podem resultar no desenvolvimento de patologias imuno-mediadas com extensivo dano tecidual. Em suporte a isso, evidências sugerem que a presença de lesão pulmonar associada a SDRA é consequência da resposta pró-inflamatória, mediada pela atividade de células do sistema imune inato e adaptativo (WONG *et al.*, 2019).

A presença de SARS-CoV-2 nas células epiteliais do trato respiratório geram efeitos citopáticos como a destruição de junções intercelulares, formação de sincício e principalmente, apoptose de células (ZHU *et al.*, 2020). A presença de células apoptóticas, ativa a resposta de eferocitose por macrófagos, que por meio de receptores especializados, reconhecem a presença de fosfatidilserina na membrana de células infectadas (SALINA, 2020). Contudo, a fagocitose de células infectadas por SARS-CoV-2 viáveis desregulam os mecanismos de eferocitose continuada (SALINA *et al.*, 2022). As falhas desse processo, são capazes de desencadear a presença de necrose secundária, ativando o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, sigla do inglês) e padrões de dano associados a patógenos (DAMPs, sigla do inglês) através de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs, sigla do inglês) por fagócitos da imunidade inata (MORIOKA; MMAUER, 2016).

A sinalização via PRRs é um importante mecanismo de ativação da resposta inicial, medida pela imunidade inata. Sua ativação promove a liberação de IFNs do tipo I, importantes para gerar uma forte resposta antiviral (IVASHKIV; DONLIN, 2008). Na

COVID-19, a expressão de IFN e de genes estimulados por interferon (ISGs, sigla do inglês) demonstram um desbalanço, muitas vezes marcado pela ausência, e por outras, pela forte expressão de IFN tipo I em pacientes severos (AKAMATSU *et al.*, 2021; BLANCO-MELO *et al.*, 2020). Estudo em modelo animal da infecção pelo vírus SARS-CoV demonstra que a regulação da resposta mediada por IFN I resulta em diferentes desfechos clínicos da doença. A alta presença de carga viral unida a uma resposta tardia de IFN I tem como consequência uma pneumonia possivelmente letal (CHANNAPPANAVAR; PERLMAN, 2017). Dessa forma, é possível que a desregulação da expressão de IFN na COVID-19, afete igualmente na progressão da doença.

O aumento da presença de DAMPs e PAMPs, gerado pela falha da resposta antiviral ou pela presença de necrose no tecido pode induzir a formação de inflamassomas. Os inflamassomas são complexos multiprotéicos, presentes no citoplasma de células, capazes de desencadear resposta pró-inflamatória com liberação de IL-1 β e IL-18 (VORA; LIEBERMAN; WU, 2021). Análises de autópsias de pulmão evidenciaram a presença de monócitos infectados por SARS-CoV-2 expressando NLRP3, uma importante proteína na formação de inflamassomas (RODRIGUES *et al.*, 2020). A atividade de inflamassomas em macrófagos e monócitos, induz a formação de um processo de morte celular programada denominado piroptose. A morte celular, busca evitar a multiplicação do vírus, porém, gera resposta altamente inflamatória, podendo contribuir para o desbalanço da resposta imune (JUNQUEIRA *et al.*, 2022).

A ação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, recruta a presença de mais células do sistema imune ao sítio da lesão. Pacientes com quadro grave da COVID-19 apresentam grande frequência de macrófagos, monócitos e neutrófilos ativados no pulmão (HE *et al.*, 2020; MELMS *et al.*, 2021). A presença de macrófagos está associada a liberação de citocinas IL-6 e TNF- α , entretanto, macrófagos alveolares infectados demonstram grande liberação de IL-10, indicando um possível distúrbio na resposta (WANG *et al.*, 2020a). Já neutrófilos, secretam armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs, sigla do inglês) induzidos pela presença de SARS-CoV-2, promovendo o aumento do dano epitelial e contribuindo para o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) (LAFORGE *et al.*, 2020; VERAS *et al.*, 2020).

O perfil altamente pró-inflamatório adquirido pela COVID-19 foi caracterizado como uma síndrome de tempestade de citocinas. A síndrome, já descrita anteriormente, pode ser desencadeada por diversos fatores, que incluem, infecções virais, bacterianas e fúngicas, além de doenças não infecciosas como condições autoimunes e câncer (CHOUSTERMAN; SWIRSKI; WEBER, 2017). Nos pacientes com complicações da COVID-19, há a presença de altos níveis de diversas citocinas como, IL-6, IL-1 β , MIP1, TNF- α , VEGF e IP-10 (FAJGENBAUM; JUNE, 2020), e assim, como visto em outras coronaviroses, a tempestade de citocinas está correlacionada com o aumento da mortalidade (POLIDORO *et al.*, 2020).

Ainda que o perfil inflamatório na COVID-19 seja alto, alguns pacientes gravemente hospitalizados apresentam carga viral persistente (FAJNZYLBER *et al.*, 2020). Entretanto, a contribuição da carga viral para o desfecho da doença ainda permanece incerta uma vez que estudo de autópsias do pulmão demonstram a existência de perfis distintos, onde há casos fatais com alta ou baixa carga viral (NIENHOLD *et al.*, 2020).

Em muitas infecções a presença de células dendríticas é essencial para montar uma resposta robusta. Casos graves de infecção por SARS-CoV-2 demonstram uma diminuição na frequência de células dendríticas no sangue, assim como de células dendríticas mielóides (mDC) e plasmocitóides (pDC) no pulmão, (LIAO *et al.*, 2020; SÁNCHEZ-CERRILLO *et al.*, 2020). A redução na frequência de células pode estar relacionada ao processo de envelhecimento, ou mesmo, ser consequência direta da infecção pelo vírus. Dessa forma, os efeitos citopáticos causados pelo vírus resultariam na diminuição da contagem de células, ou em prejuízos no processo de maturação (BORGES; HOHMANN; BORGHİ, 2021).

A resposta adaptativa, composta pela imunidade celular e humoral, é fundamental para eliminação do vírus por produzir resposta antígeno específica. A resposta humoral contribui para a eliminação de patógenos em geral uma vez que, células B produzem anticorpos vírus específicos capazes de neutralizar partículas virais (NEWTON; CARDANI; BRACIALE, 2016). Apesar disso, alguns pacientes podem apresentar produção de auto anticorpos anti-IFN, prejudicando na resposta antiviral (MERAD *et al.*, 2022).

A ativação da imunidade celular, por sua vez, pode ser observada em casos leves da doença. Alguns pacientes apresentaram ativação de células T CD4 e CD8 mediada por proteínas estruturais e não estruturais de SARS-CoV-2 (PENG *et al.*, 2020). De maneira geral, infecções virais apresentam ativação da resposta de células CD4 do tipo Th1, com liberação de IFN- γ , TNF- α e IL-2. Em infecção por SARS-CoV, a resposta de Th1 foi relacionada com a melhora progressiva da doença (TAY *et al.*, 2020). Entretanto, pacientes que evoluem para casos graves de COVID-19, passam a apresentar desbalanços entre as respostas de Th1 e Th2 (MERAD *et al.*, 2022).

Alguns pacientes graves podem apresentar um estado hiperativado de células T (KANG *et al.*, 2020; MATHEW *et al.*, 2020), apesar de nesse contexto ser prejudicial, a ativação de citotoxicidade por células T, é fundamental para eliminação de células infectadas. Algumas células CD4 são capazes de adquirir características citotóxicas no contexto de algumas doenças (TAKEUCHI; SAITO, 2017), porém, a atividade de indução específica de morte é comumente mediada por células CD8. Pacientes com COVID-19 demonstram uma atividade citotóxica de CD8⁺ evidenciada pela presença de moléculas efetoras como granzima A, B e perforina (WESTMEIER *et al.*, 2020).

Apesar das especificidades de cada resposta, uma característica comum a linfócitos, e marcante na COVID-19 é a linfopenia. Grande parte dos pacientes com caso grave demonstram acentuada linfocitopenia na contagem total de células do sangue. Há estudos que sugerem uma diminuição generalizada de células T CD4, T CD8, B e NK, enquanto outros, evidenciam a diminuição específica de células T CD8 (CHEN; JOHN WHERRY, 2020; FRAGA-SILVA *et al.*, 2021; TAN *et al.*, 2020).

Assim como na contagem de células circulante, amostras de pulmão também evidenciam uma escassez na presença de linfócitos (CHEN; JOHN WHERRY, 2020; MENTER *et al.*, 2020), contrariando a expectativa de que as células ausentes na circulação estariam presentes nos sítios de lesão. Nesse caso, é possível que macrófagos e células dendríticas infectadas afetem o baço e linfonodos promovendo a diminuição de linfócitos, (XIANG *et al.*, 2021) ou que a presença de citocinas inflamatórias como IL-6, IL10 e TNF- α , geradas no processo de infecção, contribuam para redução na frequências dessas células (CHEN; JOHN WHERRY, 2020).

1.4.2 Imunosenescência

Células imunes senescentes se acumulam nos tecidos durante o envelhecimento, processos estimulatórios crônicos ou infecções (VAN DE BERG *et al.*, 2010). Estas células apresentam distúrbios fenotípicos e funcionais, resultando em uma incapacidade de controlar patógenos, ou mesmo se associando a processos de imunopatogênese, semelhantes aos observados na progressão da COVID-19. Assim, é possível que a imunosenescência esteja relacionada com a resposta imune disfuncional e severidade da COVID-19 (CUNHA *et al.*, 2020). O excesso de atividade proliferativa resultantes da ativação de linfócitos ou dos sucessivos ciclos celulares que ocorrem na vida de um indivíduo, culminam no encurtamento dos telômeros. De maneira semelhante, a atividade mitocondrial disfuncional é capaz danificar importantes macromoléculas celulares através da síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os danos recorrentes ao DNA, gerados em ambos os processos desencadeiam o interrompimento do ciclo celular, característica marcante de células senescentes (CAMPISI; D'ADDA DI FAGAGNA, 2007).

Assim como o acúmulo de EROs e dano ao DNA, a baixa de nutrientes e energia também desencadeiam mecanismos de ativação da via de senescência. A presença da proteína quinase ativada por mitógenos p38 cumpre importante papel nesse processo (LANNA *et al.*, 2014), desencadeando a ativação de demais proteínas como p21 e p53 (ITAHANA; CAMPISI; DIMRI, 2004). Entretanto, é a ativação da proteína p16 da família INK4 de inibidores de cinases dependentes de ciclinas que promove a manutenção do interrompimento do ciclo celular (figura 1) (BAPTISTA, 2013; FREUND; PATIL; CAMPISI, 2011). Por esse motivo, o p16 tem sido utilizado como um importante marcador de células senescentes (LIU *et al.*, 2019).

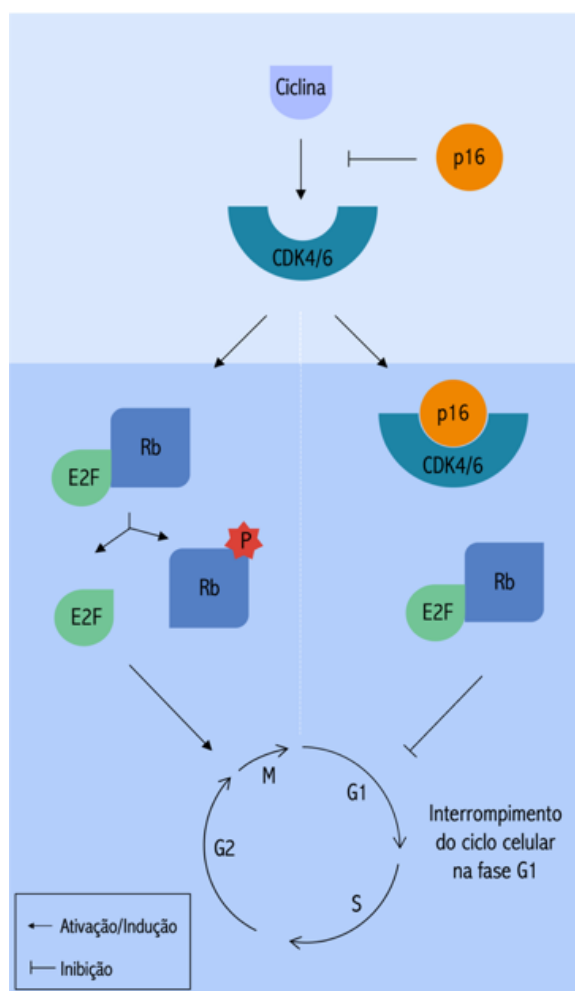


Figura 1. Via de inibição do ciclo celular mediada por p16.

Via de inibição do ciclo celular mediada por p16. A presença de p16 inibe a interação entre ciclina e CDK4/6 ao se ligar ao sítio de ativação da quinase. A ausência de fosforilação da proteína do retinoblastoma (Rb) faz com que o fator de transcrição E2F não esteja livre para regular a síntese de DNA.

A subpopulação de linfócitos T CD8 de memória efetora que reexpressa o receptor CD45RA (MERA) é considerada uma população senescente dentro do compartimento de células T. Além de reexpressar CD45RA essa população de células terminalmente diferenciadas perde a expressão de moléculas co-estimulatórias CD27 e CD28, bem como a capacidade de sinalização via receptor de ativação de célula T (TCR, sigla do inglês) (PEREIRA *et al.*, 2020). Também demonstram além da baixa capacidade proliferativa, um perfil secretor associado a senescência (SASP) e alta capacidade citotóxica (AKBAR; HENSON; LANNA, 2016; CALLENDER *et al.*, 2018). O SASP é composto por diversas citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, proteases e lipídeos bioativos com ação pró-inflamatória (LOPES-PACIENCIA *et al.*, 2019). Sua

composição difere de acordo com o tipo celular, porém, comumente expressam IL-6, IL-1, IL-8, CXCL-1/2, CCL-7/8, CXCL-6, GM-CSF, IGFBPs e entre outras biomoléculas (COPPÉ *et al.*, 2010). A presença de SASP desencadeia a produção de um processo inflamatório crônico, e inflamações prolongadas já demonstraram serem prejudiciais para resposta antígeno específica. Em infecções por SARS-CoV e MERS-CoV, a resposta inflamatória resultou na ativação subótima de células T impedindo a inativação viral culminando na piora do caso clínico (LIGOTTI *et al.*, 2021). Além disso, o acúmulo de células senescentes nos tecidos com grande caracterização de SASP têm demonstrado estar associado a doenças hiperplásicas e degenerativas como Alzheimer, aterosclerose e osteoporose (COPPÉ *et al.*, 2010; OVADYA; KRIZHANOVSKY, 2014).

Outro mecanismo de imunopatogênese importante, associado a células senescentes é o de morte inespecífica de células nos sítios de inflamação através da atividade citotóxica independente de antígeno (*bystander*) (COVRE *et al.*, 2020). A ativação de células por esse mecanismo ocorre através da presença de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-15 e IFN I (NELSON *et al.*, 2012). A ativação de células T CD8 antígeno independente é comum em infecções virais, como por exemplo, as causadas pelo vírus da hepatite A, B e influenza A, onde é possível observar uma extensa ativação *bystander* de células T (KIM; SHIN, 2019). Neste contexto, as células T podem adquirir a expressão de receptores estimulatórios e inibitórios de células *natural killers* (NK), como NKG2A, NKG2C e NKG2D (PEREIRA; AKBAR, 2016). Dentre eles, o receptor de superfície celular NKG2D é altamente expresso em condições de estresse. Seus ligantes de ativação em humanos compreendem as ULBPs, um grupo de proteínas de superfície celular, e a classe de receptores do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I, codificadas pelos genes MICA e MICB (SCHMIEDEL; MANDELBOIM, 2018). A presença de inflamação e proliferação é capaz de induzir a expressão de MICA e modular a atividade de NKG2D gerando resposta citotóxica (CHAUVEAU *et al.*, 2014; WENSVEEN; JELENČIĆ; POLIĆ, 2018).

A ativação de resposta de células T CD8 via NKG2D e TCR independente é um processo desencadeado pela presença de sestrin 2. A ativação dessa proteína, garante a estabilização de complexo formado por NKG2D e DAP12. A presença de

DAP12, por sua vez, contribui para a liberação de citocinas e ativação de resposta citotóxica, semelhante a medida por células NK, com ativação de granzima B, perforina e CD107a (PEREIRA *et al.*, 2020).

Durante a COVID-19, alguns dados já evidenciam que células infectadas por SARS-CoV-2 podem apresentar perfil de senescência com expressão de moléculas pró-inflamatórias (EVANGELOU *et al.*, 2022), que através de indução parácrina desencadeiam senescência em células não infectadas (TSUJI *et al.*, 2022). Sendo assim, a senescência poderia compor um importante mecanismo de imunopatogênese durante a doença, e células T CD8 senescentes naturalmente acumuladas em indivíduos idosos, ou resultantes do processo de infecção, poderiam amplificar a inflamação e o dano no pulmão por meio da atividade antígeno inespecífica mediada por receptores NK.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de lesão pulmonar inespecífica através da análise da expressão de moléculas associadas a senescência, no pulmão de pacientes que vieram a óbito pela infecção por SARS-CoV-2.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a expressão pulmonar de MICA/MICB nos pacientes, tanto em epitélio quanto em macrófagos lesionais;
- Avaliar a expressão de p16 em células T CD8 e macrófagos alveolares;
- Analisar a frequência de linfócitos T CD8 na lesão pulmonar;
- Analisar a expressão do receptor NKG2D em células CD8+ presentes no pulmão.

3 MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS E AMOSTRAS

Para o desenvolvimento desse estudo foram coletadas amostras de tecido pulmonar de 8 pacientes que estiveram internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC FMUSP). A coleta das autópsias seguiu o protocolo de autópsias minimamente invasiva guiada por ultrassom (DUARTE-NETO *et al.*, 2020). Os casos foram confirmados através da detecção da presença de SARS-CoV-2 por exame de PCR e os dados laboratoriais e clínicos obtidos da rotina hospitalar.

Após obtenção, os tecidos foram fixados em solução de 10% de formalina, embebidos em parafina e corados por eosina e hematoxilina. Todo processo de obtenção, preparação e coloração das lâminas foi realizado em colaboração com a Profª Dra. Marisa Dolhnikoff do Departamento de Patologia da Universidade de São Paulo (USP).

3.2 IMUNOHISTOQUÍMICA

As amostras fixadas e embebidas em parafina passaram por processo de desparafinização. Para facilitar a remoção da parafina as lâminas foram aclimatadas em estufa a 60 °C por 1 hora. Em seguida, passaram por banhos de xilol (I-III) por 10 minutos cada para dissolução completa da parafina. Após remoção da parafina, os cortes precisam ser hidratados e por isso, passaram por concentrações graduais de álcool (100%; 95%; 70%) até imersão completa em água destilada por 2 minutos. Em seguida, foi realizada etapa de recuperação antigênica em banho-maria a 90-100 °C por 20 minutos.

Em seguida, após esfriarem, as lâminas foram lavadas em tampão de TBS, submetidas a solução de bloqueio de proteína (*Protein Block* kit Novolink™ Polymer

Detection System - Leica Biosystem) e incubadas com anticorpo primário anti-NKG2D (diluição 1:600; #PA5-97904) ou anti-MICA/MICB (diluição 1:200; #ab203679) a 4 °C por 18 horas.

Após esse período, as lâminas foram lavadas novamente em TBS, incubadas com peróxido de hidrogênio para bloqueio de peroxidase endógena e tratadas subsequentemente com solução *Post Primary* e *Polymer* do kit Novolink™ Polymer Detection System.

Por fim, os cortes foram submetidos ao cromógeno 3,3'-Diaminobenzidina (DAB), contra corados com hematoxilina de Harris e lavados em água corrente por 10 minutos. A montagem das lâminas foi realizada com Entellan após desidratação das amostras com álcool e xilol.

3.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Após passarem por processo de desparafinização e recuperação antigênica, as amostras foram lavadas em solução, a depender do anticorpo, de PBS 1x ou PBST (PBS 1x contendo 0,05% Tween 20) e incubadas com solução de bloqueio (PBS 1x contendo 1% de albumina ou PBST contendo 2% de albumina) por 20 minutos, a fim de evitar interações inespecíficas.

Os anticorpos primários (anexo) foram diluídos em solução (PBS 1x ou PBST + 1% de albumina) e incubados em câmara úmida escura por 18 horas a 4 °C. Passado esse tempo, as lâminas foram lavadas com PBS 1x ou PBST por 5 minutos e submetidas a solução contendo anticorpos secundários, durante 1 hora. Em seguida, as amostras foram lavadas novamente e o núcleo foi corado com *Fluoroshield Mounting Medium with DAPI* (4',6-diamino-2-fenilindol) (ABCAM®).

3.4 AQUISIÇÃO E ANÁLISE DE IMAGENS

As imagens dos cortes foram obtidas com o uso do microscópio Nikon ECLIPSE 80i. Com auxílio do *software* Motic Image Plus 3.0, os valores de ganho e exposição foram padronizados para cada experimento, bem como a objetiva utilizada durante a captura das fotos. Para análise das marcações, as imagens foram compiladas no *software* ImageJ, Fiji 1.0, no qual o limiar para visualização dos marcadores foi otimizado e igualmente aplicado as imagens. Para garantir a confiança das análises, as marcações contaram com controles negativos e positivos.

A quantificação da expressão dos receptores foi feita por métodos diferentes. As amostras tiveram sua frequência estabelecida pela contagem de células positivas em relação ao total de células, e pelo número de células positivas por mm^2 . Além disso, para alguns marcadores, a expressão de células positivas foi mensurada pelo valor da intensidade média de fluorescência, obtida pela média de fluorescência de 5 células positivas por amostra subtraídas pelo valor da intensidade média de fluorescência do brilho de fundo das marcações.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises de estatística foram realizadas com uso do *software* GraphPad Prism 9.1.1. Os dados obtidos passaram pelo teste de Shapiro-Wilk para verificação da curva de distribuição. As amostras que não violaram os valores de normalidade, tiveram sua significância analisada pelo teste paramétrico de amostras não pareadas de Student (teste t) com correção de Welch. Para os casos em que os dados apresentaram distribuição não-paramétrica, os valores foram analisados por teste de Mann-Whitney. O intervalo de confiança foi de 95% e o nível de significância para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 PERFIL CLÍNICO E DEMOGRÁFICO DOS PACIENTES

Os pacientes arrolados nesse estudo corresponderam a 8 casos fatais de COVID-19, e as suas características clínico demográficas estão incluídas na tabela 1. Os pacientes foram divididos igualmente entre o sexo (4:4) e apresentaram uma média de idade de 59 ($\pm 16,88$) anos. Do início dos sintomas clínicos até o dia da internação, os pacientes apresentaram uma média de 14,5 ($\pm 16,20$) dias. O período que compreendeu a internação até o óbito foi de 1 a 46 dias.

Todos os indivíduos desenvolveram um quadro de síndrome respiratória aguda grave (SRAG)/ou pneumonia e necessitaram de ventilação mecânica apresentando em média 83,10% ($\pm 0,125$) de saturação de oxigênio. Dentre a presença de comorbidades, a mais prevalente foi hipertensão arterial sistêmica (HAS). Além disso, os resultados laboratoriais indicaram uma média de leucócitos de 14,472 mil/mm³. Os dados de neutrófilos, monócitos e linfócitos foram detalhados na tabela 1. O exame que mensurou os níveis séricos de proteína C reativa (PCR) indicou uma média de 148,88 ($\pm 88,29$) mg/L.

Histologicamente, as imagens dos cortes de pulmão corados com H&E demonstraram a presença majoritária de dano alveolar difuso (DAD) com intenso exsudato inflamatório nas regiões intra-alveolares e interseptais. Sendo frequente a presença de DAD exsudativo e proliferativo, evidenciados pela intensa produção de membrana hialina (figura 2 A e B) e proliferação de pneumócitos (figura 2 F). Além disso, também foi possível observar a presença de formação de fibrose em algumas amostras (figura 2 E). Outra característica observada foi a formação de coágulos e diversos pontos de hemorragia (figura 2 C e D).

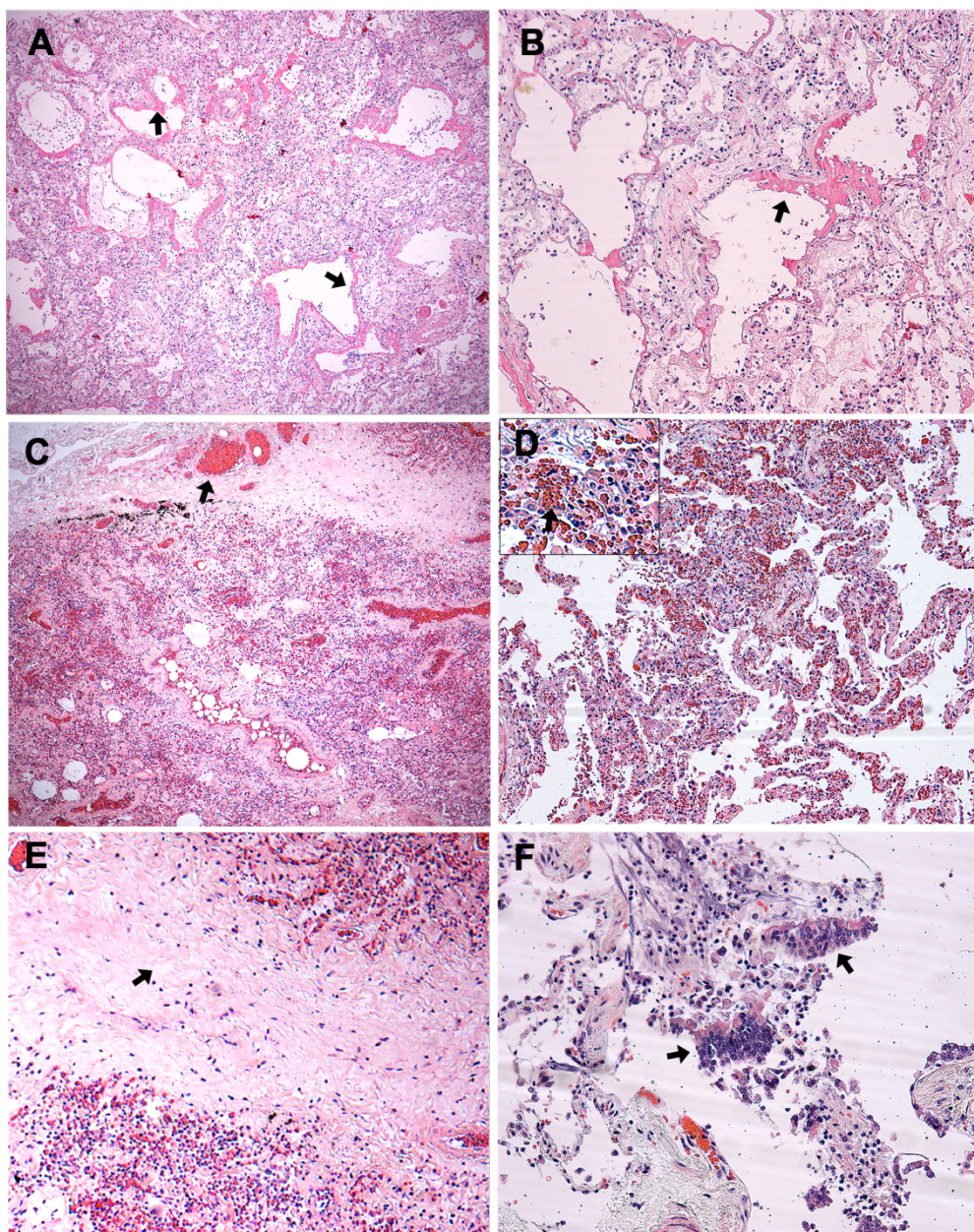


Figura 2. Presença de dano alveolar difuso dos pacientes de COVID-19. As imagens coradas com eosina e hematoxilina representam os indícios de dano alveolar difuso presentes no pulmão dos pacientes arrolados neste estudo ($n=8$). Indicado pela seta preta a presença de membrana hialina (A e B). As figuras C e D apontam para ocorrência de coágulos sanguíneos (C) e extravasamento de hemácias (D). Alguns pacientes demonstraram áreas de fibrose no pulmão apontado na figura pela seta preta (E) e em F a ocorrência de proliferação de pneumócitos. Magnificação: 40X (D, E e F); 20X (B); 10X(A e C).

Tabela 1. Características de pacientes COVID-19

Características	Valores	Faixa
Sexo		
Feminino	50%	NA
Masculino	50%	NA
Idade	59 ($\pm 16,88$)	42 - 89
Dias de internação até óbito	15,125 ($\pm 19,27$)	1 - 46
Início de sintomas até internação	14,571 ($\pm 16,20$)	7 - 51
Comorbidades		
HAS	62,50%	NA
DIABETES	37,50%	NA
OBESIDADE	25%	NA
Exames sanguíneos		
Leucócitos	14,472 mil/mm ³ ($\pm 14,396$)	4,05 - 49,30 mil/mm ³
Linfócitos	1,78 mil/mm ³ ($\pm 2,30$)	0,44 - 7,39 mil/mm ³
Monócitos	0,45 mil/mm ³ ($\pm 0,31$)	0,08 - 0,98 mil/mm ³
Neutrófilo	7,62 mil/mm ³ ($\pm 2,96$)	3,08 - 13,28 mil/mm ³
Gasometria		
Saturação de O ₂	83,10% ($\pm 0,125$)	68,40 - 99,40 %
Bioquímicos		
PCR	148,88 ($\pm 88,29$) mg/L	24,10 - 287,6 mg/L

Os valores estão representados de acordo com a frequência (%) ou média e desvio padrão ($\pm$). NA: Não se aplica.

4.2 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA E IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para realizar a marcação de proteínas utilizando anticorpos, os tecidos fixados precisaram passar por processo de recuperação antigênica. Esse passo é fundamental para obtenção de uma marcação evidente. Por isso, são utilizados diferentes processos de recuperação antigênica.

Considerando que nem todos os anticorpos utilizados aqui foram validados previamente para utilização em tecido fixados por formalina, iniciamos nosso trabalho com a otimização da recuperação antigênica. Para isso, os tampões de Tris EDTA, citrato e proteinase K foram testados para realização das marcações com anticorpos *anti*-MICA/MICB (ab203679 Abcam), *anti*-NKG2D (PA597904 Thermo Fisher) e *anti*-p16(CDKN2A/p16INK4a) (550834 BD Pharmingen).

Nos experimentos realizados para o anticorpo *anti*-MICA/MICB, a visualização das marcações foi mais evidente com uso da solução de tris EDTA pH 9. Ao passo que, com emprego das soluções de citrato e proteinase K, obtivemos uma marcação exagerada da matriz extracelular e intenso brilho de fundo. (figura 3).

De maneira oposta, a alteração das soluções de recuperação antigênica não demonstrou afetar a visualização do anticorpo *anti*-p16, visto que, tanto no tampão de citrato quanto no de tris EDTA as amostras exibiram bom resultado. (figura 4). Para a marcação do anticorpo *anti*-NKG2D, o experimento de imunohistoquímica demonstrou que a recuperação antigênica realizada com tris EDTA pH 9 resultou em melhora da visualização do receptor, enquanto a exposição do antígeno por citrato resultou em positividade excessiva e inespecífica (figura 5).

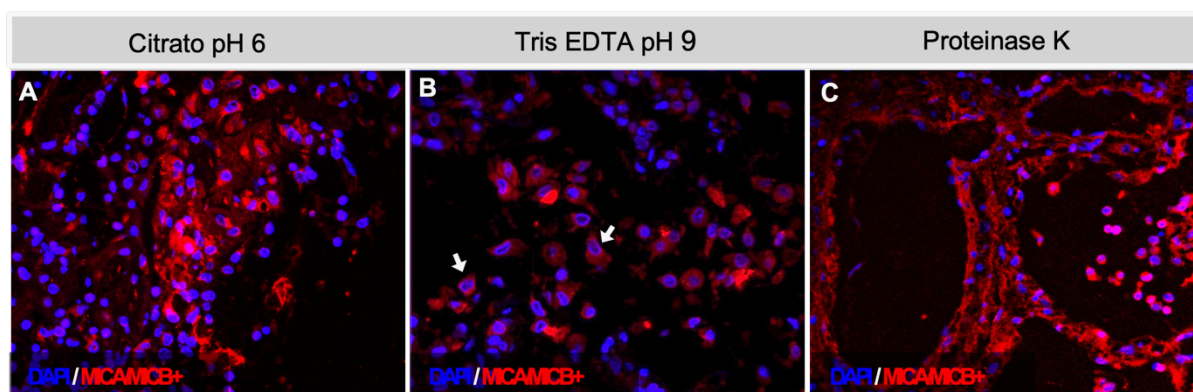


Figura 3. Padronização da marcação do anticorpo anti-MICA/MICB. Fotomicrografia representativa de imunofluorescência indireta. Os cortes foram marcados com DAPI (azul), anticorpo *anti*-MICA/MICB (vermelho). Recuperação antigênica realizada em solução de citrato pH 6 (A), tris EDTA pH 9 (B) e proteinase K (C). Marcação positiva para MICA/MICB demonstrada em B (seta branca). Magnificação: 40X (A e B) 20X (C).

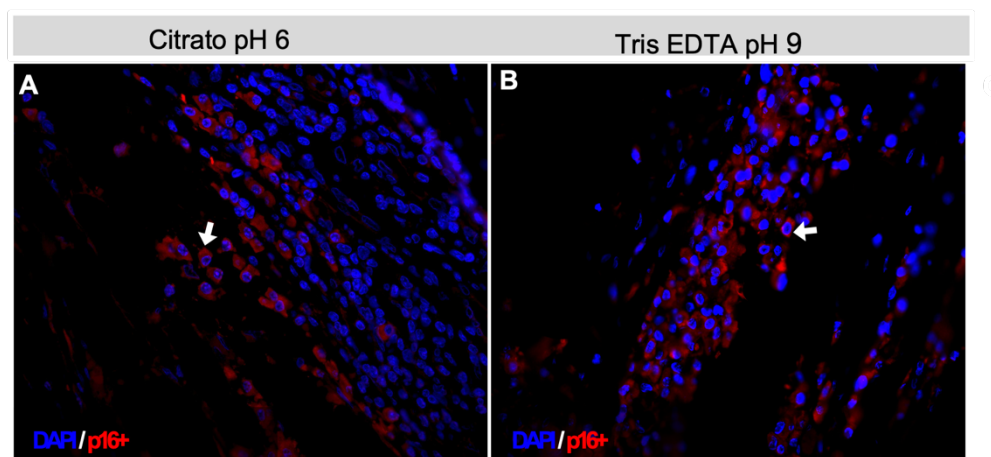


Figura 4. Padronização da marcação do anticorpo anti-p16(CDKN2A/p16INK4a). Fotomicrografia representativa de imunofluorescência indireta. Os cortes foram marcados com DAPI (azul), anticorpo *anti*-p16 (vermelho). Recuperação antigênica realizada em solução de citrato pH 6 (A) e tris EDTA pH 9 (B). Marcação positiva para p16 demonstrada por seta branca. Magnificação: 40X (A e B).

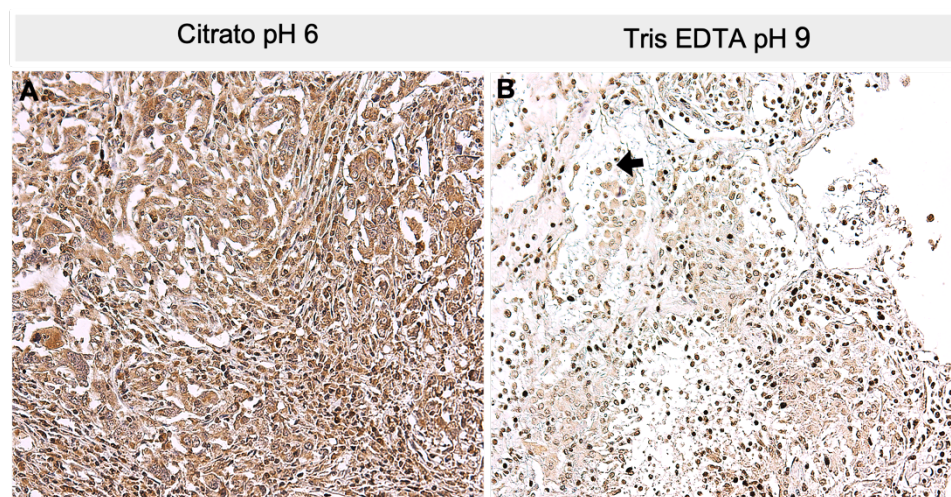


Figura 5. Padronização da marcação do anticorpo anti-NKG2D. Fotomicrografia representativa de imunohistoquímica indireta. Recuperação antigênica realizada em solução de citrato pH 6 (A) e tris EDTA pH 9 (B). Marcação positiva para NKG2D demonstrada por seta preta. Magnificação: 40X (A e B).

4.3 EXPRESSÃO DE p16 EM MACRÓFAGOS ALVEOLARES E CÉLULAS CD8⁺ NA LESÃO PULMONAR

A presença de p16, um importante marcador de senescência celular foi avaliada em células CD8 e macrófagos da lesão pulmonar por experimentos de imunofluorescência indireta. O resultado da análise de intensidade média de fluorescência de células, destaca que considerando a totalidade das células há uma expressão mais intensa de p16 em pacientes com COVID-19 do que em controles (figura 6).

Nossas análises evidenciam o acúmulo de células CD8⁺ na lesão pulmonar dos pacientes, evidenciada pelo aumento da frequência/mm² em relação ao controle (figura 7 B). No que se refere a expressão de p16 dentro do compartimento de células T CD8, nossos dados apontam uma maior frequência nos pacientes quando comparado com controles. Isso é evidenciado tanto pela frequência (dados não incluídos) quanto pelo número absoluto/mm² (figura 7 C).

De modo similar, nossos resultados demonstram um aumento de macrófagos na lesão dos pacientes, apontado pelo número de células CD68⁺/mm² (figura 7 D). Juntamente com um aumento na frequência, observamos que as análises de células CD68⁺ também ressaltam um aumento na expressão de p16. O que foi indicado pela frequência (dados não incluídos) e pela contagem de células duplo positivas por mm². (figura 7 E).

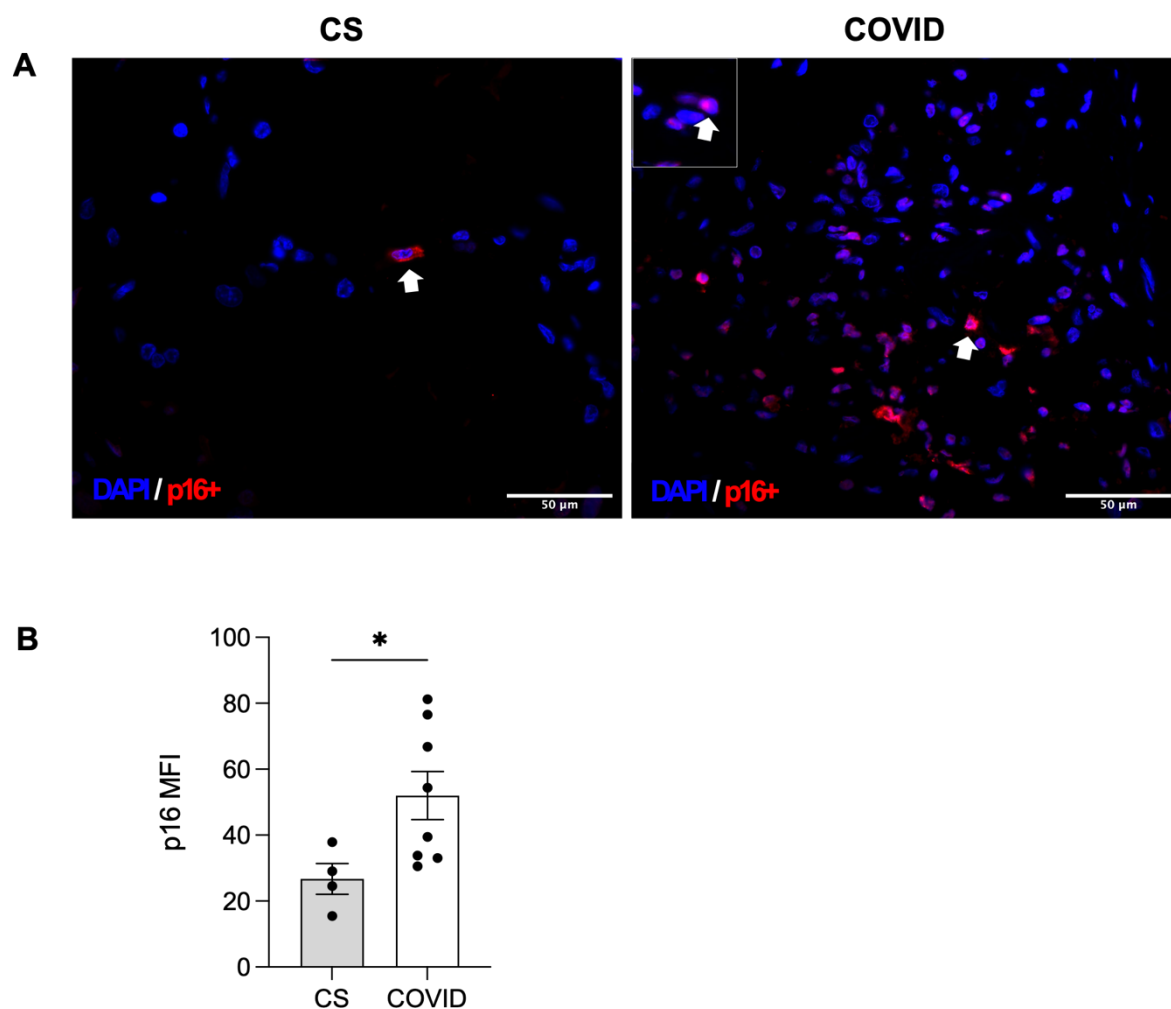


Figura 6. Fotomicrografia representativa da expressão de p16. Imagem representativa de fotomicrografia de imunofluorescência indireta (A). Os cortes foram marcados com DAPI (azul), anticorpo *anti*-p16 (vermelho). A seta indica célula com marcação positiva para p16. A análise estatística foi realizada de acordo com teste de normalidade, e assim em B o teste paramétrico *t* com correção de Welch foi aplicado. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. CS: controle saudável.

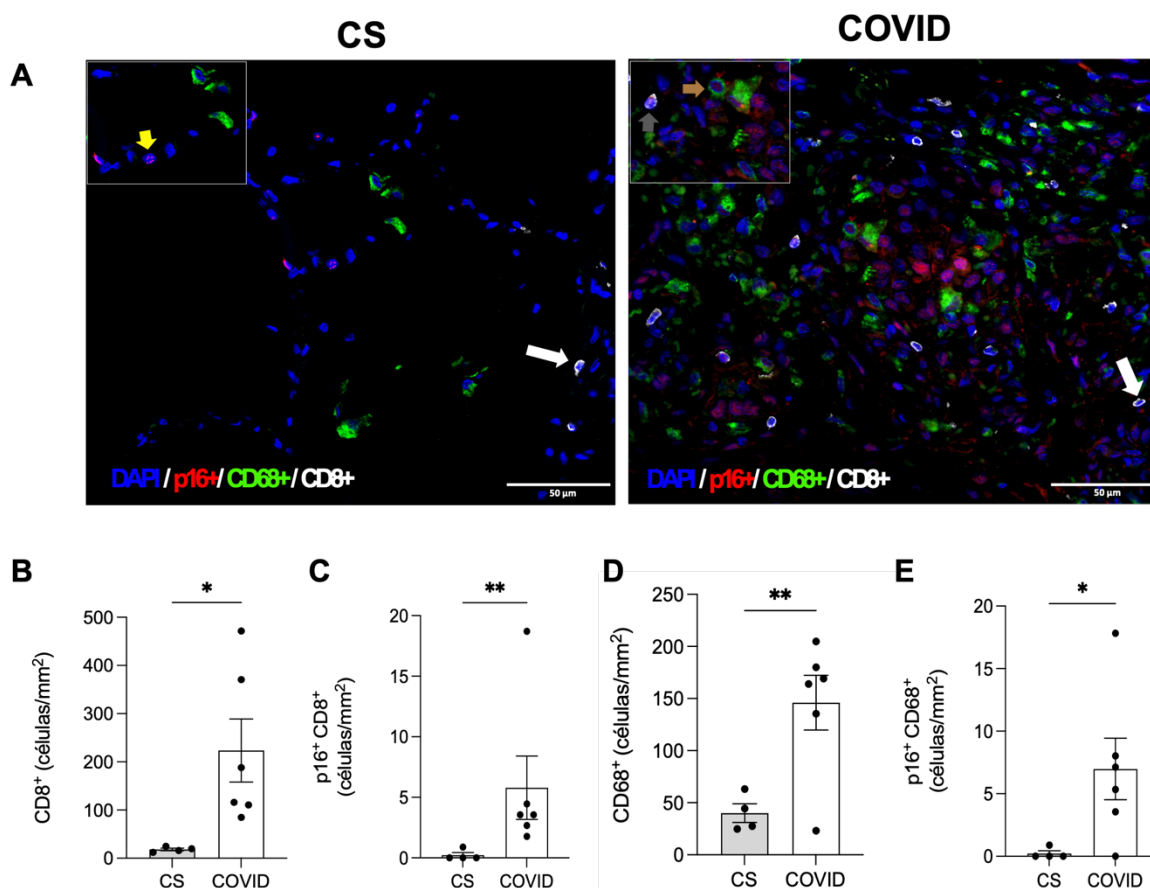


Figura 7. Expressão de p16 em células CD68+ e CD8+ na lesão pulmonar de pacientes com COVID-19. Imagem representativa de fotomicrografia de imunofluorescência indireta (A). Os cortes foram marcados com DAPI (azul), anticorpo *anti*-p16 (vermelho), *anti*-CD68 (verde) e *anti*-CD8 (branco). Célula CD8+ está indicada com a seta branca, a seta amarela indica célula p16+. A presença de dupla positividade está indicada com a seta marrom para p16+ e CD68+ e a seta cinza para p16+ e CD8+. As análises estatísticas foram realizadas de acordo com teste de normalidade, em B e C o teste paramétrico *t* com correção de Welch foi aplicado e em D e E foi performed o teste de Mann-Whitney. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; *****p* < 0.0001. CS: controle saudável.

4.4 EXPRESSÃO DO RECEPTOR NKG2D E SEU LIGANTE (MICA/MICB) EM CÉLULAS EPITELIAIS E MACRÓFAGOS DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO

Com o objetivo de avaliar o potencial de morte inespecífica mediada por células CD8, identificamos a expressão de NKG2D e seu ligante (MICA/B) em células pulmonares de pacientes com COVID-19.

Nossas análises iniciais, utilizando imunohistoquímica e imunofluorescência, demonstram uma acentuada expressão de MICA/MICB em células do infiltrado inflamatório alveolar de pacientes (figura 8). Semelhante ao resultado obtido, os experimentos de imunofluorescência confirmaram o aumento na expressão do ligante, demonstrado pela ampliação no número absoluto de células positivas para o marcador (MICA/MICB⁺) por mm² (figura 9 B). Interessantemente, células epiteliais, apontadas pela expressão de AE1/AE3, não apresentaram nenhuma diferença na expressão de MICA/MICB quando comparados pacientes e controles (figura 9 C e D). De maneira oposta, os resultados obtidos na análise da expressão de MICA/MICB por macrófagos alveolares, determinado pela expressão de CD68, indicaram que em comparação a controles saudáveis, os pacientes fatais apresentam um aumento significativo na expressão do receptor.(figura 10 B).

Complementarmente, análises por imunohistoquímica e imunofluorescência apontam uma robusta expressão de NKG2D no tecido pulmonar de pacientes, mas não de controles saudáveis (figura 11). Dada presença de NKG2D na lesão pulmonar, investigamos a expressão deste marcador em células CD8. Curiosamente, apesar do acúmulo de células CD8 no infiltrado pulmonar, nossas análises não demonstraram diferenças na expressão de NKG2D por essas células, quando comparados pacientes e controles.(figura 12 B e C).

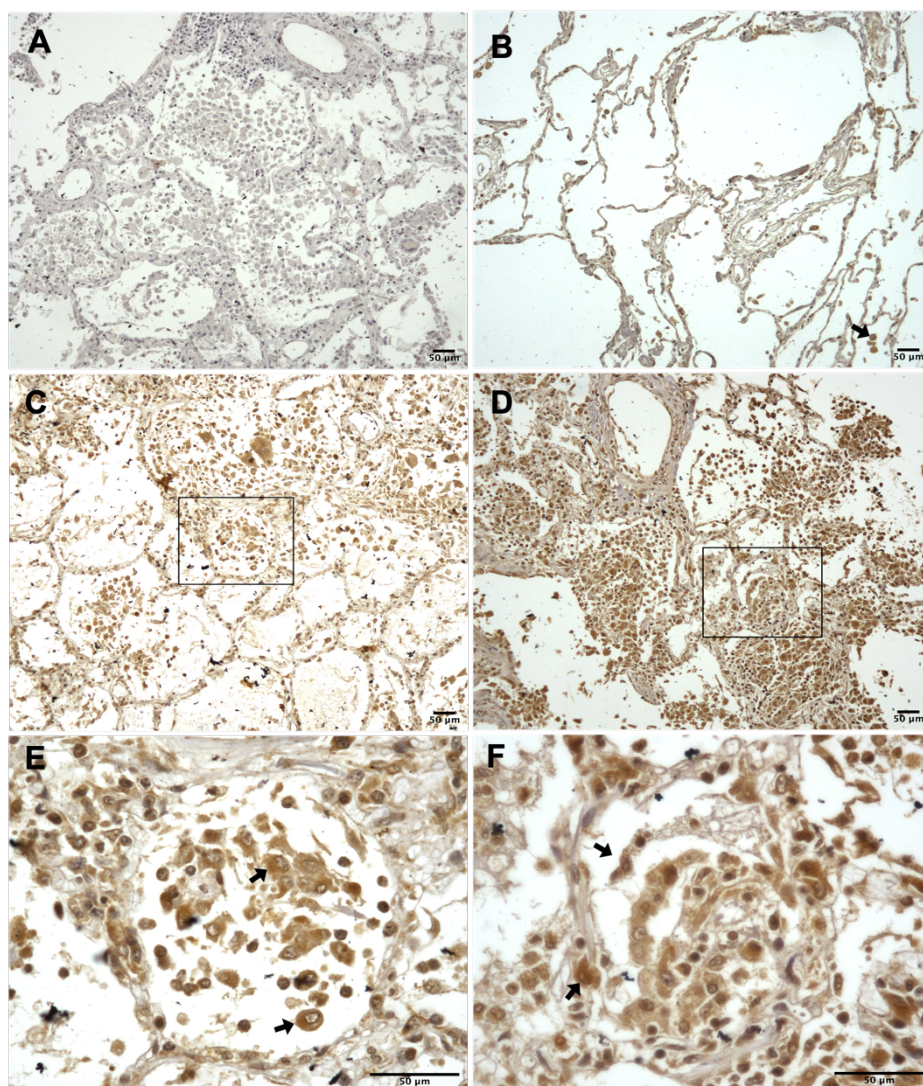


Figura 8. Expressão de MICA/MICB no tecido pulmonar. As imagens representativas de imunohistoquímica correspondem a marcação do tecido do pulmão com anticorpo *anti*-MICA/MICB, as células positivas para MICA/MICB estão indicadas com seta preta. Amostra controle negativa marcada na ausência de anticorpo primário (A); controle saudável (B); pacientes (C, D, E e F). Magnificação: 10X (A, B, C e D); 40X (E, F).

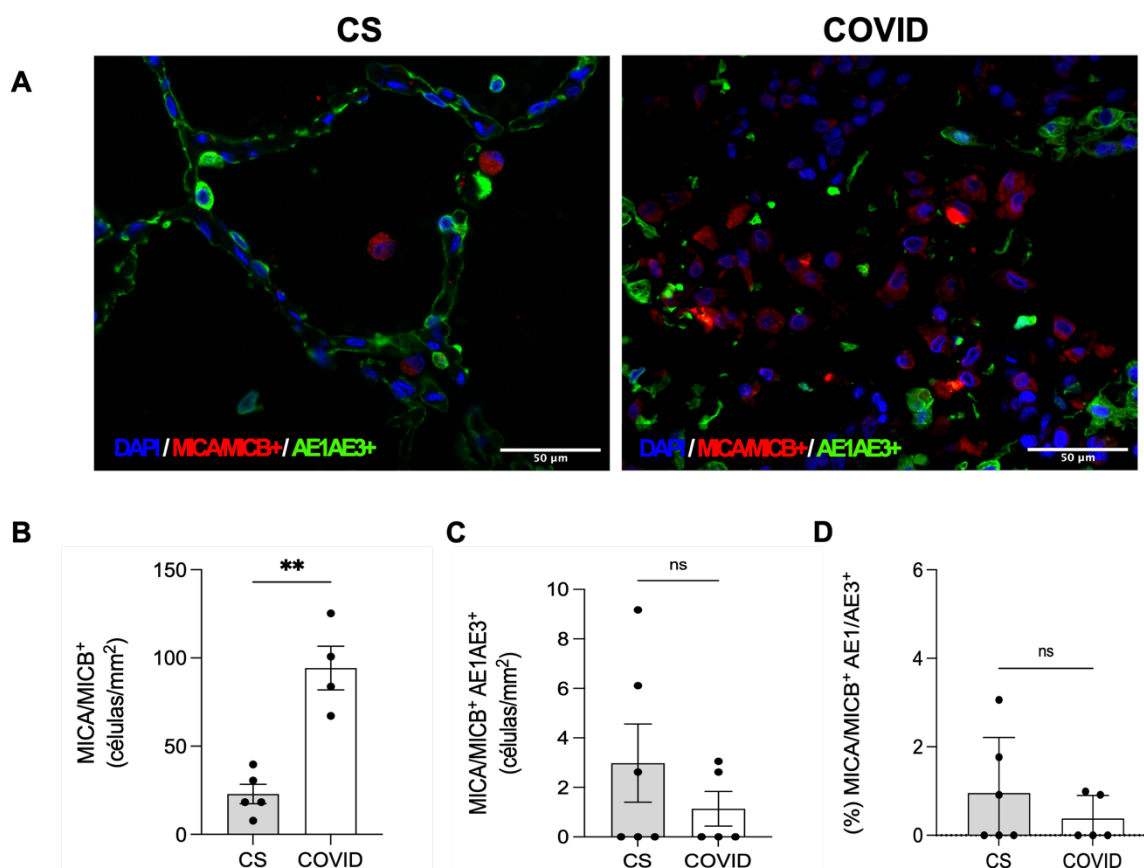


Figura 9. Expressão de MICA/MICB em células AE1AE3+ na lesão pulmonar de pacientes com COVID-19. Imagem representativa de fotomicrografia de imunofluorescência indireta (A). Os cortes foram marcados com DAPI (azul), anticorpo *anti*-MICA/MICB (vermelho) e *anti*-AE1AE3 (verde) e utilizadas para contagem de células. As análises estatísticas foram realizadas de acordo com teste de normalidade, em B o teste paramétrico *t* com correção de Welch foi aplicado e em C e D foi performed o teste de Mann-Whitney. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; *****p* < 0.0001. CS: controle saudável.

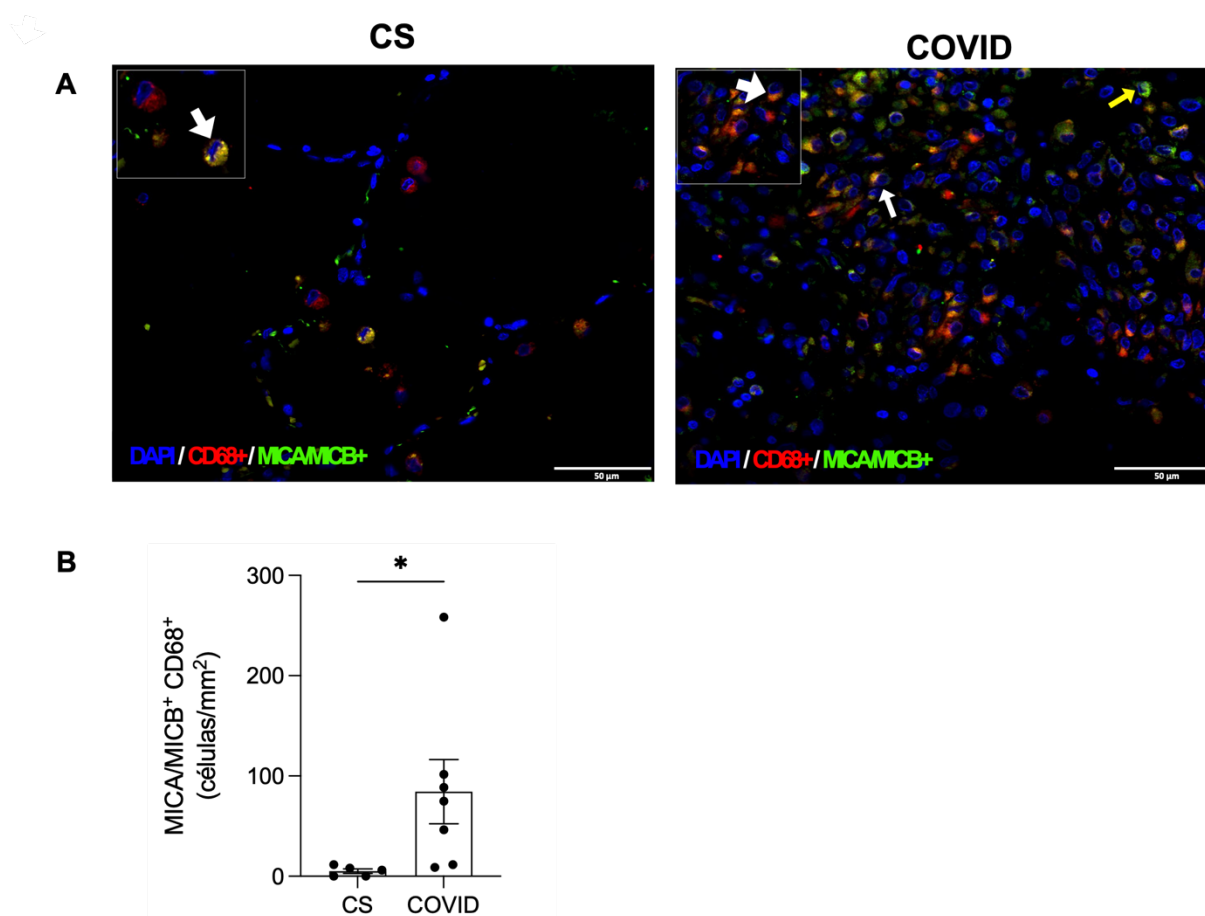


Figura 10. Expressão de MICA/MICB em macrófagos lesionais do pulmão. Imagem representativa de fotomicrografia de imunofluorescência indireta (A). Os cortes foram marcados com DAPI (azul), anticorpo *anti*-CD68 (vermelho) e *anti*-MICA/MICB (verde) e utilizadas para contagem de células. A dupla positividade para os marcadores está indicada com a seta branca. A seta amarela indica célula positiva apenas para MICA/MICB. As análises estatísticas foram realizadas de acordo com teste de normalidade, e com isso, em B foi realizado teste *t* com correção de Welch. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; *****p* < 0.0001. CS: controle saudável.

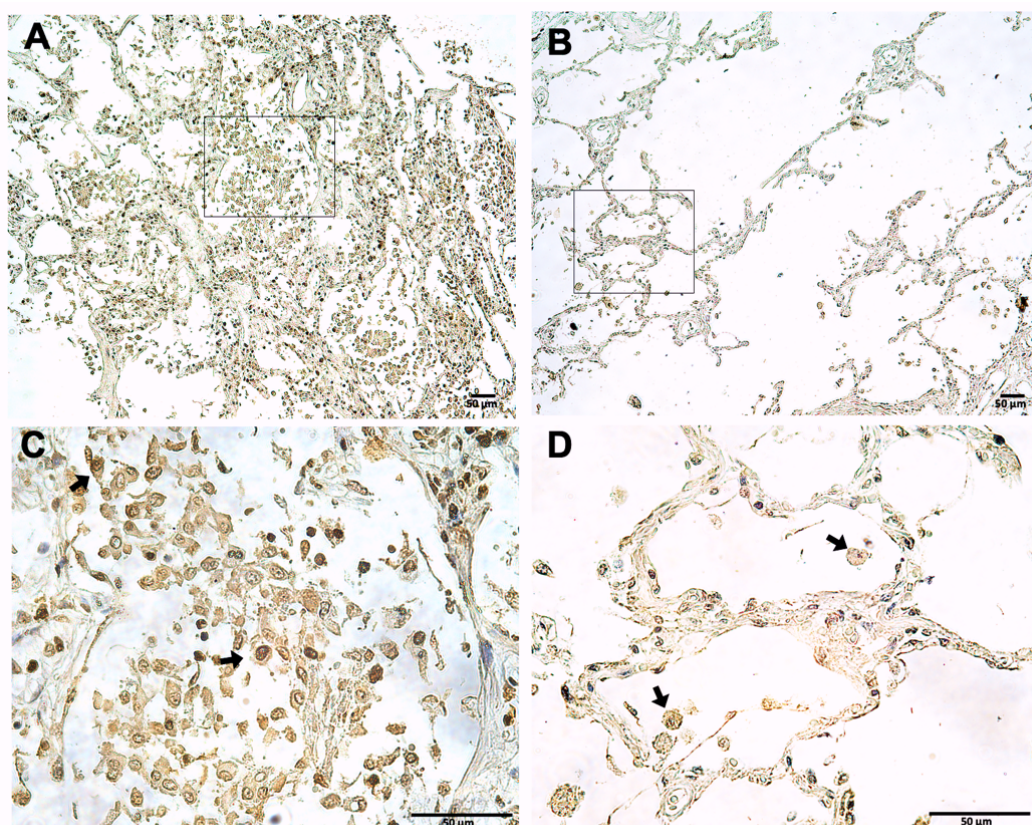


Figura 11. Expressão de NKG2D no tecido pulmonar. As imagens representativas de imunohistoquímica correspondem a marcação do tecido do pulmão com anticorpo *anti*-NKG2D, as células positivas para NKG2D estão indicadas com seta preta. Controle saudável (B e D); paciente (A e C). Magnificação: 10X (A e B); 40X (C e D).

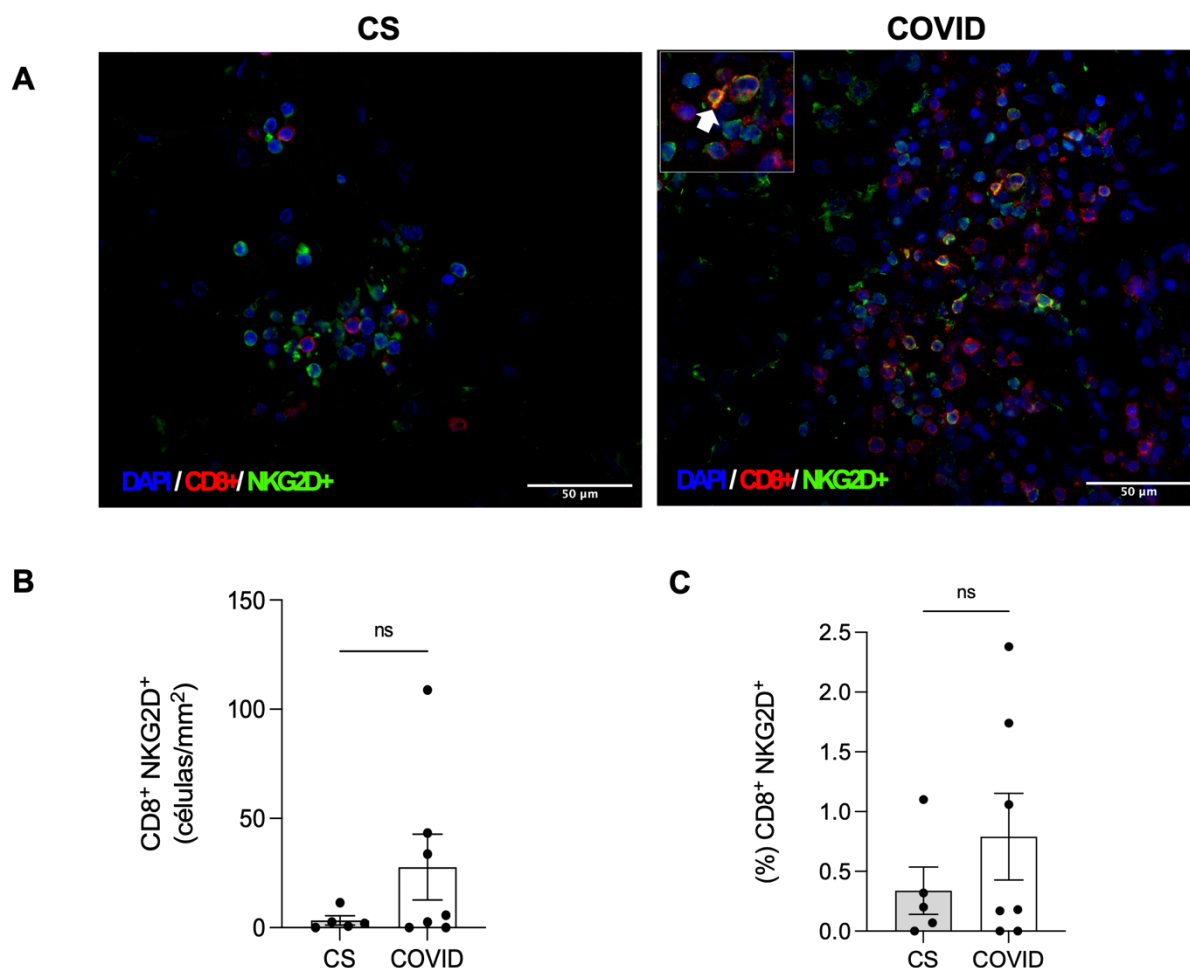


Figura 12. Análise da expressão de NKG2D no tecido pulmonar. Fotomicrografia representativa da expressão de NKG2D. Imagem representativa de fotomicrografia de imunofluorescência indireta (A). Os cortes foram marcados com DAPI (azul), anticorpo *anti*-CD8 (vermelho) e anticorpo *anti*-NKG2D (verde). Célula CD8⁺ e NKG2D⁺ está indicada com a seta branca. As análises estatísticas foram realizadas de acordo com teste de normalidade, em B o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi realizado e em C foi empregado o teste *t* com correção de Welch. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; *****p* < 0.0001. CS: controle saudável.

5 DISCUSSÃO

A resposta do sistema imune na infecção ao SARS-CoV-2 tem sido associada a patologia e gravidade da COVID-19. A falha na imunorregulação da resposta inflamatória resulta em uma síndrome hiperinflamatória que acarreta na progressão da doença ocasionando quadros severos de pneumonia (GUSTINE; JONES, 2021). Nesse contexto, propusemos avaliar a contribuição de células CD8⁺ através da atividade citotóxica por meio do receptor de ativação de células NK (NKG2D) na imunopatologia da lesão pulmonar.

Nossas análises histopatológicas no tecido pulmonar apontam para um acúmulo de intenso exsudato inflamatório no espaço intra-alveolar e interseptal nos pacientes de COVID-19. Ao analisarmos por imunohistoquímica e imunofluorescência as populações de células ali presentes, observamos alta incidência de macrófagos e células CD8 na lesão. Consoante com nossos resultados, estudos tem apontado para a presença de monócitos, macrófagos e células T inflamatórias na lesão pulmonar de pacientes severos (MELMS *et al.*, 2021).

A alta prevalência de macrófagos no pulmão pode estar relacionada a mecanismos de regulação positiva de sua ativação gerados pela presença de SARS-CoV-2. A ativação da resposta de macrófagos induzida pelo vírus promove a liberação de CCL7, CCL8 e CCL13, citocinas e quimiocinas inflamatórias, que induzem a secreção de IFN- γ por linfócitos e promovem o recrutamento celular (LI *et al.*, 2022). Ainda, esses mediadores inflamatórios tem o potencial de induzir um estado de hiperativação de fagócitos, levando a síndrome de ativação de macrófagos (MAS, sigla do inglês), o que estaria associado a tempestade de citocinas e a promoção dos danos teciduais (KOSYREVA *et al.*, 2021), conforme observado aqui. Adicionalmente, há evidências de que macrófagos acumulados no pulmão adotam um fenótipo pró fibrótico contribuindo para o dano pulmonar e manifestação de SDRA (WENDISCH *et al.*, 2021).

Estudos têm apontado evoluções distintas para a COVID-19 marcadas pela presença de 2 perfis imunopatológicos e mesmo desfecho fatal. Nesse contexto, a variação da carga viral e do tempo de duração da doença estão aliados a mudanças no perfil de células T no pulmão. Pacientes que apresentam tempos de internação mais longos

apresentam menor carga viral, extenso dano pulmonar e frequência aumentada de células T CD8 (MELMS *et al.*, 2021; NIENHOLD *et al.*, 2020; RUSSELL *et al.*, 2022). Adicionalmente, tem sido apontado que formas mais longas da doença apresentam perfis inflamatórios mais acentuados e maior citotoxicidade de células e que isso ocorre independente da incidência de ventilação mecânica (RUSSELL *et al.*, 2022). Em acordo com esses dados, demonstramos que os pacientes arrolados neste estudo, além de apresentarem características de dano alveolar difuso (DAD) apresentam um acúmulo de células T CD8 no pulmão. Este acúmulo sugere que os mesmos possam apresentar maiores danos teciduais direcionados pela atividade de célula T CD8.

Células senescentes acumulam durante o envelhecimento fisiológico e infecções. Do ponto de vista funcional, essas populações podem ser caracterizadas por uma baixa capacidade proliferativa e uma grande capacidade inflamatória. Diversos marcadores têm sido utilizados para indicar a presença de tal população em células da resposta imune inata e adaptativa. E entre as proteínas características do processo, destaca-se a expressão de p16, proteína fundamental para o bloqueio do ciclo celular (ITAHANA; CAMPISI; DIMRI, 2004). Em nossos dados, mostramos uma ampla expressão de p16 na lesão pulmonar, que foi associada a células T CD8⁺ e CD68⁺. A presença desta molécula em associação com outros marcadores poderia fornecer mais informações sobre a presença de senescência durante a COVID-19. Efetivamente, a aquisição de características de senescência estão associadas ao intenso ambiente inflamatório, direcionado por componentes secretados por células senescentes denominado SASP (perfil secretor associado a senescência). Neste sentido, componentes como IL-1 β , IL-6, IL-32, CXCL14 e MMP10 estão sendo amplamente associados a promoção de características de senescência de forma autócrina ou parácrina durante a COVID-19 (EVANGELOU *et al.*, 2022; TSUJI *et al.*, 2022).

Células T CD8 senescentes são caracterizadas por exibirem um perfil secretor inflamatório e aquisição de receptores de imunidade inata como os expressos em células NK (PEREIRA; AKBAR, 2016). A presença de citocinas pró-inflamatórias como IL-15, TNF- α , IFN- γ e IL-1 β , membros do SAPS, são capazes de induzir a expressão de NKG2D e de seus ligantes (MICA/B, ULBP1 e HLA-E) em populações celulares (ABBAS; AKBAR, 2021). Como resultado, demonstramos em nossos dados a

expressão de MICA/MICB por parte de macrófagos lesionais durante a COVID-19. Curiosamente, a expressão de MICA/B por células do epitélio pulmonar foi contrária ao esperado visto que, células do epitélio respiratório em geral expressam MICA e MICB em contexto de estresse (BORCHERS *et al.*, 2006). Infecções por CMV são capazes de modular negativamente a expressão de MICA na superfície celular como forma de escapar do reconhecimento e da atividade citotóxica de células do sistema imune (CHALUPNY *et al.*, 2006). Além disso, já foi demonstrado que a presença de hipóxia também pode modular a expressão de MICA, impedindo sua expressão em células tumorais (YAMADA *et al.*, 2012). Não há evidências de que algo parecido possa estar acontecendo na COVID-19 e para isso, novos estudos precisam ser feitos para elucidar os mecanismos de expressão desse receptor na doença.

Em nossa hipótese, levantamos a possibilidade de que parte do dano tecidual pulmonar pudesse ser ocasionado pela atividade citotóxica de células T, de forma antígeno inespecífica, através do receptor ativador NKG2D. Como mencionado anteriormente, citocinas inflamatórias, em especial IL-15, possuem capacidade de induzir a expressão de NKR como o NKG2D em células NK e células T, o que não observamos aqui. A maioria das amostras analisadas apresentaram níveis de expressão semelhantes aos do controle. A presença de formas solúveis de MICA e MICB são capazes de criar mecanismos de escape da atividade mediada por NKG2D. Suas formas solúveis promovem a regulação negativa de NKG2D ao se ligarem ao receptor, promovendo sua internalização por endocitose e posterior degradação (CHITADZE *et al.*, 2013). Experimentos *in vitro* já demonstraram que células endoteliais são capazes de modular a expressão de MICA na presença das citocinas TNF- α e IFN- γ . A presença dessas citocinas estimula a regulação dos mecanismos pós-transcricionais e a liberação de formas solúveis desse receptor (CHAUVEAU *et al.*, 2014). Para além de diminuir a presença do receptor em células NK e células T CD8, esse mecanismo de interação inviabiliza a agregação dos dímeros de NKG2D e a fosforilação de DAP12, ações necessárias para ativação da resposta citotóxica (LUO *et al.*, 2020). Dessa forma, além de diminuir a expressão de NKG2D a presença de MICA solúvel já demonstrou impedir a ativação de citotoxicidade.

Outra possibilidade, é que o dano possa ainda estar associado a atividade citotóxica antígeno inespecífica de células T CD8, porém, mediado por outros receptores ativadores como o NKG2D, amplamente expresso durante a senescência (ABBAS;

AKBAR, 2021). O NKG2C é um receptor comumente expresso na superfície de células NK e células T CD8 terminalmente diferenciadas. Semelhante aos demais NKRs presentes em células T senescentes, a expressão de NKG2C parece estar relacionada a presença de sestrin e inflamação. Além disso, a ativação desse receptor ocorre na ausência de TCR e sua função consiste na realização de resposta citotóxica e indução de lise celular (PEREIRA *et al.*, 2020). Diferente do receptor NKG2D, a atividade de ativação via NKG2C ocorre por meio da interação com receptor do sistema de histocompatibilidade humano HLA-E. Assim como o MICA/MICB, a expressão desse receptor ocorre mediante situações de estresse. Adicionalmente, experimentos *in vitro* demonstram que a infecção de células epiteliais pelo antígeno S1 da proteína *Spike* do vírus SARS-CoV-2, foi capaz de induzir um aumento significativo de HLA-E no tecido (BORTOLOTTI *et al.*, 2020). Juntas essas evidências sugerem que células T CD8 senescentes possam contribuir para o aumento do dano pulmonar por meio da atividade de demais NKRs.

Em conclusão, nossos dados apontam para um fenótipo potencialmente senescente de células lesionais pulmonares durante a COVID-19. A alta expressão de MICA/B na lesão pulmonar poderia estar associada a morte inespecífica de células via receptor NKG2D, expresso por outras populações celulares como célula NK por exemplo. O potencial imunopatológico de células T senescentes via NKRs precisa ser melhor elucidado e por isso, pretendemos futuramente ampliar o conhecimento a respeito da contribuição dessas células para lesão no pulmão de pacientes com COVID-19.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho demonstramos um acúmulo de células CD8⁺ e CD68⁺ no infiltrado pulmonar. Ambas populações apresentaram inclusive um aumento da expressão do marcador de células senescentes p16.

Além disso, observamos que os pacientes fatais de COVID-19 apresentam altos níveis de expressão pulmonar de MICA/MICB e que macrófagos, particularmente, apresentam maiores níveis de expressão desse receptor do que em pulmões saudáveis. Em contrapartida, vimos que as células do epitélio pulmonar não demonstram expressão elevada de MICA/B.

Por fim, demonstramos não haver um aumento de células CD8 expressando NKG2D na lesão pulmonar. O que nos leva a propor que novos estudos devem ser feitos para investigar a contribuição da atividade de NKRs expressos por células T CD8 senescentes na lesão pulmonar durante a COVID-19.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. A.; AKBAR, A. N. Induction of T Cell Senescence by Cytokine Induced Bystander Activation. **Frontiers in Aging**, v. 2, n. July, p. 1–10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fragi.2021.714239>
- AKAMATSU, M. A.; DE CASTRO, J. T.; TAKANO, C. Y.; HO, P. L. Off balance: Interferons in COVID-19 lung infections. **EBioMedicine**, v. 73, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103642>
- AKBAR, A. N.; HENSON, S. M.; LANNA, A. Senescence of T Lymphocytes: Implications for Enhancing Human Immunity. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 12, p. 866–876, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.09.002>
- BAPTISTA, A. Inibidores de Receptores Dependentes de Ciclina como Terapêutica Anti Tumoral. p. 32, 2013. Disponível em: [https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/32315/1/Monografia Ana Isabel Baptista.pdf](https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/32315/1/Monografia%20Ana%20Isabel%20Baptista.pdf)
- BATAH, S. S.; FABRO, A. T. Pulmonary pathology of ARDS in COVID-19: A pathological review for clinicians. **Respiratory Medicine**, v. 176, n. June 2020, p. 106239, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.106239>
- BLANCO-MELO, D. *et al.* Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. **Cell**, v. 181, n. 5, p. 1036–1045.e9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>
- BORCHERS, M. T.; HARRIS, N. L.; WESSELKAMPER, S. C.; VITUCCI, M.; COSMAN, D. NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 291, n. 2, p. 222–231, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00327.2005>
- BORGES, R. C.; HOHMANN, M. S.; BORGHI, S. M. Dendritic cells in COVID-19 immunopathogenesis: insights for a possible role in determining disease outcome. **International Reviews of Immunology**, v. 40, n. 1–2, p. 108–125, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08830185.2020.1844195>
- BORTOLOTTI, D.; GENTILI, V.; RIZZO, S.; ROTOLA, A.; RIZZO, R. SARS-CoV-2 Spike 1 Protein Controls Natural Killer Cell Activation via the HLA-E/NKG2A Pathway. v. 6, p. 1–15, 2020.
- BÖSMÜLLER, H.; MATTER, M.; FEND, F.; TZANKOV, A. The pulmonary pathology of COVID-19. **Virchows Archiv**, v. 478, n. 1, p. 137–150, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03053-1>
- BOTTINO, E.; PONCE, A. A. Respuesta inmunitaria innata pulmonar en la infección por Sars-Cov-2. **Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba**, v. 79, n. 1, p. 33–42, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.31053/1853.0605.v79.n1.30642>

CALLENDER, L. A.; CARROLL, E. C.; BEAL, R. W. J.; CHAMBERS, E. S.; NOURSHARGH, S.; AKBAR, A. N.; HENSON, S. M. Human CD8 + EMRA T cells display a senescence-associated secretory phenotype regulated by p38 MAPK. **Aging Cell**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/accel.12675>

CAMPISI, J.; D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 9, p. 729–740, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm2233>

CHALUPNY, N. J.; REIN-WESTON, A.; DOSCH, S.; COSMAN, D. Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 346, n. 1, p. 175–181, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.092>

CHANNAPPANAVAR, R.; PERLMAN, S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. **Seminars in Immunopathology**, v. 39, n. 5, p. 529–539, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0629-x>

CHAUVEAU, A.; TONNERRE, P.; PABOIS, A.; GAVLOVSKY, P. J.; CHATELAIS, M.; COUPEL, S.; CHARREAU, B. Endothelial cell activation and proliferation modulate NKG2D activity by regulating MICA expression and shedding. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, n. 1, p. 89–104, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000351605>

CHEN, Z.; JOHN WHERRY, E. T cell responses in patients with COVID-19. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 9, p. 529–536, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0402-6>

CHITADZE, G.; BHAT, J.; LETTAU, M.; JANSSEN, O.; KABELITZ, D. Generation of Soluble NKG2D Ligands: Proteolytic Cleavage, Exosome Secretion and Functional Implications. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 78, n. 2, p. 120–129, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/sji.12072>

CHOUSTERMAN, B. G.; SWIRSKI, F. K.; WEBER, G. F. **Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0639-8>

COPPÉ, J. P.; DESPREZ, P. Y.; KRTOLICA, A.; CAMPISI, J. 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://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>

COVRE, L. P.; DE MAEYER, R. P. H.; GOMES, D. C. O.; AKBAR, A. N. The role of senescent T cells in immunopathology. **Aging Cell**, v. 19, n. 12, p. 1–9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/accel.13272>

CUNHA, L. L.; PERAZZIO, S. F.; AZZI, J.; CRAVEDI, P.; RIELLA, L. V. Remodeling of the Immune Response With Aging: Immunosenescence and Its Potential Impact on COVID-19 Immune Response. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. August, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01748>

DUARTE-NETO, A. N. *et al.* Pulmonary and systemic involvement in COVID-19 patients assessed with ultrasound-guided minimally invasive autopsy.

Histopathology, v. 77, n. 2, p. 186–197, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/his.14160>

EVANGELOU, K. *et al.* Pulmonary infection by SARS-CoV-2 induces senescence accompanied by an inflammatory phenotype in severe COVID-19: possible implications for viral mutagenesis. **European Respiratory Journal**, p. 2102951, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1183/13993003.02951-2021>

FAJGENBAUM, D. C.; JUNE, C. H. Cytokine Storm. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 23, p. 2255–2273, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/nejmra2026131>

FAJNZYLBBER, J. *et al.* SARS-CoV-2 viral load is associated with increased disease severity and mortality. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19057-5>

FRAGA-SILVA, T. F. de C.; MARUYAMA, S. R.; SORGI, C. A.; RUSSO, E. M. de S.; FERNANDES, A. P. M.; DE BARROS CARDOSO, C. R.; FACCIOLI, L. H.; DIAS-BARUFFI, M.; BONATO, V. L. D. COVID-19: Integrating the Complexity of Systemic and Pulmonary Immunopathology to Identify Biomarkers for Different Outcomes. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. March 2020, p. 1–18, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599736>

FREUND, A.; PATIL, C. K.; CAMPISI, J. P38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. **EMBO Journal**, v. 30, n. 8, p. 1536–1548, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.69>

GUSTINE, J. N.; JONES, D. Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19. **American Journal of Pathology**, v. 191, n. 1, p. 4–17, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.08.009>

HASÖKSÜZ, M.; KILIÇ, S.; SARAÇ, F. Coronaviruses and sars-cov-2. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 50, n. SI-1, p. 549–556, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3906/sag-2004-127>

HE, J. *et al.* Single-cell analysis reveals bronchoalveolar epithelial dysfunction in COVID-19 patients. **Protein and Cell**, v. 11, n. 9, p. 680–687, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00752-4>

ITAHANA, K.; CAMPISI, J.; DIMRI, G. P. **Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1023/B:BGEN.0000017682.96395.10>

IVASHKIV, L. B.; DONLIN, L. T. Regulation of type I interferon responses Lionel. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri3581.Regulation>

JACKSON, C. B.; FARZAN, M.; CHEN, B.; CHOE, H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 3–20, 2022.

Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>

JACKSON, L. *et al.* SARS-CoV-2 cell-to-cell spread occurs rapidly and is insensitive to antibody neutralization. **bioRxiv**, p. 2021.06.01.446516, 2021. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.06.01.446516v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.06.01.446516v1.abstract>

JUNQUEIRA, C. *et al.* FcγR-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation. **Nature**, v. 606, n. June, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04702-4>

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>

KIM, T. S.; SHIN, E. C. The activation of bystander CD8⁺ T cells and their roles in viral infection. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 51, n. 12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0316-1>

KOELLE, K.; MARTIN, M. A.; ANTIA, R.; LOPMAN, B.; DEAN, N. E. The changing epidemiology of SARS-CoV-2. **Science**, v. 375, n. SUPPL.1, p. 1116–1121, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.abm4915>

KOHLMEIER, J. E.; WOODLAND, D. L. Immunity to respiratory viruses. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 61–82, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132625>

KOSYREVA, A.; DZHALILOVA, D.; LOKHONINA, A.; VISHNYAKOVA, P.; FATKHUDINOV, T. The Role of Macrophages in the Pathogenesis of SARS-CoV-2-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. May, p. 1–16, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.682871>

LAFORGE, M.; ELBIM, C.; FRÈRE, C.; HÉMADI, M.; MASSAAD, C.; NUSS, P.; BENOLIEL, J. J.; BECKER, C. **Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19.** [*S. l.: s. n.*] Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0407-1>

LANNA, A.; HENSON, S. M.; ESCORS, D.; AKBAR, A. N. 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, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni.2981>

LI, J. *et al.* Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 3, p. 1449–1458, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jmv.26424>

LI, Q. *et al.* Immune response in COVID-19: what is next? **Cell Death & Differentiation**, v. 29, n. 6, p. 1107–1122, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01015-x>

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

<https://doi.org/10.1038/s41591-020-0901-9>

LIBBY, P.; LÜSCHER, T. COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. **European Heart Journal**, v. 41, n. 32, p. 3038–3044, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa623>

LIGOTTI, M. E.; POJERO, F.; ACCARDI, G.; AIELLO, A.; CARUSO, C.; DURO, G.; CANDORE, G. Immunopathology and Immunosenescence, the Immunological Key Words of Severe COVID-19. Is There a Role for Stem Cell Transplantation? **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. September, p. 1–31, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.725606>

LIU, J.; LU, F.; CHEN, Y.; PLOW, E.; QIN, J. Integrin mediates cell entry of the SARS-CoV-2 virus independent of cellular receptor ACE2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 3, p. 101710, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101710>

LIU, J. Y.; SOUROULLAS, G. P.; DIEKMAN, B. O.; KRISHNAMURTHY, J.; HALL, B. M.; SORRENTINO, J. A.; PARKER, J. S.; SESSIONS, G. A.; GUDKOV, A. V.; SHARPLESS, N. E. Cells exhibiting strong p16 INK4a promoter activation in vivo display features of senescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 7, p. 2603–2611, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1818313116>

LOPES-PACIENCIA, S.; SAINT-GERMAIN, E.; ROWELL, M. C.; RUIZ, A. F.; KALEGARI, P.; FERBEYRE, G. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. **Cytokine**, v. 117, n. January, p. 15–22, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.01.013>

LOVETRO GALHARDO, F. P.; BADDINI MARTINEZ, J. A. Acute respiratory distress syndrome [Síndrome do desconforto respiratório agudo]. **Medicina**, v. 36, n. 2–4, p. 248–256, 2003. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-10344243499&partnerID=40&md5=cb16662a7e589eab3bffb4d27417a615>

LUO, Q.; LUO, W.; ZHU, Q.; HUANG, H.; PENG, H.; LIU, R.; XIE, M.; LI, S.; LI, M.; HU, X.; ZOU, Y. Tumor-derived soluble MICA obstructs the NKG2D pathway to restrain NK cytotoxicity. **Aging and Disease**, v. 11, n. 1, p. 118–128, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.14336/AD.2019.1017>

MATHEW, D. *et al.* Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. **Science**, v. 369, n. 6508, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABC8511>

MELMS, J. C. *et al.* A molecular single-cell lung atlas of lethal COVID-19. **Nature**, v. 595, n. 7865, p. 114–119, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03569-1>

MENTER, T. *et al.* Postmortem examination of COVID-19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings in lungs and other organs suggesting vascular dysfunction. **Histopathology**, v. 77, n. 2, p. 198–209, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/his.14134>

MERAD, M.; BLISH, C. A.; SALLUSTO, F.; IWASAKI, A. The immunology and immunopathology of COVID-19. **Science**, v. 375, n. 6585, p. 1122–1127, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.abm8108>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Vigilância à Saúde (SVS): Guia de vigilância Epidemiológica**. [s. l.], 2022. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em: 23 jun. 2022.

MORIOKA, S.; MMAUER. Living on the edge: Efferocytosis at the interface of homeostasis and pathology. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.018>. Living

NEWTON, A. H.; CARDANI, A.; BRACIALE, T. J. The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 4, p. 471–482, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0558-0>

NIENHOLD, R. *et al.* Two distinct immunopathological profiles in autopsy lungs of COVID-19. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18854-2>

OVADYA, Y.; KRIZHANOVSKY, V. Senescent cells: SASPected drivers of age-related pathologies. **Biogerontology**, v. 15, n. 6, p. 627–642, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10522-014-9529-9>

PENG, Y. *et al.* Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. **Nature Immunology**, v. 21, n. 11, p. 1336–1345, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6>

PEREIRA, B. I. *et al.* Sestrins induce natural killer function in senescent-like CD8+ T cells. **Nature Immunology**, v. 21, n. 6, p. 684–694, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0643-3>

PEREIRA, B. I.; AKBAR, A. N. Convergence of innate and adaptive immunity during human aging. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. NOV, p. 1–9, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00445>

POLIDORO, R. B.; HAGAN, R. S.; DE SANTIS SANTIAGO, R.; SCHMIDT, N. W. **Overview: Systemic Inflammatory Response Derived From Lung Injury Caused by SARS-CoV-2 Infection Explains Severe Outcomes in COVID-19**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01626>

RAHMAN, S.; MONTERO, M. T. V.; ROWE, K.; KIRTON, R.; KUNIK, F. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 14, n. 5, p. 601–621, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17512433.2021.1902303>

RODRIGUES, T. S. *et al.* Inflammasomes are activated in response to SARS-cov-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. **Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 3, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1084/JEM.20201707>

RUSSELL, C. D. *et al.* Tissue Proteomic Analysis Identifies Mechanisms and Stages of Immunopathology in Fatal COVID-19. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 66, n. 2, p. 196–205, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2021-0358OC>

SALINA, A. C. *et al.* Efferocytosis of SARS-CoV-2-infected dying cells impairs macrophage anti-inflammatory functions and clearance of apoptotic cells. **eLife**, v. 11, p. 1–24, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/elife.74443>

SALINA, A. C. G. Ativação de Macrófagos M1 / M2 pela eferocitose de células apoptóticas infectadas. Ribeirão Preto Ana Carolina Guerta Salina Ativação de Macrófagos M1 / M2 pela eferocitose de células apoptóticas infectadas. 2020.

SÁNCHEZ-CERRILLO, I. *et al.* COVID-19 severity associates with pulmonary redistribution of CD1c+ DCs and inflammatory transitional and nonclassical monocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 12, p. 6290–6300, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI140335>

SCHMIEDEL, D.; MANDELBOIM, O. NKG2D ligands-critical targets for cancer immune escape and therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. SEP, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02040>

SUBBARAO, K.; MAHANTY, S. Respiratory Virus Infections: Understanding COVID-19. **Immunity**, v. 52, n. 6, p. 905–909, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.004>

SZABO, P. A. *et al.* Analysis of respiratory and systemic immune responses in COVID-19 reveals mechanisms of disease pathogenesis. **medRxiv**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.10.15.20208041>

TAKEUCHI, A.; SAITO, T. CD4 CTL, a cytotoxic subset of CD4+ T cells, their differentiation and function. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. FEB, p. 1–7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00194>

TAN, L.; WANG, Q.; ZHANG, D.; DING, J.; HUANG, Q.; TANG, Y. Q.; WANG, Q.; MIAO, H. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 16–18, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0148-4>

TAY, M. Z.; POH, C. M.; RÉNIA, L.; MACARY, P. A.; NG, L. F. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363–374, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>

TOMASHEFSKI, J. F. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. **Clinics in Chest Medicine**, v. 21, n. 3, p. 435–466, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0272-5231\(05\)70158-1](https://doi.org/10.1016/S0272-5231(05)70158-1)

TSUJI, S. *et al.* SARS-CoV-2 infection triggers paracrine senescence and leads to a sustained senescence-associated inflammatory response. **Nature Aging**, v. 2, n. 2,

p. 115–124, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s43587-022-00170-7>

VAN DE BERG, P. J. E. J.; GRIFFITHS, S. J.; YONG, S.-L.; MACAULAY, R.; BEMELMAN, F. J.; JACKSON, S.; HENSON, S. M.; TEN BERGE, I. J. M.; AKBAR, A. N.; VAN LIER, R. A. W. Cytomegalovirus Infection Reduces Telomere Length of the Circulating T Cell Pool. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 7, p. 3417–3423, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903442>

VERAS, F. *et al.* SARS-CoV-2 triggered neutrophil extracellular traps (NETs) mediate. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 12, 2020.

VIANA, W. N. Síndrome de Angústia Respiratória Aguda após Berlim. **Pulmão**, v. 24, n. 3, p. 31–35, 2015. Disponível em: http://www.sopterj.com.br/wp-content/themes/_sopterj_redesign_2017/_revista/2015/n_03/09.pdf

VORA, S. M.; LIEBERMAN, J.; WU, H. Inflammasome activation at the crux of severe COVID-19. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00588-x>

WANG, C. *et al.* Alveolar macrophage dysfunction and cytokine storm in the pathogenesis of two severe COVID-19 patients. **EBioMedicine**, v. 57, p. 102833, 2020 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102833>

WANG, M. Y.; ZHAO, R.; GAO, L. J.; GAO, X. F.; WANG, D. P.; CAO, J. M. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. November, p. 1–17, 2020 b. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.587269>

WENDISCH, D. *et al.* SARS-CoV-2 infection triggers profibrotic macrophage responses and lung fibrosis. **Cell**, v. 184, n. 26, p. 6243–6261.e27, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.11.033>

WENSVEEN, F. M.; JELENČIĆ, V.; POLIĆ, B. NKG2D: A master regulator of immune cell responsiveness. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAR, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00441>

WESTMEIER, J. *et al.* Impaired cytotoxic CD8+ T cell response in elderly COVID-19 patients. **bioRxiv**, v. 11, n. 5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.08.21.262329>

WHO. **WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020.** [s. l.], 2020. Disponível em: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>.

WONG, J. J. M.; LEONG, J. Y.; LEE, J. H.; ALBANI, S.; YEO, J. G. Insights into the immuno-pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. **Annals of Translational Medicine**, v. 7, n. 19, p. 504–504, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21037/atm.2019.09.28>

XIANG, Q. *et al.* SARS-CoV-2 Induces Lymphocytopenia by Promoting Inflammation and Decimates Secondary Lymphoid Organs. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n.

April, p. 1–13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.661052>

YAMADA, N.; YAMANEGI, K.; OHYAMA, H.; HATA, M.; NAKASHO, K.; FUTANI, H.; OKAMURA, H.; TERADA, N. Hypoxia downregulates the expression of cell surface MICA without increasing soluble MICA in osteosarcoma cells in a HIF-1 α -dependent manner. **International Journal of Oncology**, v. 41, n. 6, p. 2005–2012, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1630>

YAO, H. *et al.* Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. **Cell**, v. 183, n. 3, p. 730–738.e13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.018>

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

ZHU, N. *et al.* Morphogenesis and cytopathic effect of SARS-CoV-2 infection in human airway epithelial cells. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17796-z>

ANEXO

Anticorpo primário	
CD68	Ms α Hum IgG2a # MA1-80133
CD8	Ms α Hum CD8a [AMC908] IgG2a #14-0008-82
Cytokeratin	Ms α Hum AE1/AE3 [AE1/AE3] IgG1 #M3515 (Dako-Agilent)
MICA/MICB	Rb α Hum MICA/MICB IgG #ab203679
NKG2D	Rb α Hum NKG2D IgG #PA5-97904
p16 (CDKN2A/p16INK4a)	Ms α Hum p16 [G175-405] IgG1 #550834 (BD)



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

PAOLA DE OLIVEIRA LOPES

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE DANO INESPECÍFICO MEDIADO POR
CÉLULAS T CD8 NO PULMÃO DE PACIENTES COM COVID-19**

VITÓRIA,ES

2022

PPG Biotecnologia
PPGBiotec

PAOLA DE OLIVEIRA LOPES

2022