SARAH CRISTINA GOZZI E SILVA

Análise de células Natural Killer de memória e da resposta antiviral de células T CD8+ na infecção por SARS-CoV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título Mestre em Ciências

São Paulo

2022

SARAH CRISTINA GOZZI E SILVA

Análise de células Natural Killer de memória e da resposta antiviral de células T CD8+ na infecção por SARS-CoV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título Mestre em Ciências

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profª. Drª. Maria Notomi Sato

São Paulo

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Sarah Cristina Gozzi e Silva

Título da Dissertação/Tese: Análise de células Natural Killer de memória e da resposta antiviral de células T CD8+ na infecção por SARS-CoV-2

Orientador (a): Dra. Maria Notomi Sato

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos que de alguma forma fizeram parte dessa jornada. Aos participantes da pesquisa, amigos, familiares e aos meus gatinhos. Aos que me motivaram e que acreditaram na minha capacidade. Aos que me deram força com um abraço, uma conversa e um sorriso. Aos que me ensinaram, me inspiraram e me fizeram amar a ciência.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), processo: 88887.469380/2019-00 e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo: 2019/22448-0 pelo apoio financeiro fundamental no desenvolvimento da pesquisa.

À minha orientadora Maria Notomi Sato, que me acolheu desde a iniciação científica, me ensinou o pensamento crítico, me incentivou a aprender cada vez mais, me apoiou em todas as etapas da minha pós-graduação e sempre foi muito prestativa! Uma pessoa extremamente humana e profissional admirável.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-USP), ao Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências 56 (LIM-56) e ao Instituto Adolfo Lutz com todo o suporte estrutural e tecnológico de fundamental importância no desenvolvimento desse projeto.

Agradecer imensamente a todos os pós-graduandos da experimental do LIM-56. Anna Júlia, Anna Cláudia, Danielle, Emily, Franciane, Iara, Júlia, Luana, Milena, Natalli, Ricardo e Yasmin. Todos vocês tiveram uma contribuição imensa no meu crescimento e aprendizado. Sempre fomos um grupo unido e entrosado. Passamos por muitas dificuldades juntos, especialmente com as incertezas referente a COVID-19 e mudanças de projetos; mas vencemos juntos todas as barreiras. Vocês me ensinaram, me inspiraram e colaboraram muito com o resultado final deste trabalho. Ao Fabinho, que mesmo lá do Japão me auxiliou na geração de alguns gráficos deste trabalho.

A Dani, Yas, Iara, Milena, Júlia e Emily que além de colaborarem com a pesquisa, se tornaram amigas de coração, que quero levar a vida toda comigo! Me acolheram, enxugaram minhas lágrimas, acreditaram em mim quando eu não acreditava mais e tornaram meus dias muito mais alegres!

Aos médicos e pesquisadores Gil, Telminha, Tatiane e Alberto pelo suporte estrutural e científico para o desenvolvimento deste trabalho.

À Eni secretária do departamento de imunologia e a Tati, Edu, Daniel do LIM-56 pelos inúmeros auxílios na organização e confecção do estudo.

Aos membros da banca de qualificação do mestrado (José Alexandre Marzagão Barburto, Otávio Cabral Marques Telma Sumida Oshiro) por suas importantes contribuições científicas com sugestões importantes quanto ao desenvolvimento desse estudo.

À toda minha família, em especial a minha mãe Silvia, minha companheira da vida, que sempre me incentivou a seguir os meus sonhos, me forneceu todas as condições necessárias para que eu conseguisse chegar onde eu quisesse, e sempre esteve ao meu lado em todos os momentos. Agradecer aos meus irmãos Juliana e Arthur pela sua companhia e incentivo e as minhas sobrinhas lindas Lara e Lorena por me trazerem muita alegria com sua inocência, brincadeiras e carinhos. Ao meu pai Alvacir, que sempre me deu bons conselhos e me inspirou muito na busca pelo conhecimento. À minha avó Dirce, em memória a ela, que sempre foi uma ótima companhia e viveu seus últimos anos comigo. Sempre teve muito amor e orgulho pela netinha.

Agradeço também aos meus gatinhos, Godofredo e Olaf que sempre ficavam em cima do meu computador e cadernos querendo minha atenção e me dando muito amor e força para continuar. Em memória ao Godofredo, que me fez muito feliz por mais de 12 anos e que esteve ao meu lado. Estava comigo quando me sentia triste ou feliz, brincava, me dava carinho, força e me alegrava todos os dias! Sempre foi muito bom chegar em casa e receber tanto amor deste bichinho tão especial.

Enfim, a todos que fizeram parte dessa história, deixo registrado o meu profundo agradecimento!

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto”

Carl Sagan

Trabalho realizado no Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Investigação Médica 56 (LIM-56) do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo sob orientação da professora Drª Maria Notomi Sato. Projeto financiado pela CAPES (88887.469380/2019-00) e FAPESP (n° 2019/22448-0)

RESUMO

GOZZI-SILVA, S.C. Análise de células Natural Killer de memória e da resposta antiviral de células T CD8+ na infecção por SARS-CoV-2. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2022.

A COVID-19, doença infecciosa causada pelo SARS-CoV-2, disseminou-se em escala pandêmica. A infecção pelo vírus pode evoluir de maneira assintomática ou gerar sintomas mais graves, influenciada pela presença de comorbidades. A linfopenia nos pacientes acometidos com a COVID-19 de acordo com a gravidade dos sintomas é recorrente, incluindo diminuição da frequência de células NK (Natural Killers). Contudo, o perfil de células T CD4+, T CD8+ e NK quanto a funcionalidade ainda não bem foram elucidados na infecção aguda pelo SARS-CoV-2. A proposta deste estudo é avaliar o perfil fenotípico e funcional de linfócitos T e células NKs, incluindo células NK de memória, em pacientes com quadro moderado e grave/crítico de COVID-19. No período de pandemia, iniciamos as análises em uma coorte de 79 pacientes confirmados com SARS-CoV-2 (31 casos moderados e 48 casos graves/críticos) procedentes do HC-FMUSP. Observamos nesta coorte prevalência de óbito de 6,5% nos quadros moderados e de 31,3% nos quadros graves. As comorbidades mais prevalentes foram hipertensão arterial sistêmica e distúrbios cardíacos. Apesar da linfopenia, evidenciamos aumento da expressão de marcadores de ativação em linfócitos T (CD28, CD38 e HLA-DR), assim como aumento da frequência de células T CD4+, T CD8+ e células NK que expressam a proteína de *checkpoint* imunológico, PD-1, nos pacientes com quadro grave/crítico em relação aos controles. Em contraste com a diminuição percentual de células NK, houve aumento da frequência de NK de memória, NKG2C+CD57+, tanto nos casos moderados quanto graves/críticos da infecção. Já no tecido cutâneo de pacientes que foram a óbito em decorrência da doença, detectamos na região dérmica aumento da expressão de NKG2C e granzima. Considerando que a expansão desta população está relacionada com a exposição ao citomegalovírus (CVM), houve elevação dos títulos de anticorpos IgG anti-CMV nos pacientes com COVID-19, que se normalizou nos indivíduos convalescentes. Quanto ao perfil citotóxico das células mononuclares do sangue periférico, já na condição basal, foi observado aumento da resposta de células TCD4+ e NK, entretanto com o estímulo com PMA e Ionomicina pouco se alterou. Já os linfócitos T CD8+ mostraram diminuição da resposta citotóxica, evidenciando um perfil de exaustão nos pacientes com COVID-19 grave. Além disto, foi evidenciado aumento da expressão constitutiva de genes associados a via das caspases, inflamassoma e fatores antivirais em linfócitos T CD8+ purificados de pacientes com COVID-19 grave, e redução da expressão de TNF-a. O perfil citotóxico, por células NK de memória e células T CD4+ citotóxicas, pode compensar a disfunção/exaustão das T CD8+, contudo presença de células com potencial citotóxico foram detectadas na derme de autopsias de pacientes COVID-19. Estes achados podem fornecer um maior entendimento dos fatores associados a gravidade da infecção aguda por COVID-19.

Palavras-chave: SARS-CoV-2, linfócitos T, NK de memória, fatores antivirais.

ABSTRACT

GOZZI-SILVA, S.C. Analysis of Natural Killer memory cells and the antiviral response of CD8+ T cells in SARS-CoV-2 infection. Dissertation (Master in Immunology) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 2022.

COVID-19, an infectious disease caused by SARS-CoV-2, has spread on a pandemic scale. The virus infection can evolve asymptomatically or generate more severe symptoms, influenced by the presence of comorbidities. Lymphopenia in patients affected with COVID-19 according to the severity of symptoms is recurrent, including a decrease in the frequency of NK cells (Natural Killers). However, the profile of CD4+ T, CD8+ T and NK cells in terms of functionality has not yet been well elucidated in acute SARS-CoV-2 infection. The purpose of this study is to evaluate the phenotypic and functional profile of T lymphocytes and NK cells, including memory NK cells, in patients with moderate and severe/critical COVID-19. During the pandemic period, we started analyzing a cohort of 79 patients confirmed with SARS-CoV-2 (31 moderate cases and 48 severe/critical cases) from HC-FMUSP. In this cohort, we observed a death prevalence of 6.5% in moderate cases and 31.3% in severe cases. The most prevalent comorbidities were systemic arterial hypertension and cardiac disorders. Despite lymphopenia, we observed an increase in the expression of activation markers in T lymphocytes (CD28, CD38 and HLA-DR), as well as an increase in the frequency of CD4+ T cells, CD8+ T cells and NK cells that express the immunological checkpoint protein, PD- 1, in patients with severe/critical condition compared to uninfected. In contrast to the percentage decrease in NK cells, there was an increase in the frequency of memory NK, NKG2C+CD57+, both in moderate and severe/critical cases of infection. In the skin tissue of patients who died as a result of the disease, we detected an increase in the expression of NKG2C and granzyme in the dermal region. Considering that the expansion of this population is related to exposure to cytomegalovirus (CVM), there was an increase in anti-CMV IgG antibody titers in patients with COVID-19, which normalized in convalescent individuals. As for the cytotoxic profile of peripheral blood mononuclear cells, in the basal condition, an increase in the response of TCD4+ and NK cells was observed, however with the stimulation with PMA and Ionomycin little changed. On the other hand, CD8+ T lymphocytes showed a decrease in the cytotoxic response, evidencing a profile of exhaustion in patients with severe COVID-19. In addition, increased constitutive expression of genes associated with the caspase pathway, inflammasome and antiviral factors in purified CD8+ T lymphocytes from patients with severe COVID-19, and reduced expression of TNF-a. The cytotoxic profile, by memory NK cells and cytotoxic CD4+ T cells, can compensate for the dysfunction/exhaustion of CD8+ T cells, however the presence of cells with cytotoxic potential were detected in the dermis of autopsies of COVID-19 patients. These findings may provide a greater understanding of factors associated with the severity of acute COVID-19 infection.

Keywords: SARS-CoV-2, T lymphocytes, memory NK, antiviral factors

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Reconhecimento e sinalização celular na infecção pelo SARS-CoV 20
Figura 2. Mecanismo interativo entre as células NK e a infecção pelo SARS-CoV-2 23
Figura 3. Resposta funcional de linfócitos T na infecção por SARS-CoV-2. 27
Figura 4. Representação gráfica dos dados demográficos dos pacientes acometidos com SARS-CoV-2 e dos indivíduos controles ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 5. Comorbidades dos pacientes acometidos com COVID-19**Erro! Indicador não definido.**
Figura 6. Frequência de comorbidades associadas..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 7. Estratégia de análise de células NK em sangue periférico.**Erro! Indicador não definido.**
Figura 8. Estratégia de análise de linfócitos T em sangue periférico.**Erro! Indicador não definido.**
Figura 9. Estratégia de análise para avaliação da expressão de PD-1 em PBMC ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 10. Estratégia de análise da avaliação funcional de linfócitos T CD4+, T CD8+ e células NK ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 11. Estratégia de análise da avaliação da pureza de linfócitos T CD8+**Erro! Indicador não definido.**
Figura 12. Diminuição percentual de células NK e aumento da frequência de células NK de memória na COVID-19. ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 13. Aumento da frequência de células NK após o sétimo dia de infecção pelo SARS-CoV-2 ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 14. Frequência de células NK e subpopulações em pacientes infectados por SARS-CoV-2 que tiveram alta ou que foram a óbito. ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 15. Aumento dos níveis de anticorpos IgG anti-CMV nos indivíduos infectados por SARS-CoV-2 em relação aos controles. ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 16. Títulos de IgG anti-CMV de pacientes da enfermaria e UTI com COVID-19 separados por períodos de PCR positivo ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 17. Títulos de IgG anti-CMV de pacientes COVID-19 positivos que tiveram alta ou que foram a óbito..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 18. Aumento dos títulos de anticorpos IgG anti-CMV nos pacientes acometidos pela COVID-19 e redução nos indivíduos convalescentes ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 19. Ausência de correlação entre títulos de IgG anti-CMV e frequência de células NK de memória em pacientes com COVID-19..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 20. Aumento da expressão de NKG2C e granzima na derme de autópsias de pacientes que foram a óbito em decorrência da COVID-19..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 21. Caracterização por IHQ de NKG2C e granzima na derme de pacientes não infectados e que foram a óbito em decorrência da COVID-19..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 22. Redução da frequência de linfócitos e populações T CD4+ e T CD8+ nos pacientes com a doença grave/crítica da infecção por SARS-CoV-2 ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 23. Aumento do número de leucócitos e relação neutrófilo/linfócito (RNL) e redução de linfócitos totais em pacientes acometidos pela infecção pelo SARS-CoV--2.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 24. Frequência de linfócitos T CD4+ e T CD8+ de pacientes acometidos pela COVID-19 separados em faixa de dias de PCR positivo. ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 25. Frequência de células T em pacientes infectados por SARS-CoV-2 que tiveram a
ou que foram a óbito. ..... **Erro! Indicador não defini**
Figura 26. Aumento da frequência da expressão de marcadores de ativação em linfócitos T CD4+ e T CD8+ em indivíduos com COVID-19. ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 27. Frequência da expressão de marcadores de ativação em linfócitos T CD4+ e T CD8+ de pacientes acometidos pela COVID-19 separados em períodos de dias após PCR positivo ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 28. Frequência da expressão de marcadores de ativação em linfócitos T CD4+ e T CD8+ de pacientes infectados por SARS-CoV-2 que tiveram alta ou que foram a óbito ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 29. Intensidade Mediana de Fluorescência de marcadores de ativação nos linfócitos T de indivíduos com COVID-19. ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 30 Aumento da frequência de células que expressam PD-1 em linfócitos T CD4+, T CD8+ e células NK em pacientes graves infectados por SARS-CoV-2.**Erro! Indicador não definido.**
Figura 31. Perfil citotóxico de linfócitos T CD4+ na infecção por SARS-CoV-2..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 32. Perfil citotóxico de linfócitos T CD8+ na infecção por SARS-CoV-2..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 33 Perfil citotóxico de células NK na infecção por SARS-CoV-2.**Erro! Indicador não definido.**
Figura 34. Definição de populações guiada por t-SNE de subtipos de linfócitos de indivíduos não infectados e acometidos por SARS-CoV-2 grave/crítico ... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 35. Expressão de fatores anti-virais representados por heat map.**Erro! Indicador não definido.**
Figura 36. Representação por Volcano Plot de genes positivamente e negativamente regulados na COVID-19 grave. ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 37. Expressão de genes positivamente e negativamente regulados na COVID-19 grave.. ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 38. Correlação de parâmetro inflamatório com a frequência de células NK e linfócitos T em pacientes com quadro moderado e grave/crítico de COVID-19**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Dados demográficos dos pacientes acometidos com SARS-CoV-2 e dos indivíduos não infectados ..... **Erro! Indicador não definido.**
Tabela 2. Painel de anticorpos utilizados para avaliação fenotípica de linfócitos TCD4+ e T CD8+ por citometria de fluxo..... **Erro! Indicador não definido.**
Tabela 3. Painel de anticorpos utilizados para avaliação fenotípica de células NK por citometria de fluxo. ..... **Erro! Indicador não definido.**
Tabela 4. Painel de anticorpos utilizados para avaliação da expressão de PD-1em linfócitos T CD4+, T CD8+ e células NK por citometria de fluxo..... **Erro! Indicador não definido.**
Tabela 5. Painel de anticorpos para avaliação do perfil citotóxico por citometria de fluxo. ..... **Erro! Indicador não definido.**
Tabela 6. Painel de anticorpos para avaliação de pureza de linfócitos TCD8+ por citometria de fluxo. ..... **Erro! Indicador não definido.**
Tabela 7. Dados demográficos dos pacientes incluídos na avaliação por IHQ de granzima e NKG2C em autópsias de pele..... **Erro! Indicador não definido.**
Tabela 8. Dados laboratoriais dos indivíduos controles e pacientes infectados por SARS-CoV-2 ..... **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS

µL Microlitro

Ac Anticorpo

ACE2 Enzima Conversora da Angiotensina 2 (do inglês: *Angiotensin-converting enzyme 2*)

ALT Alanina aminotransferase

APC Célula Apresentadora de Antígeno (do inglês: *antigen-presenting cell*)

AST Aspartato aminotransferase

BAL Lavado broncoalveolar (do inglês: *bronchoalveolar lavage*)

CAAE Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

CD Grupamento de Diferenciação (do inglês: *Cluster of Differentiation*)

CHCM Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CMV Citomegalovírus

CoV Coronavírus

COVID-19 Doença por coronavírus 2019 (do inglês: *Coronavirus Disease 2019*)

CS Controle saudável

DAMP Padrões Moleculares Associados ao Perigo (do inglês: *Danger Associated Molecular Patterns*)

Dist Distúrbio

DLC Divisão de Laboratório Central

DNA Ácido desoxirribonucleico (do inglês: *deoxyribonucleic acid*)

EDTA Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês: *ethylenediaminetetraacetic acid*)

ENF Enfermaria

F Feminino

FMO Do inglês: *Fluorescence Minus One*

FSC Do inglês: *Forward SCatter*

HAS Hipertensão Arterial Sistêmica

HC-FMUSP Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HCM Hemoglobina corpuscular média

HLA Antígeno leucocitário humano (do inglês: *human leukocyte antigen*)

IFN Interferon

IL Interleucina (do inglês: *Interleukin*)

IRF Fatores Regulatórios de Interferon (do inglês: *Interferon Regulatory Factors*)

ISG Genes Estimulados por Interferon (do inglês: *Interferon Stimulated Genes*)

LDH lactato desidrogenase

JAK Janus quinase (do inglês: *Janus kinase*)

M Masculino

MDA5 Proteína 5 associada à diferenciação de melanoma (do inglês: *melanoma differentiation-associated protein 5*)

MERS Síndrome Respiratória do Oriente Médio (do inglês: *Middle East respiratory syndrome*)

mL Mililitro

NK Do inglês: *Natural Killer*)

NSP Proteína não estrutural (do inglês: *nonstructural protein)*

OMS Organização Mundial da Saúde

PAMP Padrão Molecular Associado a Patógenos (do inglês: *Pathogen-associated molecular patterns*)

PBMC Células Mononucleares de Sangue Periférico (do inglês: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS Tampão Fosfato Salina (do inglês: *Phosphate-Buffered Saline*)

PCR Proteína C Reativa

PD-1 Proteína 1 de Morte celular programada (do inglês: *Programmed Cell Death Protein 1*)

PMA Do inglês: *Phorbol Myristate Acetate*

PRR Receptor de Reconhecimento de Padrões (do inglês: *Pattern Recognition Receptors*)

RDW Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (do inglês: *Red Cell Distribution Width*)

RIG-I Gene Indutível por ácido Retinóico I (do inglês: *Retinoic acid-inducible gene I*)

RNA Ácido riboniucleico (do inglês: *Ribonucleic acid*)

RNL Relação neutrófilo/linfócito

RSV Vírus sincicial respiratório (do inglês: *Respiratory syncytial virus*)

RT-PCR Transcriptase reversa – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: *reve transcription-polymerase chain reaction*)

SARS-CoV-2 Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (do inglês: *Severe a respiratory syndrome coronavirus 2*)

SEM Do inglês: *standard error of the mean*

SRAG Síndrome Respiratória Aguda Grave

SSC Do inglês: *Side Scatter*

ssRNA RNA de fita simples (do inglês: *single-stranded RNA)*

STAT Transdutor de sinal e ativador da transcrição (do inglês: *Members of the signal transducer and activator of transcription)*

TLR Receptor do Tipo Toll (do inglês: *Toll-like receptor*)

TMPRSS2 Serinoprotease transmembrana 2 humana (do inglês: *transmembrane serine protease 2*)

TNF Fator de Necrose Tumoral (do inglês: *Tumor necrosis fator*)

TYK2 Tirosina-proteína quinase 2 (do inglês: *tyrosine-protein kinase 2*)

UTI Unidade de Terapia Intensiva

VCM Volume Corpuscular Médio

VHB Vírus da Hepatite B

VHC Vírus da Hepatite C

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....16

1.1 Infeção pelo SARS-CoV-2 16

1.2 Sinalização celular e tempestade de citocinas na infecção por SARS-CoV-2 19

1.3 Células NK de memória na infecção por SARS-CoV-2.....22

1.4 Função dos linfócitos T CD4+, T CD8+ e linfopenia na infecção por SARS-CoV-2.....24

2. OBJETIVOS 30

2.1 Objetivo geral 30

2.2 Objetivos específicos 30

3. MATERIAIS E MÉTODOS ..... Erro! Indicador não definido.

3.1 Casuística e seleção das amostras..... **Erro! Indicador não definido.**

3.2 Análise fenotípica de linfócitos T CD4+, T CD8+ e células NK em sangue periférico por citometria de fluxo..... **Erro! Indicador não definido.**

3.3 Determinação de anticorpos IgG anti-CMV por ELISA ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.4 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) ... **Erro! Indicador não definido.**

3.5 Avaliação funcional de linfócitos T CD4+, T CD8+ e células NK..... **Erro! Indicador não definido.**

3.6 PCR array da expressão de fatores antivirais em linfócitos T CD8+ purificados ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.7 Caracterização da população NKG2C+ e granzima+ em tecido cutâneo por imunohistoquímica ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.8 Análise Estatística..... **Erro! Indicador não definido.**

4. RESULTADOS ..... Erro! Indicador não definido.

4.1 Análise fenotípica de subtipos de células NK e títulos de anticorpos IgG anti-CMV . **Erro! Indicador não definido.**

4.2 Análise fenotípica de linfócitos totais e populações de células T CD4+ e T CD8+..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3 Avaliação da expressão de PD-1 de linfócitos T CD4+, T CD8+ e células NK ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.5 Avaliação do perfil citotóxico de linfócitos T CD4+, T CD8+ e células NK ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.6 Avaliação da expressão de fatores antivirais e sinalização nos casos graves/críticos da infecção pelo SARS-CoV-2..... **Erro! Indicador não definido.**

4.7 Dados laboratoriais e correlações com frequência de NK e linfócitos **Erro! Indicador não definido.**

5. DISCUSSÃO ..... Erro! Indicador não definido.

6. CONCLUSÃO.....31

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....32

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido indivíduos controles 42

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pacientes COVID-19 44

APÊNCIDE C – Aprovação do Comitê em Ética e Pesquisa.....46

APÊNDICE D – Lista de artigos publicados.....49

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infeção pelo SARS-CoV-2

A COVID-19, doença causada pelo vírus SARS-CoV-2 (coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave), disseminou-se em escala pandêmica desde o relato do primeiro caso em Wuhan, China, em 2019 (HUANG *et al.*, 2020). De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), até a data de 20 de junho de 2022, mais de 536 milhões de indivíduos foram infectados em todo mundo e 6,3 milhões foram a óbito (WHO, 2022). No Brasil, o primeiro caso reportado ocorreu em 25 de fevereiro de 2020 (DE SOUZA *et al.*, 2020) e até o momento o número de pessoas infectadas é superior a 31 milhões e com aproximadamente 668 mil mortes (WHO, 2022).

Em 2002 e 2012, respectivamente, dois coronavírus altamente patogênicos de origem zoonótica, coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), surgiram em humanos e causaram doença respiratória. Por ser altamente transmissível, o SARS-CoV-2 se espalhou rapidamente por todo o mundo e superou fortemente o SARS e o MERS em termos de número de pessoas

infectadas e da amplitude espacial das áreas epidêmicas. O surto contínuo de COVID-19 representa uma ameaça à saúde pública global (HU *et al.*, 2021).

O SARS-CoV-2 é um β-coronavírus, consiste em um vírus não segmentado, envelopado e com diâmetro variando de 60 a 140 nm. O genoma é constituído por RNA de fita simples (ssRNA) com aproximadamente 30 kb de comprimento (MITTAL *et al.*, 2020). O vírus é composto por quatro proteínas estruturais principais, incluindo a glicoproteína de pico (S), glicoproteína de envelope (E), glicoproteína de membrana (M) e proteína do nucleocapsídeo (N), além de diversas proteínas acessórias (ASTUTI; YSRAFIL, 2020). A glicoproteína S permite a ligação dos vírus às células hospedeiras pela enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), expressa nas células do trato respiratório inferior, sendo também expressa em outros locais como intestino delgado, testículos, rins, coração, tireoide e tecido adiposo (PRINGLE *et al.*, 2011). As partículas virais utilizam a Serina Protease Transmembranar 2 (TMPRSS2) da célula para que ocorra a clivagem da proteína S e fusão da membrana viral, permitindo com que o vírus tenha acesso ao citosol (HOFFMANN *et al.*, 2020). Com a liberação do genoma viral no citoplasma, inicia-se a transcrição, tradução e síntese do RNA genômico e das proteínas estruturais S, E e M, que são inseridas no retículo endoplasmático. No compartimento intermediário, entre o ER e o complexo de Golgi, o genoma viral é encapsulado pela proteína N formando a partícula madura (SHANG *et al.*, 2020). A proteína M direciona a maioria das interações proteína-proteína necessárias para a montagem do coronavírus (CoV), mas para a formação do envelope é preciso a coexpressão das proteínas M e E. É nesta etapa que a proteína S é incorporada ao vírion. Após a montagem, as partículas são transportadas para a superfície celular em vesículas e liberadas por exocitose (FEHR; PERLMAN, 2015; SHANG *et al.*, 2020).

Desde a caracterização genômica inicial do SARS-CoV-2, o vírus foi dividido em diferentes grupos genéticos. Devido a vários processos de microevolução e de seleção, algumas mutações adicionais surgiram, gerando diferenças dentro de cada grupo genético (chamadas variantes) (WHO, 2021). Embora a proteína S do SARS-CoV-2 tenha exibido cerca de 4000 mutações durante a pandemia (WISE, 2020), a maioria delas não afetou a função viral. Entretanto, a variante B.1.1.7 (alfa), também conhecida como a variante do Reino Unido, foi relatada em setembro de 2020 e mostrou ter 23 mutações que beneficiaram a sua transmissibilidade. Essa variante é 56% mais transmissível, indicando sua vantagem competitiva (JOGALEKAR; VEERABATHINI; GANGADARAN, 2021). A variante B.1.351 (beta) surgiu em outubro de 2020 na África do Sul e é provavelmente 50% mais transmissível (KUPFERSCHMIDT, 2021). A variante P.1 (gama) surgiu em dezembro de 2020 no Brasil e as evidências sugerem que é duas vezes mais transmissível do que o vírus do tipo selvagem e

levou a reinfecções de 25-61% da população de Manaus, Brasil (JOGALEKAR; VEERABATHINI; GANGADARAN, 2021). As evidências sugerem o surgimento de 240 novas cepas, incluindo o B.1.617 (delta), que pode ser responsável por causar reinfecções em pessoas recuperadas e nas que foram vacinadas (PAL *et al.*, 2018; WHO, 2021). Além disso, a variante B.1.1.529 (Ômicron) foi relatada pela primeira vez na África do Sul em 24 de novembro de 2021 (WHO, 2021). Ela se distingue das variantes anteriores por abrigar em sua sequência genômica 49 mutações (30 das quais ocorrem dentro da proteína spike) - um salto das 13 mutações encontradas na variante delta (GÜNL *et al.*, 2021). Ainda não está claro se Ômicron é mais transmissível ou se causa doença mais grave em comparação com outras variantes (DYER, 2021).

O SARS-CoV-2 invade as células ciliadas do epitélio superficial da cavidade nasal. Uma infecção viral disseminada com viremia e altas cargas virais nas vias aéreas na admissão hospitalar estão ambas associadas a resultados graves (OSUCHOWSKI *et al.*, 2021). Em contraste com os vírus influenza, que infectam principalmente células das vias aéreas e células imunes (macrófagos alveolares e intersticiais e células natural killer), o SARS-CoV-2 pode infectar uma gama mais ampla de células, incluindo cardiócitos e células endoteliais, testiculares e do ducto biliar (OSUCHOWSKI *et al.*, 2021).

Os sintomas mais comuns da infecção são febre, fadiga e tosse seca e os menos comuns incluem produção de expectoração, dor de cabeça, hemoptise, diarreia, anorexia, dor de garganta, dor no peito, calafrios, náuseas e vômitos (GUAN *et al.*, 2020). Alterações olfativas e gustativas também foram relatadas (GIACOMELLI *et al.*, 2020). A maioria dos indivíduos mostrou sinais da doença após um período de incubação de 1-14 dias (mais comumente em torno de 5 dias) e dispneia e pneumonia desenvolveram-se em um tempo médio de 8 dias a partir do início da doença (HU *et al.*, 2021; WU; MCGOOGAN, 2020). Contudo, as novas variantes de SARS-CoV-2 podem diferir no período de incubação e na manifestação dos sintomas clínicos.

Todas as idades são suscetíveis a COVID-19, no entanto, as manifestações clínicas diferem com a idade. Geralmente, homens mais velhos (> 60 anos de idade) são mais propensos a desenvolver doenças respiratórias graves que requerem hospitalização ou que levam ao óbito, enquanto a maioria dos jovens e crianças têm apenas a doença leve ou são assintomáticos (WU; MCGOOGAN, 2020). Indivíduos portadores de comorbidades como hipertensão, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, doenças imunossupressoras, doenças do sistema respiratório, renais e obesidade são mais suscetíveis às complicações da COVID-19 (ALBERCA *et al.*, 2021; GOZZI-SILVA *et al.*, 2021; HUANG *et al.*, 2020). Embora as razões

exatas para a associação entre essas comorbidades e a gravidade da doença e o risco de mortalidade do COVID-19 não tenham sido esclarecidos, a desregulação imunológica e a hiperinflamação nessas doenças crônicas podem ser fatores contribuintes para a progressão do COVID-19 (GULER; OZTURK, 2020).

Na infecção por SARS-CoV-2, são observados níveis elevados da velocidade de hemossedimentação (VHS), Proteína C reativa (PCR), ferritina sérica e lactato desidrogenase (LDH). Marcadores hematológicos (com presença de leucocitose, neutrofilia, linfopenia e trombocitopenia), marcadores bioquímicos (creatinina) e marcadores de coagulação (D- dímero) podem estar relacionados à gravidade e mortalidade da COVID-19 (FEI; SMITH; CAO, 2021). Casos graves tendem a ter uma proporção mais alta da relação entre neutrófilos e linfócitos (RNL). O RNL é calculado a partir do hemograma, dividindo a contagem absoluta de neutrófilos pela contagem absoluta de linfócitos e indica o estado inflamatório geral do paciente. Pacientes em estado grave da infecção por SARS-CoV-2, mostram níveis elevados de RNL (LIU; XU; LIN, 2020).

A ampliação dos protocolos de vacinação assim como doses de reforço, estão contribuindo para a redução dos sintomas e gravidade da infecção. A vacinação contra a COVID-19 começou em São Paulo, Brasil, em janeiro de 2021, primeiramente dirigida a profissionais da saúde e idosos, utilizando a vacina CoronaVac (Sinovac/Butantan), e posteriormente a vacina Oxford/AstraZeneca (ChAdOx1) (AstraZeneca/Fiocruz-RJ). O protocolo de vacinação foi ampliando-se para as demais faixas etárias atingindo também as crianças (CAMPOS *et al.*, 2021; MARTINS-FILHO; BARBERIA, 2022).

1.2 Sinalização celular e tempestade de citocinas na infecção por SARS-CoV-2

Após a entrada do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras humanas, o RNA viral é liberado e age como padrão molecular associado a patógenos (PAMP), que é reconhecido por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) tais como receptores Toll-like (TLR3, TLR7 e TLR9) (NIKOLICH-ZUGICH *et al.*, 2020). A sinalização induz MyD88 que leva à ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB) e, portanto, à produção de citocinas pró-inflamatórias como (IL-1, IL-6, TNF-α e IL-8), quimiocinas, proteínas de resposta inflamatória aguda como a PCR (PORTELA SOUSA; BRITES, 2020; YANG; HUANG; CHIANG, 2021). A ativação dos fatores de transcrição IRF3 e IRF7 leva à produção de IFN do tipo I que ao se ligar a IFNAR, promove a ativação da proteína tirosina quinase associada ao receptor Janus quinase 1 (JAK1)

e a tirosina quinase 2 (TYK2), que fosforilam os fatores de transcrição citoplasmáticos STAT1 e STAT2 e translocam-se para o núcleo. Com isso, STAT1 e STAT2 se agrupam com o fator regulador de IFN 9 (IRF9) para formar um complexo denominado fator de gene estimulado por IFN 3 (ISGF3) (IVASHKIV; DONLIN, 2014). ISGF3 liga-se às suas sequências de DNA cognatas, ativando diretamente a transcrição de ISGs. Assim, a sinalização de IFN do tipo I induz ISGs que restringem os patógenos por vários mecanismos, incluindo a inibição da transcrição, tradução e replicação viral (IVASHKIV; DONLIN, 2014; KASUGA *et al.*, 2021; PORTELA SOUSA; BRITES, 2020).

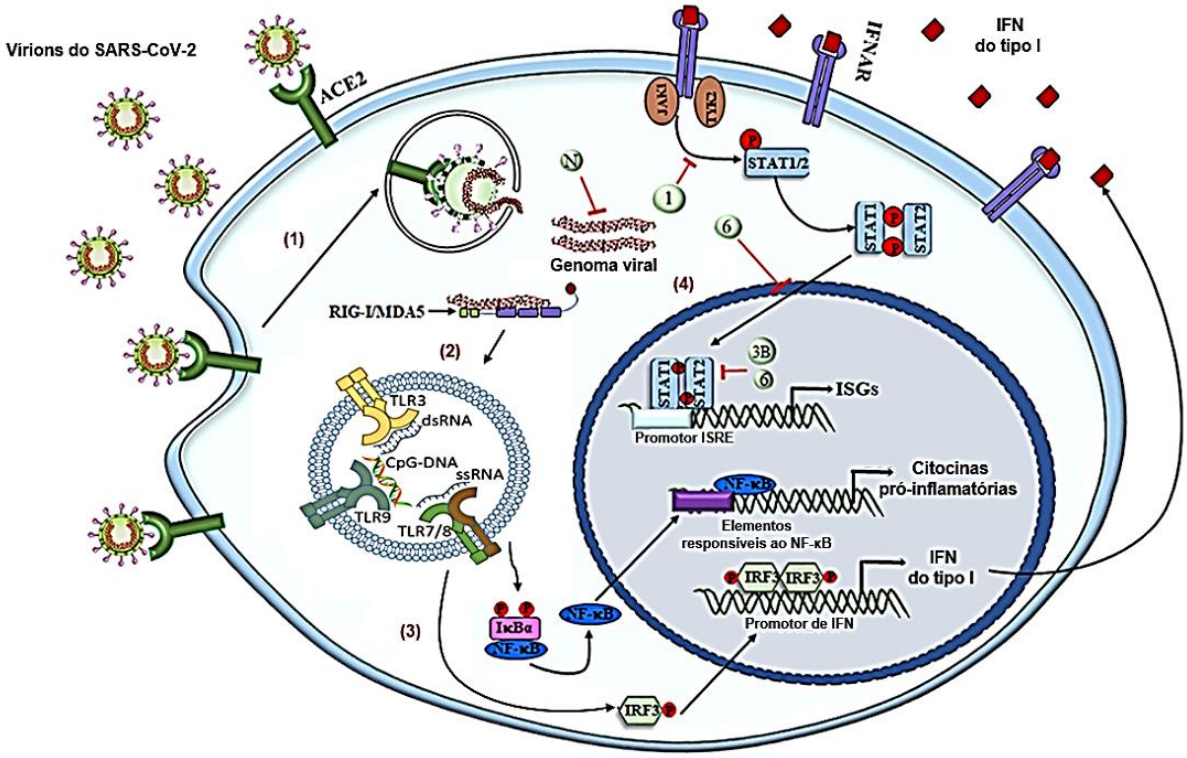

Figura 1. Reconhecimento e sinalização celular na infecção pelo SARS-CoV. (1) Após a interação do vírus com o receptor específico, as partículas são endocitadas no citosol e então reconhecidas por PRRs citosólicos como RIG-I e MDA5. O vírus também é reconhecido por TLRs endossomais como TLR3, 7 e 9, gerando a ativação do NF-κB e IRF3 por meio do desencadeamento de uma cascata de sinalização. (3) Após a translocação para o núcleo, o NF-κB ativado atua como um ativador transcricional para numerosas citocinas pró-inflamatórias. O IRF3, mediante fosforilação via ubiquitina quinases, homodimeriza e transloca-se para o núcleo para ativar a transcrição de IFNs do tipo I. (4) IFNs do tipo I ativam a via de sinalização JAK – STAT via receptor IFNα / β (IFNAR), seguido por fosforilação de STAT1 e STAT2 via proteína citoplasmática JAK1 e TYK2. Os heterodímeros STAT1 e STAT2 translocam-se para o núcleo e são recrutados para a transcrição dos ISGs por meio do promotor ISRE. O SARS-CoV e outros coronavírus encontraram muitas maneiras de inibir a cascata de sinalização utilizando as proteínas estruturais (proteína M e N) ou NSPs (NSP1, NSP3b e NSP6), mostrados como números e letras na figura. A produção de citocinas pró-inflamatórias e IFNs tipo I criam um microambiente imunológico antiviral que controla a síntese viral e a infecção, mas os vírus apresentam várias estratégias para evadir dessas vias de sinalização para neutralizar a resposta imunológica. Legenda: RIG-I, proteína do gene I induzível pelo ácido retinóico; MDA5, Proteína 5 associada à diferenciação do melanoma; M, proteína de membrana; N, Nucleocapsídeo; IFNAR, receptor de IFNα / β; ISGs, genes estimulados por IFN; ISRE, elemento de resposta estimulada por IFN. Adaptado de Shan, 2020.

Embora o sistema imunológico inato do hospedeiro possua elaborados programas de defesa antiviral, os vírus desenvolvem continuamente estratégias para evadir da resposta imune do hospedeiro. É relatado na infecção por SARS-CoV e MERS, que o vírus pode suprimir a resposta do IFN tipo I por mecanismos de evasão como ubiquitinação de sensores citosólicos, inibição da translocação de fatores nucleares ou por meio da diminuição da fosforilação de STAT1 (KINDLER; THIEL; WEBER, 2016). É descrito na infecção por SARS-CoV-2, em estudos *in vitro*, que no início da infeção, há baixa indução das expressões de IFN-β e ISG56, embora aumentassem em momentos tardios. Essa resposta antiviral atrasada pode fornecer uma janela para a replicação do vírus. De fato, grandes quantidades de transcritos virais foram

observadas antes da indução de IFN em células infectadas com SARS-CoV-2. Assim, a falta de resposta antiviral adequada pode ser central para a patogênese da COVID-19 (LEI *et al.*, 2020). Além disso, também é descrito que proteínas do SARS-CoV-2 podem antagonizar a resposta e sinalização do IFN do tipo I (YUEN *et al.*, 2020), por mecanismos como supressão da fosforilação de STAT2, inibição da translocação nuclear de STAT1 entre outros (XIA *et al.*, 2020). No entanto, os mecanismos antagônicos dessas proteínas virais e suas contribuições para o desenvolvimento e transmissão da COVID-19 são mal compreendidos. De maneira geral, os estudos destacam o potencial da deficiência de IFN do tipo I na suscetibilidade do hospedeiro à infecção por SARS-CoV-2 e a progressão para a doença grave (LOPEZ *et al.*, 2020).

A produção de citocinas pró-inflamatórias é de grande importância para o recrutamento de células imunes até o local de infecção e o combate ao vírus. Entretanto, a hiperativação imune sistêmica devido à infecção por SARS-CoV-2 e uma perda de *feedback* negativo no sistema imunológico, pode gerar superprodução de citocinas inflamatórias e causar a tempestade de citocinas (SONG *et al.*, 2020b). As principais citocinas envolvidas são interleucinas (IL), IFN, fator de necrose tumoral (TNF), quimiocinas entre outras. Nesse processo, quimiocinas e citocinas são cada vez mais liberadas para atrair mais células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos, que migram dos vasos sanguíneos para o local da infecção, causando assim a amplificação da resposta inflamatória. A tempestade de citocinas é uma causa da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), que gera resposta inflamatória sistêmica e falência de múltiplos órgãos, levando a baixos níveis de saturação de oxigênio e sendo uma das principais causas de mortalidade na COVID-19 (RAGAB *et al.*, 2020).

Os eventos trombóticos que ocorrem frequentemente na COVID-19 também estão associados ao aumento da gravidade da doença e piores desfechos clínicos. Entre 21% e 69% dos pacientes gravemente enfermos com COVID-19 apresentam tromboembolismo venoso, ultrapassando a ocorrência de 7,5% relatada em pacientes cirúrgicos na UTI. Além disso, COVID-19 tem maior prevalência de trombose do que a gripe (OSUCHOWSKI *et al.*, 2021). As anormalidades microvasculares incluem inflamação endotelial, ruptura das junções intercelulares e formação de microtrombos. Uma coagulopatia associada a COVID-19, juntamente com aumento de citocinas e ativação de plaquetas, endotélio e complemento, ocorre na COVID-19, sendo mais frequente com o agravamento da doença (LOO; SPITTLE; NEWNHAM, 2021). Esse meio pró-inflamatório pode resultar em imunotrombose, no qual neutrófilos e monócitos ativados interagem com as plaquetas e a cascata de coagulação, levando à formação de coágulos intravasculares em vasos pequenos e maiores. As complicações

microtrombóticas podem contribuir para a SRAG e outras disfunções orgânicas (BONAVENTURA *et al.*, 2021).

1.3 Células NK de memória na infecção por SARS-CoV-2

As células NK são células linfóides inatas citotóxicas que atuam na linha de frente contra infecções e tumores e compreendem de 5% a 20% dos PBMCs em humanos (CALIGIURI, 2008). As células NK reconhecem preferencialmente células infectadas por patógenos, células tumorais e células estressadas que expressam ligantes para os receptores ativadores de NK ou células que possuem alteração na expressão de moléculas de MHC de classe I (LANIER, 2008). As células NK podem ser divididas em CD16-CD56^{bright} que são responsáveis pela produção abundante de citocinas (por exemplo, IFN-γ) e possuem função imunorreguladora, e em CD16+CD56^{dim} que desempenham um papel fundamental na citotoxicidade celular natural e mediada por anticorpo (CHAN *et al.*, 2007).

Na infecção aguda por SARS-CoV-2, tanto o número total quanto o subtipo de NK CD16-CD56^{brigh} e CD16+CD56^{dim} diminuem na circulação (MAUCOURANT *et al.*, 2020). Essa queda nos números provavelmente reflete o direcionamento das células NK da circulação para o pulmão, considerando que há relatos de aumento de células NK no lavado bronquioalveolar (BAL). Este *homing* é provavelmente mediado por CXCR3, CXCR6 e CCR5 em células NK e as quimiocinas que estão elevadas no BAL de pacientes com COVID-19 (LIAO *et al.*, 2020).

A hiperativação das células NK, impulsionada por IL-6, IL-6R e IL-18, é uma característica da COVID-19 grave em comparação com a doença leve ou moderada (MAUCOURANT *et al.*, 2020). Foi descrito que a produção de granzima e perforina em células NK na COVID-19 foi aumentada em relação aos controles (AHMADI *et al.*, 2020; JIANG *et al.*, 2020). A produção de granzima em células NK nos pacientes com sintomas leves e graves está aumentada em comparação aos controles e com o estado crítico da COVID-19. É possível, que seja um devido a um mecanismo compensatório e quando atinge um estágio crítico, o status imunológico da célula torna-se comprometido e não mais pode ser compensado (JIANG *et al.*, 2020).

Em contraste, há descrição de produção reduzida de CD107a, IFN-γ, TNF-α e granzima B em células NK de pacientes COVID-19 em relação aos controles (MAZZONI *et al.*, 2020; ZHENG *et al.*, 2020). Também há correlação entre aumento de citocinas como IL-6 e IL-8

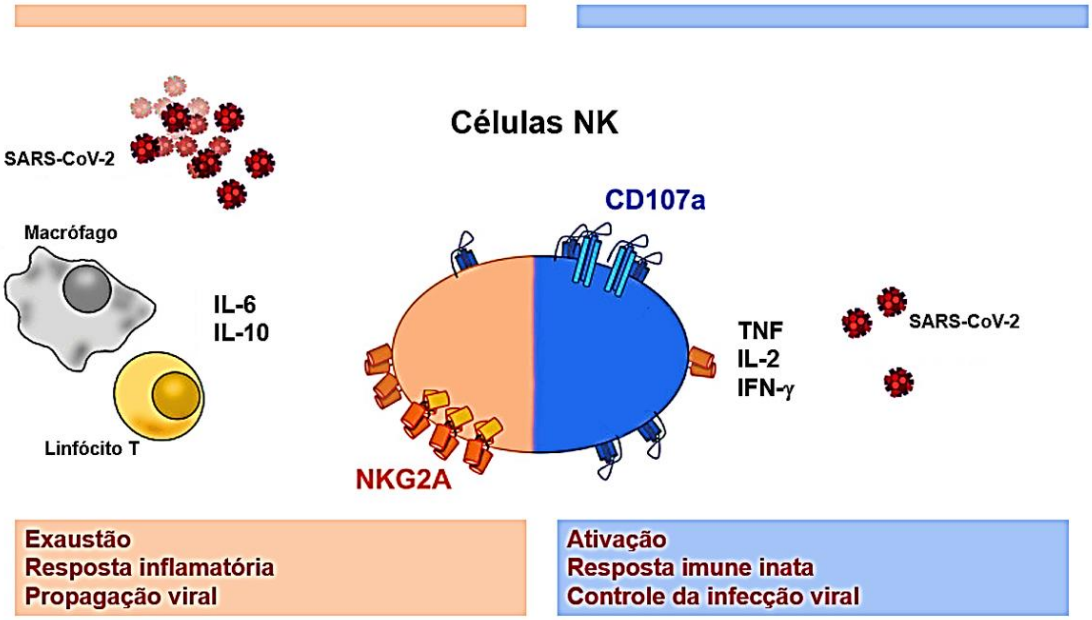

Figura 2. Mecanismo interativo entre as células NK e a infecção pelo SARS-CoV-2. Em caso de resposta imune inata eficaz, as células NK expressam o marcador de ativação CD107a e liberam IFN-ɣ, IL-2 e TNF (lado direito). Em caso de exaustão, as células NK superexpressam o receptor inibitório NKG2A, que suprime a função citotóxica das células NK, favorecendo uma condição pró-inflamatória (lado esquerdo). Adaptado de Masselli, 2020.

séricas com a diminuição de perforina em células NK (BORDONI *et al.*, 2020; GARCÍA, 2020). Além disso, as células NK possuem fenótipo de exaustão, por aumento da expressão de receptor inibidor NKG2A, PD-1 e TIM-3 (MAUCOURANT *et al.*, 2020; ZHENG *et al.*, 2020).

Há descrição de células NK de memória (também chamadas de adaptativas) que exibem uma resposta de memória robusta relatada durante a infecção viral e após estimulação por citocinas pró-inflamatórias (CERWENKA; LANIER, 2016). As características das células NK de memória incluem capacidade aprimorada de produzir IFN-γ, assim como se assemelha com a imunidade adaptativa, devido expansão clonal, respostas imunológicas antitumorais e antivirais mais eficazes e longevidade (DELLA CHIESA *et al.*, 2016).

As células NK de memória são caracterizadas pela coexpressão de NKG2C e CD57. O NKG2C é um receptor ativador de células NK codificado pelo gene *KLRC2*, que se liga ao HLA-E nas células infectadas, levando à ativação das células NK (VIETZEN *et al.*, 2021). O CD57 é marcador de células NK terminalmente diferenciadas e provavelmente foram expandidas clonalmente por infecções (LOPEZ-VERGÈS *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2011).

A infecção por citomegalovírus humano (HCMV) pode causar expansão das células NK de memória. Em humanos, o epítopo UL40 apresentado por HLA-E é reconhecido por NKG2C, gerando a expansão da população de células NK de memória nos indivíduos infectados por CMV (JOUAND *et al.*, 2018). Em camundongos C57BL/6, as células NK expressam o receptor

de lectina tipo C de ativação Ly49H, semelhante ao NKG2C em humanos. Assim, é capaz de ligar diretamente a glicoproteína M157 expressa em células infectadas por CMV murino levando a diferenciação em células NK de memória que persistem por vários meses após a infecção (TONG *et al.*, 2014).

Estima-se que 83% da população global seja soropositiva para CMV, sendo que sua soroprevalência aumenta com a idade (ZUHAIR *et al.*, 2019). A infecção primária é geralmente assintomática em indivíduos imunocompetentes e o vírus gera uma infecção latente, sendo que eventos de reativação viral são controladas pela resposta imunológica. Por outro lado, em indivíduos imunocomprometidos e imunossuprimidos, como em transplante de órgãos sólidos, transplante de células-tronco hematopoiéticas e portadores de HIV/AIDS, a reativação do CMV pode ser responsável por morbidade e mortalidade significativas (GOZZI-SILVA *et al.*, 2021; STERN *et al.*, 2019). A expansão das células NK de memória, também é descrita em resposta a infecções por hantavírus, chikungunya, vírus da hepatite C, influenza e HIV no contexto da infecção subjacente por CMV (GONDOIS-REY *et al.*, 2017; PAUST *et al.*, 2010).

Uma breve exposição *in vitro* de células NK de camundongo com citocinas como IL-12, IL-15 e IL-18 resulta no desenvolvimento de células NK e após reestimulação com IL- 12 e IL-15, mostram uma capacidade sustentada de produzir altos níveis de IFN-γ por pelo menos 4 meses após a transferência adotiva de células NK para camundongos deficientes em RAG2 (KEPPEL; YANG; COOPER, 2013). Células NK de memória induzidas por citocinas também podem ser geradas a partir de células NK humanas (CERWENKA; LANIER, 2016; ROMEE *et al.*, 2012).

Na infecção por COVID-19, embora o número absoluto de células NK esteja diminuído nos pacientes graves, há descrição de aumento da frequência de células NK de memória, mesmo nos indivíduos soronegativos para CMV (MAUCOURANT *et al.*, 2020). Contudo, o percentual e a contagem absoluta de células NK NKG2C+ CD57+ não mostrou correlação com os níveis de IgG anti-CMV, sugerindo que a expansão de células NK adaptativas pode não ser subjacente à reativação do CMV (MAUCOURANT *et al.*, 2020). Além disto, há ausência de proliferação de células T CD8+ específicas para CMV em pacientes com quadro agudo de COVID-19 (SEKINE *et al.*, 2020). Estes achados podem sugerir um envolvimento específico do SARS-CoV-2 com as células NK adaptativas durante a infecção por SARS-CoV-2.

1.4 Função dos linfócitos T CD4+, T CD8+ e linfopenia na infecção por SARS-CoV-2

Uma resposta imune eficaz contra infecções virais é mediada pela ativação de células T citotóxicas que podem eliminar a infecção eliminando as células infectadas, além de participar da ativação de outras células imunes, produção de citocinas e regulação das respostas imunológicas (ACTOR, 2014).

Os linfócitos T são células imunes adaptativas, que se desenvolvem no timo e expressam o receptor de células T (TCR), capaz de reconhecer peptídeos de patógenos apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC). O reconhecimento de antígenos apresentados pelo MHC, juntamente com a ligação de CD28, proteína expressa nas células T que providencia sinais coestimulatórios, promove a ativação e sobrevivência das células T. Além de ser um sinal potente para a produção de várias interleucinas (RUHWALD; PEDERSEN; CLAESSON, 1999).

As células T CD4+ reconhecem peptídeos antigênicos derivados do compartimento fagossomal apresentados por MHC de classe II (ACTOR, 2014; LIEBERMAN, 2003). Um papel fundamental das células T CD4+ é otimizar a resposta de outros linfócitos como na geração de células T CD8+ citotóxicas e de memória e na promoção da produção de anticorpos pelas células B. As células T CD4+ geradas em resposta à infecção viral, possuem um fenótipo do tipo Th1 e produzem grandes quantidades de IFN-γ e expressam T-bet. Este fenótipo depende da exposição a altos níveis de IL-12 e IFNs do tipo I (SWAIN; MCKINSTRY; STRUTT, 2012).

Modelos murinos *in vivo* confirmam que as células T CD4 + citotóxicas (CTL CD4) são um subtipo de células T CD4 com capacidades citolíticas (TAKEUCHI; SAITO, 2017). No contexto de infecções virais, como vírus do Nilo Ocidental (BRIEN; UHRLAUB; NIKOLICH-ŽUGICH, 2008), influenza (BROWN *et al.*, 2012) entre outros, foi mostrado que as células T CD4 + citotóxicas são prontamente detectáveis *ex vivo* e que contribuem na contenção viral mesmo na ausência de células T CD8 + antígeno-específicas. Além disso, as células T CD4 + citotóxicas podem desempenhar um papel protetor nas infecções virais crônicas, promovendo controle da replicação viral na infecção por EBV e CMV. Na infecção por HIV, as células T CD4 + citotóxicas *ex vivo* expressam grandes quantidades de moléculas efetoras citolíticas, como perforina e granzimas (PHETSOUPHANH; PILLAI; ZAUNDERS, 2017).

Os linfócitos T CD8+ reconhecem peptídeos antigênicos no contexto de molécula de MHC de classe I. Quando ativadas, são capazes de atacar diretamente as células e promover apoptose de células malignas ou infectadas com vírus. Para exercer essa função, as células T CD8+ citotóxicas induzem apoptose por liberação de grânulos citolíticos ou por expressão de ligantes de receptores de morte como FasL (CD95) (LIEBERMAN, 2003).

Na COVID-19, há circulação de células T específicas para SARS-CoV-2 7 dias após o início dos sintomas (BOECHAT *et al.*, 2021). Nos convalescentes, há detecção de células T CD4+ e T CD8+ circulantes específicas para o vírus, o que evidencia o potencial de desenvolver memória de células T (GRIFONI *et al.*, 2020). No entanto, a capacidade dessas células de proteger infecções futuras, em especial pelas variantes, ainda precisa ser determinada.

Embora as respostas de células T sejam importantes no combate de infecções virais respiratórias (VASILEIOU *et al.*, 2020), respostas exacerbadas ou disfuncionais podem colaborar com a patogênese da COVID-19.

Na infecção por SARS-CoV-2, o vírus infecta o tecido epitelial respiratório e ativa as células imunes inatas locais para liberar citocinas inflamatórias e quimiocinas. Estas citocinas e quimiocinas então recrutam células imunes inatas e ativam células imunes adaptativas que podem agravar ainda mais o dano pulmonar e propiciar infiltrados linfocíticos (YANG *et al.*, 2021). Níveis de IL-2R, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF-α são mais elevados em pacientes graves em comparação com os não graves (LIU *et al.*, 2020). Neste contexto, no tecido pulmonar de pacientes com a doença grave, é observado intenso infiltrado de células T CD4+ e CD8 +, com forte expressão de granzima B (SONG *et al.*, 2020a).

A ativação de células T está correlacionada com a gravidade da doença em pacientes com COVID-19, pois uma maior frequência de células T CD8+ ativadas (definidas por CD38+ e HLA-DR+) ocorre em pacientes graves por maior tempo após início da doença. As células TCD8+ exibem um papel controverso na COVID-19, onde é observado produção reduzida de CD107a, IFN-γ, IL-2 e granzima B, em comparação com os indivíduos controles (ZHENG *et al.*, 2020); enquanto há descrição de células T CD8+ com produção aumentada de granzima A e B e perforina na COVID-19 (AHMADI *et al.*, 2020).

É conhecido que a linfopenia é uma característica frequente na infecção por SARS-CoV-2 com números reduzidos de linfócitos T CD4+, T CD8+, linfócitos B e células NK, com forte associção com taxa de mortalidade (HUANG *et al.*, 2020; JAFARZADEH *et al.*, 2021). A linfopenia, como uma anormalidade imunológica importante, é observada em até 96,1% dos pacientes com COVID-19 grave (QIN *et al.*, 2020), sendo descrito que a infecção por SARS-CoV-2 tem um impacto preferencial nas células T CD8+ (CHUA *et al.*, 2020; MATHEW *et al.*, 2020). A linfopenia pode causar imunossupressão geral e promover tempestade de citocinas, desempenhando um papel importante na persistência e replicação viral (JAFARZADEH *et al.*, 2021).

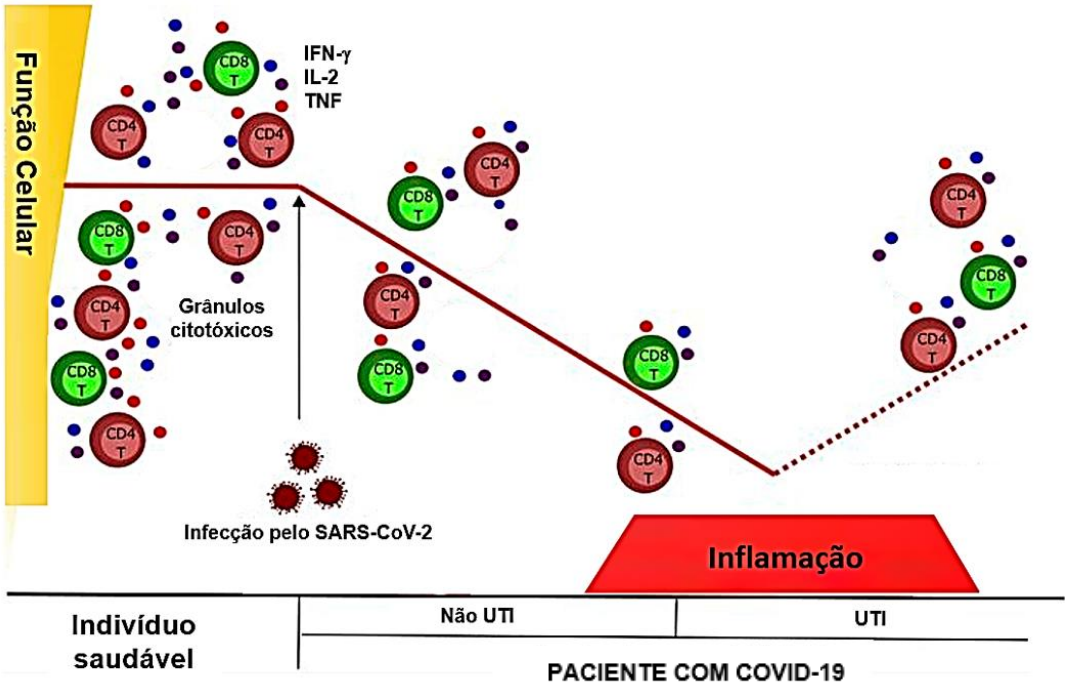

Figura 3. Resposta funcional de linfócitos T na infecção por SARS-CoV-2. A resposta imune antiviral é crucial para alcançar a eliminação do patógeno. Pacientes com COVID-19 apresentam diminuição do número total de células T. Alguns estudos indicam que essas células podem apresentar capacidade de produção de citocinas antivirais reduzida. Além disso, um potencial citotóxico reduzido foi identificado em pacientes com COVID-19, particularmente naqueles que necessitam de cuidados intensivos. Também há correlação entre aumento de citocinas como IL-6 e IL-8 com a diminuição de perforina em células T CD8+ na COVID-19 (BORDONI et al., 2020; GARCÍA, 2020), sugerindo que a inflamação e respostas imunológicas desreguladas favorecem a exaustão funcional dessas células. Após o combate à infecção, é observada recuperação da contagem de linfócitos (LIU et al., 2020).

Diversos mecanismos podem estar associados a ocorrência de linfopenia na infecção por SARS-CoV-2. Umas das hipóteses, baseia-se que as células T são atraídas para locais de infecção, ocorrendo o sequestro de linfócitos em órgãos-alvo, com o objetivo de controlar o vírus havendo consequentemente uma redução de linfócitos na periferia (LI *et al.*, 2004). Além disso, também é relatada redistribuição desses linfócitos após a infecção. Supõe-se que o rápido aumento na contagem sanguínea de linfócitos durante a recuperação não seja devido a linfócitos recém-produzidos pelo timo, mas provavelmente devido à recirculação de linfócitos entre os órgãos e o sangue periférico (LIN *et al.*, 2020). Tanto o MERS-CoV quanto o SARS-CoV infectam diretamente células T primárias humanas e induzem apoptose e linfopenia (CHU *et al.*, 2016). Há descrição que uma pequena proporção de linfócitos podem ser infectados pelo SARS-CoV-2 (XU, H. *et al.*, 2020). Além disso, os linfócitos infectados com coronavírus podem então ser eliminados por células T CD8+ citotóxicas, através da interação FasL-Fas e liberação de perforina e granzima (JAFARZADEH *et al.*, 2021). No entanto, mais pesquisas *in*

vitro e *in vivo* precisam ser realizadas para determinar os mecanismos envolvidos na ocorrência de linfopenia.

A exaustão das células T é um estado de disfunção que surge durante muitas infecções crônicas. É definida por diminuída função efetora, aumento da expressão de receptores inibidores e um estado transcricional distinto das células T efetoras funcionais ou de memória. As células T CD4+ e T CD8+ na infecção por SARS-CoV-2, possuem níveis de expressão mais elevados de PD-1 e TIM-3, particularmente em pacientes com a doença grave (DIAO *et al.*, 2020; MOON, 2020). Após o reconhecimento e ativação do antígeno, as células T regulam positivamente a expressão de PD-1, com o objetivo de prevenir uma resposta excessiva. Portanto, no contexto de uma infecção aguda, PD-1 também pode ser considerado um marcador de ativação, enquanto durante a estimulação crônica, as células T tornam-se progressivamente disfuncionais e exauridas, persistindo a expressão de PD-1 (SCHÖNRICH; RAFTERY, 2019; ZENARRUZABEITIA *et al.*, 2021).

1.5 SARS-CoV-2 e acometimento cutâneo

A COVID-19 está sendo entendida não apenas como uma infecção respiratória, mas uma doença multissistêmica envolvendo uma integração complexa das cascatas imunológicas, inflamatórias e de coagulação (MENTER *et al.*, 2020). Além de sinais clínicos como febre, tosse, fadiga entre outros; as manifestações cutâneas têm sido cada vez mais relatadas em associação com a pandemia da COVID-19. Apesar do aumento da relevância, muito permanece desconhecido a respeito da caracterização, incidência e patogênese desses sintomas dermatológicos (RECALCATI, 2020; SINGH *et al.*, 2021).

As manifestações cutâneas nos casos de COVID-19 encontram sua primeira menção em um estudo inicial da China, que relatou sintomas cutâneos em 0,2% a 1,2% de seus 1.099 casos hospitalizados por COVID-19 (XU *et al.*, 2020). Isso foi seguido por outro estudo na Itália, que encontrou erupções cutâneas em 20,4% de 88 pacientes confirmados com COVID-19 (SODEIFIAN; MUSHTAQ; REZAEI, 2021).

O primeiro grande estudo clínico sobre envolvimento cutâneo em COVID-19 foi descrito por Galvan-Casas em um grupo de 375 para avaliar as lesões cutâneas. As manifestações cutâneas descritas foram áreas acrais de eritema com vesículas ou pústulas (pseudo-chilblain) (19%), outras erupções vesiculares (9%), lesões urticariformes (19%), erupções maculopapulares (47%) e livedo ou necrose (6%) (GALVÁN CASAS *et al.*, 2020).

A presença de partículas virais de SARS-CoV-2 no endotélio e a evidência histológica de dano vascular, levando a inflamação direcionada aos vasos e favorecendo eventos hemorrágicos e isquêmicos, pode constar como mecanismos da patogênese de lesões cutâneas na COVID-19 (FARINAZZO *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2020). É provável que o SARS-CoV- 2 use a ACE2 para entrar nos vasos, uma vez que a ACE2 é amplamente expressa pelas células endoteliais (HAMMING *et al.*, 2004). O acúmulo de angiotensina II contribui para o dano pulmonar, disfunção dos vasos e aumento da permeabilidade vascular. Disfunções vasculares como vasculite, microvasculopatia, microtrombose e neoangiogênese podem levar a erupções cutâneas na COVID-19 (SODEIFIAN; MUSHTAQ; REZAEI, 2021).

É possível que as partículas de COVID-19 presentes no sistema vascular cutâneo possam conduzir à vasculite linfocítica e secreção de citocinas. As partículas virais podem criar complexos imunes com linfócitos cutâneos e células de Langerhans e resultar na secreção de IL-1, INF-γ e TNF-α e recrutamento de eosinófilos, células T citotóxicas CD8 +, células B e NK que induz arterite trombofílica linfocítica (SODEIFIAN; MUSHTAQ; REZAEI, 2021). A resposta imune da infiltração de linfócitos na pele é provavelmente induzida pela infecção por SARS-CoV-2. A presença de células necróticas na epiderme e infiltração de linfócitos na derme, assim como células inflamatórias, incluindo CD3+, linfócitos T CD8 + e macrófagos CD68+ são descritos em autópsias (LIU *et al.*, 2020).

Considerando a presença de infiltrados de linfócitos e a necessidade de maiores caracterizações celulares no tecido cutâneo da infecção pelo SARS-CoV-2, é proposta caracterizar a população NKG2C+ assim como a produção de granzima, para verificar se esta população pode estar associada a patogênese da doença.

A hipótese do trabalho é que a infecção por SARS-CoV-2, em contrapartida com a redução das células NK, promove expansão da população de NK de memória, assim como os linfócitos T e células NK encontram-se com produção alterada de fatores citotóxicos, e redução da expressão de fatores antivirais, associados a gravidade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o perfil fenotípico e funcional de linfócitos T e de células NK em pacientes infectados por SARS-CoV-2, moderados e graves/críticos.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar fenotipicamente as populações de células T CD4+, T CD8+, células NK e subpopulações no sangue periférico;
- Determinar os títulos de anticorpos IgG anti-CMV e correlacionar com a frequência de células NK de memória;
- Avaliar a atividade funcional de linfócitos T e células NK pela produção de fatores citotóxicos;
- Analisar a expressão de PD-1 em linfócitos T e células NK;
- Avaliar a expressão de fatores antivirais em linfócitos T CD8+ por PCR *array*;
- Caracterizar células NK de memória no tecido cutâneo por IHQ;
- Correlacionar dados laboratoriais com a frequência de células T e NK.

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, esses achados destacam o envolvimento de células T e NK na imunopatogênese da COVID-19. Os linfócitos T mostram um fenótipo ativado e de exaustão, de acordo com a gravidade dos sintomas. No perfil citotóxico, foi evidenciado aumento da resposta de células NK e células TCD4+ já na condição *ex vivo*. Os linfócitos T CD8+ mostram um perfil mais disfuncional e exausto na resposta citotóxica, contudo, pro-inflamatório visto o perfil transcricional antiviral. As células NK, apesar de reduzidas na frequência, houve indução de células NK adaptativas pela infecção por SARS-CoV-2, que estão presentes nas autópsias cutâneas. Esses achados podem fornecer um maior entendimento dos fatores associados a gravidade da infecção. Mais estudos são necessários para avaliar o envolvimento dessas células no curso da doença COVID-19.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMOATY, M. M. *et al.* Defining the Innate Immune Responses for SARS-CoV-2-Human Macrophage Interactions. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.741502

ACTOR, J. K. T Lymphocytes: Ringleaders of Adaptive Immune Function. **Introductory Immunology**, n. 1, p. 42–58, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816572-0.00004-8

AHMADI, P.; HARTJEN, P.; KOHSAR, M.; KUMMER, S.; SCHMIEDEL, S.; BOCKMANN, J. H.; FATHI, A.; HUBER, S.; HAAG, F.; SCHULZE ZUR WIESCH, J. Defining the CD39/CD73 Axis in SARS-CoV-2 Infection: The CD73- Phenotype Identifies Polyfunctional Cytotoxic Lymphocytes. **Cells**, v. 9, n. 8, p. 1750, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.3390/cells9081750

AHMED, F.; JO, D. H.; LEE, S. H. Can Natural Killer Cells Be a Principal Player in Anti-SARS-CoV-2 Immunity? **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.586765

ALBERCA, R. W.; OLIVEIRA, L. de M.; BRANCO, A. C. C. C.; PEREIRA, N. Z.; SATO, M. N. Obesity as a risk factor for COVID-19: an overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 13, p. 2262–2276, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1775546

ASTUTI, I.; YSRAFIL. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 14, n. 4, p. 407–412, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.04.020

BACHER, P. *et al.* Low-Avidity CD4+ T Cell Responses to SARS-CoV-2 in Unexposed Individuals and Humans with Severe COVID-19. **Immunity**, v. 53, n. 6, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.11.016

BADER, S. M.; COONEY, J. P.; PELLEGRINI, M.; DOERFLINGER, M. **Programmed cell death: the pathways to severe COVID-19?**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1042/BCJ20210602

BERTRAND, F.; ROCHOTTE, J.; COLACIOS, C.; MONTFORT, A.; ANDRIEU-ABADIE, N.; LEVADE, T.; BENOIST, H.; SÉGUI, B. Targeting TNF alpha as a novel strategy to enhance CD8+ T cell-dependent immune response in melanoma? **OncoImmunology**, v. 5, n. 1, p. e1068495, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1068495

BIZZOTTO, J. *et al.* SARS-CoV-2 Infection Boosts MX1 Antiviral Effector in COVID-19 Patients. **iScience**, v. 23, n. 10, p. 101585, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101585

BOECHAT, J. L.; CHORA, I.; MORAIS, A.; DELGADO, L. The immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 immunopathology – Current perspectives. **Pulmonology**, v. 27, n. 5, p. 423–437, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2021.03.008

BONAVENTURA, A.; VECCHIÉ, A.; DAGNA, L.; MARTINOD, K.; DIXON, D. L.; VAN TASSELL, B. W.; DENTALI, F.; MONTECUCCO, F.; MASSBERG, S.; LEVI, M.;

ABBATE, A. Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, p. 319–329, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41577-021-00536-9

BORDONI, V. *et al.* **An inflammatory profile correlates with decreased frequency of cytotoxic cells in coronavirus disease 2019**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1093/cid/ciaa577

BORGES, G. F.; TEIXEIRA, A. M. B. M.; RAMA, L. M. L. P.; PEDREIRO, S.; SANTOS, A. M. C.; MASSART, A. G. M.; ALVES, F. B.; PAIVA, A. Diferenças em populações de células exterminadoras naturais (Natural Killers-NK) sanguíneas periféricas entre atletas de caiaque e não atletas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 18, n. 5, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1590/s1517-86922012000500004

BOUR-JORDAN, H.; BLUESTONE, J. A. **CD28 function: A balance of costimulatory and regulatory signals**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1023/A:1014256417651

BRIEN, J. D.; UHRLAUB, J. L.; NIKOLICH-ŽUGICH, J. West Nile Virus-Specific CD4 T Cells Exhibit Direct Antiviral Cytokine Secretion and Cytotoxicity and Are Sufficient for Antiviral Protection. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 12, p. 8568–8575, 2008. Disponível em: https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8568

BROWN, D. M.; LEE, S.; GARCIA-HERNANDEZ, M. de la L.; SWAIN, S. L. Multifunctional CD4 Cells Expressing Gamma Interferon and Perforin Mediate Protection against Lethal Influenza Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 86, n. 12, p. 6792–6803, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1128/jvi.07172-11

CALIGIURI, M. A. Human natural killer cells. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 461–469, 2008. Disponível em: https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-077438

CAMPOS, K. R.; SACCHI, C. T.; ABBUD, A.; CATERINO-DE-ARAUJO, A. SARS-CoV-2 variants in severely symptomatic and deceased persons who had been vaccinated against COVID-19 in São Paulo, Brazil. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 45, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.26633/RPSP.2021.126

CARDINEZ, C. *et al.* Gain-of-function IKBKB mutation causes human combined immune deficiency. **Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 11, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1084/jem.20180639

CERWENKA, A.; LANIER, L. L. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 2, p. 112–123, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1038/nri.2015.9

CHAN, A.; HONG, D.-L.; ATZBERGER, A.; KOLLNBERGER, S.; FILER, A. D.; BUCKLEY, C. D.; MCMICHAEL, A.; ENVER, T.; BOWNESS, P. CD56 bright Human NK Cells Differentiate into CD56 dim Cells: Role of Contact with Peripheral Fibroblasts. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 1, p. 89–94, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.89

CHU, H. *et al.* Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Efficiently Infects Human Primary T Lymphocytes and Activates the Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Pathways. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 6, p. 904–914, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1093/infdis/jiv380

CHUA, R. L. *et al.* COVID-19 severity correlates with airway epithelium–immune cell interactions identified by single-cell analysis. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 970–979, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41587-020-0602-4

DE SOUZA, W. M. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of the COVID-19 epidemic in Brazil. **Nature Human Behaviour**, v. 4, p. 856–865, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41562-020-0928-4

DELLA CHIESA, M.; PESCE, S.; MUCCIO, L.; CARLOMAGNO, S.; SIVORI, S.; MORETTA, A.; MARCENARO, E. Features of memory-like and PD-1+ human NK cell subsets. **Frontiers in Immunology**, v. 14, n. 7, p. 351, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00351

DIAO, B. *et al.* Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00827

DYER, O. Covid-19: South Africa's surge in cases deepens alarm over omicron variant. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 375, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1136/bmj.n3013

FARINAZZO, E.; DIANZANI, C.; ZALAUDEK, I.; CONFORTI, C.; GRABBE, S.; GOLDUST, M. Synthesis of the data on covid-19 skin manifestations: Underlying mechanisms and potential outcomes. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 14, p. 991–997, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.2147/CCID.S325552

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis. *In*: **Coronaviruses: Methods and Protocols**. *[S. l.: s. n.]*. v. 1282p. 1–23. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1

FEI, F.; SMITH, J. A.; CAO, L. Clinical laboratory characteristics in patients with suspected COVID-19: One single-institution experience. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 3, p. 1665–1671, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1002/jmv.26527

GALVÁN CASAS, C. *et al.* Classification of the cutaneous manifestations of COVID-19: a rapid prospective nationwide consensus study in Spain with 375 cases. **British Journal of Dermatology**, v. 183, n. 1, p. 71–77, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1111/bjd.19163

GANDHI, R. T.; LYNCH, J. B.; DEL RIO, C. Mild or Moderate Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 18, p. 1757–1766, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1056/nejmcp2009249

GAO, Y.; LI, T.; HAN, M.; LI, X.; WU, D.; XU, Y.; ZHU, Y.; LIU, Y.; WANG, X.; WANG, L. Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 7, p. 791–796, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1002/jmv.25770

GARCÍA, L. F. Immune Response, Inflammation, and the Clinical Spectrum of COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 1441, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01441

GIACOMELLI, A. *et al.* **Self-reported olfactory and taste disorders in patients with severe acute respiratory coronavirus 2 infection: A cross-sectional study**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1093/cid/ciaa330

GONDOIS-REY, F. *et al.* NKG2C+ memory-like NK cells contribute to the control of HIV viremia during primary infection: Optiprim-ANRS 147. **Clinical and Translational Immunology**, v. 6, n. 7, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1038/cti.2017.22

GOZZI-SILVA, S. C. *et al.* Sars-cov-2 infection and cmv dissemination in transplant recipients as a treatment for chagas cardiomyopathy: A case report. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 6, n. 1, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3390/tropicalmed6010022

GRIFONI, A. *et al.* Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with

COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. **Cell**, v. 181, n. 7, p. 1489- 1501.e15, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015

GUAN, W. *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 18, p. 1708–1720, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1056/nejmoa2002032

GULER, A. A.; OZTURK, M. A. COVID-19 in chronic diseases TT - Kronik Hastaliklarda COVID-19. **Gazi Medical Journal**, v. 31, n. 2, p. 266–270, 2020.

GÜNL, F.; MECATE-ZAMBRANO, A.; REHLÄNDER, S.; HINSE, S.; LUDWIG, S.; BRUNOTTE, L. **Shooting at a moving target—effectiveness and emerging challenges for sars-cov-2 vaccine development**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.3390/vaccines9101052

HALLER, O.; STAEHELI, P.; SCHWEMMLE, M.; KOCHS, G. Mx GTPases: Dynamin-like antiviral machines of innate immunity. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 154–163, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.003

HAMMING, I.; TIMENS, W.; BULTHUIS, M. L. C.; LELY, A. T.; NAVIS, G. J.; VAN GOOR, H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **Journal of Pathology**, v. 203, n. 2, p. 631–637, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1002/path.1570

HERMAN-EDELSTEIN, M.; GUETTA, T.; BARNEA, A.; WALDMAN, M.; BEN-DOR, N.; BARAK, Y.; KORNOWSKI, R.; ARAD, M.; HOCHHAUSER, E.; ARAVOT, D. Expression of the SARS-CoV-2 receptorACE2 in human heart is associated with uncontrolled diabetes, obesity, and activation of the renin angiotensin system. **Cardiovascular Diabetology**, v. 20, n. 1, p. 90, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s12933-021-01275-w

HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271–280, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052

HU, B.; GUO, H.; ZHOU, P.; SHI, Z. L. **Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7

HUANG, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 1–10, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5

IVASHKIV, L. B.; DONLIN, L. T. Regulation of type i interferon responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 36–49, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1038/nri3581

JAFARZADEH, A.; JAFARZADEH, S.; NOZARI, P.; MOKHTARI, P.; NEMATI, M. **Lymphopenia an important immunological abnormality in patients with COVID-19: Possible mechanisms**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1111/sji.12967

JIANG, Y.; WEI, X.; GUAN, J.; QIN, S.; WANG, Z.; LU, H.; QIAN, J.; WU, L.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; LIN, X. COVID-19 pneumonia: CD8+ T and NK cells are decreased in number but compensatory increased in cytotoxic potential. **Clinical Immunology**, v. 218, n. 108516, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108516

JOGALEKAR, M. P.; VEERABATHINI, A.; GANGADARAN, P. SARS-CoV-2 variants: A double-edged sword? **Experimental Biology and Medicine**, v. 246, n. 15, p. 1721–1726, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1177/15353702211014146

JOUAND, N. *et al.* HCMV triggers frequent and persistent UL40-specific unconventional HLA-E-restricted CD8 T-cell responses with potential autologous and allogeneic peptide

recognition. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 4, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007041

JUNO, J. A.; BOCKEL, D. van; KENT, S. J.; KELLEHER, A. D.; ZAUNDERS, J. J.; MUNIER, C. M. L. **Cytotoxic CD4 T cells-friend or foe during viral infection?**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00019

KASUGA, Y.; ZHU, B.; JANG, K. J.; YOO, J. S. **Innate immune sensing of coronavirus and viral evasion strategies**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1038/s12276-021-00602-1

KEPPEL, M. P.; YANG, L.; COOPER, M. A. Murine NK Cell Intrinsic Cytokine-Induced Memory-like Responses Are Maintained following Homeostatic Proliferation. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 9, p. 4754–4762, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201742

KINDLER, E.; THIEL, V.; WEBER, F. Interaction of SARS and MERS Coronaviruses with the Antiviral Interferon Response. **Advances in Virus Research**, v. 96, p. 219–243, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.006

KOBAK, D.; BERENS, P. The art of using t-SNE for single-cell transcriptomics. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41467-019-13056-x

KOUL, A.; GEMMILL, D.; LUBNA, N.; MEIER, M.; KRAHN, N.; BOOY, E. P.; STETEFELD, J.; PATEL, T. R.; MCKENNA, S. A. Structural and Hydrodynamic Characterization of Dimeric Human Oligoadenylate Synthetase 2. **Biophysical Journal**, v. 118, n. 11, p. 2726–2740, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.04.025

KUPFERSCHMIDT, K. New mutations raise specter of “immune escape”: SARS-CoV-2 variants found in Brazil and South Africa may evade human antibodies. **Science**, v. 371, n. 6527, p. 329–330, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1126/science.371.6527.329

LAGUNAS-RANGEL, F. A. **Neutrophil-to-lymphocyte ratio and lymphocyte-to-C-reactive protein ratio in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1002/jmv.25819

LANIER, L. L. **Up on the tightrope: Natural killer cell activation and inhibition**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1038/ni1581

LEI, X. *et al.* Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. **Nature Communications**, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41467-020-17665-9

LI, S.; ZHANG, Y.; GUAN, Z.; LI, H.; YE, M.; CHEN, X.; SHEN, J.; ZHOU, Y.; SHI, Z. L.; ZHOU, P.; PENG, K. SARS-CoV-2 triggers inflammatory responses and cell death through caspase-8 activation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41392-020-00334-0

LI, T. *et al.* Significant Changes of Peripheral T Lymphocyte Subsets in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 4, p. 648–651, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1086/381535

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

LIEBERMAN, J. **The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: New weapons in the arsenal**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1038/nri1083

LIN, L.; LU, L.; CAO, W.; LI, T. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2

infection-a review of immune changes in patients with viral pneumonia. **Emerging microbes & infections**, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1746199

LIU, J.; LI, Y.; LIU, L.; HU, X.; WANG, X.; HU, H.; HU, Z.; ZHOU, Y.; WANG, M. **Infection of human sweat glands by SARS-CoV-2**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41421-020-00229-y

LIU, L.; XU, L.; LIN, C. T cell response in patients with COVID-19. **Blood Science**, v. 2, n. 3, p. 76–78, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1097/bs9.0000000000000050

LOO, J.; SPITTLE, D. A.; NEWNHAM, M. **COVID-19, immunothrombosis and venous thromboembolism: Biological mechanisms**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-216243

LOPEZ-VERGÈS, S. *et al.* Expansion of a unique CD57 +NKG2C hi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1073/pnas.1110900108

LOPEZ, L.; SANG, P. C.; TIAN, Y.; SANG, Y. **Dysregulated interferon response underlying severe covid-19**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.3390/v12121433

MARSHALL, J. C. *et al.* **A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30483-7

MARTINS-FILHO, P. R.; BARBERIA, L. G. The unjustified and politicized battle against vaccination of children and adolescents in Brazil. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 8, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.lana.2022.100206

MATHEW, D. *et al.* Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals patient heterogeneity and distinct immunotypes with implications for therapeutic interventions. **bioRxiv : the preprint server for biology**, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1101/2020.05.20.106401

MAUCOURANT, C. *et al.* Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. **Science Immunology**, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.ABD6832

MAZZONI, A. *et al.* Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 9, p. 4694–4703, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1172/JCI138554

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**, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1111/his.14134

MITSUYAMA, Y.; YAMAKAWA, K.; KAYANO, K.; MARUYAMA, M.; WADA, T.; FUJIMI, S. **Prolonged enhancement of cytotoxic T lymphocytes in the post-recovery state of severe COVID-19**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1186/s40560-021-00591-3

MITTAL, A.; MANJUNATH, K.; RANJAN, R. K.; KAUSHIK, S.; KUMAR, S.; VERMA, V. **COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008762

MOON, C. Fighting COVID-19 exhausts T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 5, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41577-020-0304-7

NARASARAJU, T.; TANG, B. M.; HERRMANN, M.; MULLER, S.; CHOW, V. T. K.;

RADIC, M. Neutrophilia and NETopathy as Key Pathologic Drivers of Progressive Lung Impairment in Patients With COVID-19. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00870

NIKOLICH-ZUGICH, J.; KNOX, K. S.; RIOS, C. T.; NATT, B.; BHATTACHARYA, D.; FAIN, M. J. **SARS-CoV-2 and COVID-19 in older adults: what we may expect regarding pathogenesis, immune responses, and outcomes**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11357-020-00186-0

OSUCHOWSKI, M. F. *et al.* **The COVID-19 puzzle: deciphering pathophysiology and phenotypes of a new disease entity**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00218-6

PACHIEGA, J.; AFONSO, A. J. D. S.; SINHORIN, G.; DE ALENCAR, B. T.; DE ARAÚJO, M. D. S. M.; LONGHI, F.; ZANETTI, A. D. S.; ESPINOSA, O. A. Chronic heart diseases as the most prevalent comorbidities among deaths by COVID-19 in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 62, p. 1–5, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S1678-9946202062045

PAL, J.; SHUKLA, B. N.; MAURYA, A. K.; VERMA, H. O. A review on role of fish in human nutrition with special emphasis to essential fatty acid. **International Journal of Fisheries and Acquatic Studies**, v. 6, n. 2, p. 427–430, 2018.

PAUST, S.; GILL, H. S.; WANG, B. Z.; FLYNN, M. P.; MOSEMAN, E. A.; SENMAN, B.; SZCZEPANIK, M.; TELENTI, A.; ASKENASE, P. W.; COMPANS, R. W.; VON ANDRIAN, U. H. Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. **Nature Immunology**, v. 11, n. 12, p. 1127–1135, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1038/ni.1953

PHETSOUPHANH, C.; PILLAI, S.; ZAUNDERS, J. J. **Editorial: Cytotoxic CD4+ T cells in viral infections**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01729

PORTELA SOUSA, C.; BRITES, C. **Immune response in SARS-CoV-2 infection: the role of interferons type I and type III**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.07.011

PRINGLE, K. G.; TADROS, M. A.; CALLISTER, R. J.; LUMBERS, E. R. The expression and localization of the human placental prorenin/renin- angiotensin system throughout pregnancy: Roles in trophoblast invasion and angiogenesis? **Placenta**, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.09.020

QIN, C.; ZHOU, L.; HU, Z.; ZHANG, S.; YANG, S.; TAO, Y.; XIE, C.; MA, K.; SHANG, K.; WANG, W.; TIAN, D.-S. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. **Clinical Infectious Diseases**, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248

RAGAB, D.; SALAH ELDIN, H.; TAEIMAH, M.; KHATTAB, R.; SALEM, R. **The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01446

RECALCATI, S. **Cutaneous manifestations in COVID-19: a first perspective**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1111/jdv.16387

REDDY, M.; EIRIKIS, E.; DAVIS, C.; DAVIS, H. M.; PRABHAKAR, U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: An in vitro model to monitor cellular immune function. **Journal of Immunological Methods**, v. 293, n. 1–2, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.07.006

ROMEE, R.; SCHNEIDER, S. E.; LEONG, J. W.; CHASE, J. M.; KEPPEL, C. R.; SULLIVAN, R. P.; COOPER, M. A.; FEHNIGER, T. A. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. **Blood**, v. 120, n. 24, p. 4751–4760, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-419283

RUHWALD, M.; PEDERSEN, A. E.; CLAESSON, M. H. MHC class I cross-talk with CD2 and CD28 induces specific intracellular signalling and leads to growth retardation and apoptosis via a p56(lck)-dependent mechanism. **Experimental and Clinical Immunogenetics**, v. 16, n. 4, p. 199–211, 1999. Disponível em: https://doi.org/10.1159/000019112

SANDOVAL-MONTES, C.; SANTOS-ARGUMEDO, L. CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 4, 2005. Disponível em: https://doi.org/10.1189/jlb.0404262

SAPKAL, G. *et al.* Development of indigenous IgG ELISA for the detection of anti-SARS-CoV-2 IgG. **Indian Journal of Medical Research**, v. 151, n. 5, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2232_20

SCHÖNRICH, G.; RAFTERY, M. J. **The PD-1/PD-L1 axis and virus infections: A delicate balance**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00207

SEKINE, T. *et al.* Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. **Cell**, v. 183, n. 1, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.017

SHANG, J.; WAN, Y.; LUO, C.; YE, G.; GENG, Q.; AUERBACH, A.; LI, F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 21, p. 11727–11734, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1073/pnas.2003138117

SINGH, H.; KAUR, H.; SINGH, K.; SEN, C. K. **Cutaneous manifestations of COVID-19: A systematic review**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1089/wound.2020.1309

SODEIFIAN, F.; MUSHTAQ, S.; REZAEI, N. **Cutaneous Manifestation of COVID-19: What Have we Learned an Year Into the Pandemic?**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ad.2021.08.005

SONG, J. W. *et al.* Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020 a. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41467-020-17240-2

SONG, P.; LI, W.; XIE, J.; HOU, Y.; YOU, C. **Cytokine storm induced by SARS-CoV-2**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.017

STARSKA, K.; GŁOWACKA, E.; KULIG, A.; LEWY-TRENDA, I.; BRYŚ, M.; LEWKOWICZ, P. The role of tumor cells in the modification of T lymphocytes activity - The expression of the early CD69+, CD71+ and the late CD25+, CD26+, HLA/DR+ activation markers on TCD4+ and CD8+ cells in squamous cell laryngeal carcinoma. Part I. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 49, n. 4, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.5603/FHC.2011.0081

STERN, L.; WITHERS, B.; AVDIC, S.; GOTTLIEB, D.; ABENDROTH, A.; BLYTH, E.; SLOBEDMAN, B. **Human cytomegalovirus latency and reactivation in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01186

SUN, J. C.; LOPEZ-VERGES, S.; KIM, C. C.; DERISI, J. L.; LANIER, L. L. NK Cells and Immune "Memory". **The Journal of Immunology**, 2011. Disponível em:

https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003035

SWAIN, S. L.; MCKINSTRY, K. K.; STRUTT, T. M. **Expanding roles for CD4 + T cells in immunity to viruses**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1038/nri3152

TAKEUCHI, A.; SAITO, T. **CD4 CTL, a cytotoxic subset of CD4+ T cells, their differentiation and function**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00194

TAN, C.; HUANG, Y.; SHI, F.; TAN, K.; MA, Q.; CHEN, Y.; JIANG, X.; LI, X. C-reactive protein correlates with computed tomographic findings and predicts severe COVID-19 early. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 7, p. 856–862, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1002/jmv.25871

TINCATI, C.; BELLISTRÌ, G. M.; ANCONA, G.; MERLINI, E.; D'ARMINIO MONFORTE, A.; MARCHETTI, G. Role of in vitro stimulation with lipopolysaccharide on T-cell activation in HIV-infected antiretroviral-treated patients. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1155/2012/935425

TONG, L.; ASSENMACHER, M.; ZÄNKER, K. S.; JÄHN, P. Virus-specific peptide dependent NK cell cytotoxicity. **Inflammation and Allergy - Drug Targets**, v. 13, n. 2, p. 128–133, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.2174/1871528113666140211100616

TRACEY, K. J.; CERAMI, A. **Tumor necrosis factor, other cytokines and disease**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1146/annurev.cb.09.110193.001533

VASILEIOU, S.; TURNEY, A. M.; KUVALEKAR, M.; MUKHI, S. S.; WATANABE, A.; LULLA, P.; RAMOS, C. A.; NAIK, S.; VERA, J. F.; TZANNOU, I.; LEEN, A. M. Rapid generation of multivirus-specific T lymphocytes for the prevention and treatment of respiratory viral infections. **Haematologica**, v. 105, n. 1, p. 235–243, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.3324/haematol.2018.206896

VIETZEN, H.; ZOUFALY, A.; TRAUGOTT, M.; ABERLE, J.; ABERLE, S. W.; PUCHHAMMER-STÖCKL, E. Deletion of the NKG2C receptor encoding KLRC2 gene and HLA-E variants are risk factors for severe COVID-19. **Genetics in Medicine**, v. 23, n. 5, p. 963–967, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41436-020-01077-7

VIGÓN, L. *et al.* Impaired Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in a Spanish Cohort of Patients With COVID-19 Admitted to the ICU. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.742631

WANG, C. *et al.* CD8+NKT-like cells regulate the immune response by killing antigen-bearing DCs. **Scientific Reports**, v. 5, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1038/srep14124

WANG, X.; XU, W.; HU, G.; XIA, S.; SUN, Z.; LIU, Z.; XIE, Y.; ZHANG, R.; JIANG, S.; LU, L. **SARS-CoV-2 infects T lymphocytes through its spike protein-mediated membrane fusion**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41423-020-0424-9

WHO. **Tracking SARS-CoV-2 variants**. *[s. l.]*, 2021. Disponível em: https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/. Acesso em: 16 ago. 2021.

WHO. **WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard**. *[s. l.]*, 2022. Disponível em: https://covid19.who.int/. Acesso em: 16 ago. 2021.

WISE, J. Covid-19: New coronavirus variant is identified in UK. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 371, p. 1–2, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1136/bmj.m4857

WU, Z.; MCGOOGAN, J. M. **Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention**. *[S. l.: s. n.]*

Disponível em: https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648

XIA, H.; CAO, Z.; XIE, X.; ZHANG, X.; CHEN, J. Y. C.; WANG, H.; MENACHERY, V. D.; RAJSBAUM, R.; SHI, P. Y. Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. **Cell Reports**, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108234

XIONG, Y. *et al.* Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 761–770, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1747363

XU, X. W. *et al.* Clinical findings in a group of patients infected with the 2019 novel coronavirus (SARS-Cov-2) outside of Wuhan, China: Retrospective case series. **The BMJ**, v. 368, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1136/bmj.m606

YANG, C. A.; HUANG, Y. L.; CHIANG, B. L. Innate immune response analysis in COVID-19 and kawasaki disease reveals MIS-C predictors. **Journal of the Formosan Medical Association**, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jfma.2021.06.009

YANG, L.; XIE, X.; TU, Z.; FU, J.; XU, D.; ZHOU, Y. **The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41392-021-00679-0

YUEN, C. K. *et al.* SARS-CoV-2 nsp13, nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 1418–1428, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1780953

ZENARRUZABEITIA, O.; ASTARLOA-PANDO, G.; TERRÉN, I.; ORRANTIA, A.; PÉREZ-GARAY, R.; SEIJAS-BETOLAZA, I.; NIETO-ARANA, J.; IMAZ-AYO, N.; PÉREZ-FERNÁNDEZ, S.; ARANA-ARRI, E.; BORREGO, F. T Cell Activation, Highly Armed Cytotoxic Cells and a Shift in Monocytes CD300 Receptors Expression Is Characteristic of Patients With Severe COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.655934

ZHENG, M.; GAO, Y.; WANG, G.; SONG, G.; LIU, S.; SUN, D.; XU, Y.; TIAN, Z. **Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2

ZIMMER, C. L. *et al.* NK cells are activated and primed for skin-homing during acute dengue virus infection in humans. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41467-019-11878-3

ZUHAIR, M.; SMIT, G. S. A.; WALLIS, G.; JABBAR, F.; SMITH, C.; DEVLEESSCHAUWER, B.; GRIFFITHS, P. **Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis**. *[S. l.: s. n.]* Disponível em: https://doi.org/10.1002/rmv.2034

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido indivíduos controles

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - Avaliação de fatores preditivos e biomarcadores na infecção por COVID 19: polimorfismos genéticos e sinalização de vias inflamatórias
Pesquisador principal – Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte

Departamento/Instituto - Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP

Convite à participação – Convidamos o(a) Sr.(a) para participar desta pesquisa, que tem como objetivo estudar e entender melhor a infecção por COVID-19, como controle saudável, sem infecção pelo COVID-19.

Justificativa e objetivos do estudo - O surto em curso do COVID-19 representa uma grande ameaça à saúde pública e vem causando uma mortalidade devastadora. A caracterização de marcadores imunológicos da doença, pode oferecer, através de seus resultados, futuras perspectivas para novos tratamentos terapêuticos, e contribuição ao entendimento e enfrentamento da infecção por COVID-19.

Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados – O participante selecionado para participar do estudo deverá concordar com a sua participação. Serão coletados exames de sangue, sem nenhum custo para o participante. O participante pode em qualquer momento não concordar em fazer os exames que serão pedidos.

Explicitação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa – Será coletada amostra de sangue de uma veia. A picada da agulha da coleta, pode levar a um leve desconforto que passará em poucos minutos. Durante a coleta de sangue, pode haver uma dor mínima, parecida com uma picada de formiga, e pode ficar uma mancha roxa no local que desaparece em poucos dias. Algumas pessoas podem às vezes sentir tonturas ou até desmaio após a coleta de sangue, e mais raramente pode haver infecção no local que entrou a agulha na pele.

Benefícios esperados para o participante – O indivíduo que participar do estudo poderá beneficiar-se ou não do estudo. Pode ser que sejam obtidas respostas para algumas dúvidas que existem sobre a infecção por COVID-19 ou simplesmente descobrirmos algum dado novo que possa contribuir com futuras pesquisas sobre este assunto.

Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa – Se houver a necessidade de mais algum exame, o indivíduo que concordar com o estudo poderá ser ainda convocado via telefone ou carta para vir a uma consulta, mesmo antes do seu retorno e terá toda a informação e assistência

que precisar. Todos os participantes terão acesso aos resultados de seus exames no momento em que quiserem e com as explicações necessárias para seu entendimento.

O indivíduo não é obrigado a realizar estes exames específicos se não quiser, o que não implica que sofrerá alguma penalidade. Mesmo quem não concordar em participar do estudo, terá todos os benefícios de atendimento e de informações sobre novas descobertas com relação à doença, do que qualquer outro paciente que participar do estudo. A qualquer momento, o indivíduo tem de plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma, de sigilo e privacidade.

Garantia de que o participante receberá uma via do termo de consentimento – O participante receberá uma via do termo de consentimento rubricada pelo pesquisador.

Explicitação das garantias de ressarcimento por despesas decorrentes da pesquisa e explicitação da garantia de indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa - Caso aconteça algo que prejudique a sua saúde e que esteja relacionado com sua participação no estudo, é garantido pela lei brasileira que você receba indenização de acordo com o dano ou prejuízo causado durante a pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é o Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 3°. andar, IMT II CEP: 05403-000, Telefone(s) (11) 3061-7499/7194. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549, das 7 às 16h de segunda a sexta feira ou por e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Fui suficientemente informado a respeito do estudo Avaliação de fatores preditivos e biomarcadores na infecção por COVID-19". Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável (Prof. Dr Alberto José da Silva Duarte) ou pessoa (s) por ele delegada (s) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

---------- Data____/____/_____

Assinatura do participante /representante legal

Nome do participante/representante legal

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pacientes COVID-19

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - Avaliação de fatores preditivos e biomarcadores na infecção por COVID 19: polimorfismos genéticos e sinalização de vias inflamatórias
Pesquisador principal - Prof Dr Alberto José da Silva Duarte

Departamento/Instituto - Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP

Convite à participação – Convidamos o(a) Sr.(a) para participar desta pesquisa, que tem como objetivo estudar e entender melhor a infecção por COVID-19

Justificativa e objetivos do estudo - O surto em curso do COVID-19 representa uma grande ameaça à saúde pública e vem causando uma mortalidade devastadora. A caracterização de marcadores imunológicos da doença, e oferecer, através de seus resultados, futuras perspectivas para novos tratamentos terapêuticos, e contribuição ao entendimento e enfrenta*mento* da infecção por COVID-19.

Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados – O paciente selecionado para participar do estudo deverá concordar com a sua participação. Serão coletados exames de sangue sem nenhum custo para o paciente, que pode aproveitar o dia das consultas para colher os exames. O paciente pode em qualquer momento não concordar em fazer os exames que serão pedidos.

Explicitação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa – Será coletada amostra de sangue de uma veia. A picada da agulha da coleta, pode levar a um leve desconforto que passará em poucos minutos. Durante a coleta de sangue, pode haver uma dor mínima, parecida com uma picada de formiga, e pode ficar uma mancha roxa no local que desaparece em poucos dias. Algumas pessoas podem às vezes sentir tonturas ou até desmaio após a coleta de sangue, e mais raramente pode haver infecção no local que entrou a agulha na pele.

Benefícios esperados para o participante – O paciente que participar do estudo poderá beneficiar-se ou não do estudo. Pode ser que sejam obtidas respostas para algumas dúvidas que existem sobre a infecção por COVID-19 ou simplesmente descobrirmos algum dado novo que possa contribuir com futuras pesquisas sobre este assunto.

Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa – Os pacientes continuarão a ser acompanhados como sempre no HCFMUSP. Se houver a necessidade de mais algum exame, o paciente que concordar com o estudo poderá ser ainda convocado via telefone ou carta para vir a uma consulta, mesmo antes do seu retorno e terá toda a informação e assistência que precisar. Todos os pacientes terão

acesso aos resultados de seus exames no momento em que quiserem e com as explicações necessárias para seu entendimento. O paciente não é obrigado a realizar estes exames específicos se não quiser, o que não implica que sofrerá alguma penalidade. Mesmo o paciente que não concordar em participar do estudo, terá todos os benefícios de atendimento e de informações sobre novas descobertas com relação à doença, do que qualquer outro paciente que participar do estudo. A qualquer momento, o indivíduo tem de plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma, de sigilo e privacidade. O participante receberá uma via do termo de consentimento rubricada pelo pesquisador.

Explicitação das garantias de ressarcimento por despesas decorrentes da pesquisa e explicitação da garantia de indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa - Caso aconteça algo que prejudique a sua saúde e que esteja relacionado com sua participação no estudo, é garantido pela lei brasileira que você receba indenização de acordo com o dano ou prejuízo causado durante a pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é o Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 3°. andar, IMT II CEP: 05403-000, Telefone(s) (11) 3061-7499/7194. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549, das 7 às 16h de segunda a sexta feira ou por e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Fui suficientemente informado a respeito do estudo Avaliação de fatores preditivos e biomarcadores na infecção por COVID-19".

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável (Prof. Dr Alberto José da Silva Duarte) ou pessoa (s) por ele delegada (s) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

---------- Data____/____/_____

Assinatura do participante /representante legal

Nome do participante/representante legal

---------- Data ____/____/_____

Nome resumido do projeto: Avaliação de fatores preditivos e biomarcadores na infecção por COVID 19: polimorfismos genéticos e sinalização de vias inflamatórias	**Confidencial**
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de 16 de abril de 2020	
Nome do pesquisador: Alberto José da Silva Duarte Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP	Rubrica do Participante da Pesquisa/Representante legal — Rubrica do Investigador Responsável

Atualizado-dezembro 2019

APÊNCIDE C – Aprovação do Comitê em Ética e Pesquisa

USP - INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - ICB/USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de fatores preditivos e biomarcadores na infecção por COVID 19: polimorfismos genéticos e sinalização de vias inflamatórias

Pesquisador: Alberto José da Silva Duarte

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 30800520.7.3003.5467

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.704.690

Apresentação do Projeto:

trata-se de resposta de pendência emitida por este CEP

Objetivo da Pesquisa:

não se aplica a esta avaliação

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

não se aplica a esta avaliação

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Foram anexadas, conforme solicitado por este CEP os comprovantes de matricula das alunas Anna Julia Pietrobon e Sarah Cristina Gozzi e Silva que conferem o vínculo do Projeto supracitado ao ICB

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

descrito acima

Recomendações:

aprovar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7733 **E-mail:** cep@icb.usp.br

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do relator e parecer consubstanciado já constante no processo e dada a explicação para pendência dada pelo pesquisador, o Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar o projeto. Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o ítem II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Com relação às amostras biológicas, em não havendo ainda um biorrepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante no "site" do ICB. Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à plataforma Brasil quando do encerramento deste.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1746405.pdf	09/05/2021 20:57:32		Aceito
Outros	Carta_Resposta.pdf	09/05/2021 20:55:53	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Outros	Ficha_Aluno_SCGS.pdf	09/05/2021 20:55:32	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Outros	Declaracao_matricula_SCGS.pdf	09/05/2021 20:55:09	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Outros	Ficha_Aluno_AJP.pdf	09/05/2021 20:54:38	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Outros	Declaracao_matricula_AJP.pdf	09/05/2021 20:54:15	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Outros	FORMULARIO_PARA_SUBMISSAO_DE_EMENDAS_E_BROCHURAS_Milena.	15/04/2021 15:54:06	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Outros	Adendo_projeto_Milena.pdf	15/04/2021 15:53:26	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Outros	Subprojeto_Milena.pdf	15/04/2021 15:52:39	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Outros	Subprojeto_SCGS.pdf	15/04/2021 15:52:01	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Outros	FORMULARIO_PARA_SUBMISSAO_DE_EMENDAS_E_BROCHURAS_SCGS.	15/04/2021 15:51:23	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Outros	Adendo_projeto_SCGS.pdf	15/04/2021 15:50:31	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Outros	Subprojeto_AJP.pdf	15/04/2021 15:49:49	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Outros	FORMULARIO_PARA_SUBMISSAO_DE_EMENDAS_E_BROCHURAS_AJP.pd	15/04/2021 15:45:58	Alberto José da Silva Duarte	Aceito

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7733 **E-mail:** cep@icb.usp.br

Outros	Adendo_projeto_AJP.pdf	15/04/2021 15:44:48	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Covid19_HCor_v2.pdf	11/09/2020 18:41:16	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Outros	ProjetoCovid19HCor.pdf	24/07/2020 11:59:16	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Outros	declaracao_sempatrocinio.pdf	17/04/2020 08:19:51	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_COVID_controle.doc	17/04/2020 08:16:08	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_COVID.doc	17/04/2020 08:15:57	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_COVID_LIM56_CapPesq.docx	17/04/2020 08:15:08	Alberto José da Silva Duarte	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 11 de Maio de 2021

Assinado por:
Camila Squarzoni Dale
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7733 **E-mail:** cep@icb.usp.br

APÊNDICE D – Lista de artigos publicados

GOZZI-SILVA, S.C.; BENARD, G.; ALBERCA, R.W.; YENDO, T.M.; TEIXEIRA, F.M.E.; OLIVEIRA, L.d.M.; BESERRA, D.R.; PIETROBON, A.J.; OLIVEIRA, E.A.d.; BRANCO, A.C.C.C.; ANDRADE, M.M.d.S.; FERNANDES, I.G.; PEREIRA, N.Z.; RAMOS, Y.Á.L.; LIMA, J.C.; Provenci, B.; MANGINI, S.; DUARTE, A.J.d.S.; SATO, M.N. SARS-CoV-2 Infection and CMV Dissemination in Transplant Recipients as a Treatment for Chagas Cardiomyopathy: A Case Report. **Trop. Med. Infect**. *Dis.* 2021, *6*, 22. doi.org/10.3390/tropicalmed6010022

GOZZI-SILVA, S.C.; TEIXEIRA, F.M.E.; DUARTE, A.J.d.S.; SATO, M.N; OLIVEIRA, L.d.M. Immunomodulatory role of nutrients: How can pulmonary dysfunctions improve? **Front. Nutr**, 2021. doi: 10.3389/fnut.2021.674258

ALBERCA, RICARDO WESLEY ; PEREIRA, NÁTALLI ZANETE ; OLIVEIRA, LUANDA MARA DA SILVA ; GOZZI-SILVA, SARAH CRISTINA ; SATO, MARIA NOTOMI . Pregnancy, Viral Infection, and COVID-19. **Frontiers in Immunology,** v. 11, p. 1, 2020. doi.org/10.3389/fimmu.2020.01672