

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Marina Carvalho Rassbach

**IMPACTO DO ALELO ϵ 4 DE APOE NA PROGRESSÃO E GRAVIDADE DA
COVID-19 E OUTRAS SÍNDROMES GRIPAIS RESPIRATÓRIAS**

Belo Horizonte

2025

Marina Carvalho-Rassbach

**IMPACTO DO ALELO $\epsilon 4$ DE APO E NA PROGRESSÃO E GRAVIDADE DA
COVID-19 E OUTRAS SÍNDROMES GRIPAIS RESPIRATÓRIAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Imunologia

Orientadora: Profa. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite

Belo Horizonte

2025

043

Rassbach, Marina Carvalho.

Impacto do alelo $\epsilon 4$ de Apoe na progressão e gravidade da Covid-19 e outras síndromes gripais respiratórias [manuscrito] / Marina Carvalho Rassbach. – 2025.

85 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Apolipoproteínas E. 3. Infecções por Coronavirus. 4. Inflamação. 5. Citocinas. 6. Obesidade. I. Alvarez-Leite, Jacqueline Isaura. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE MARINA CARVALHO RASSBACH. Aos dezenove dias do mês de março de 2025 às 09:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Google Meet”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Impacto do Alelo $\epsilon 4$ de Apoe na Progressão e Gravidade da Covid-19 e Outras Síndromes Gripais Respiratórias", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez Leite, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Reinaldo Barreto Oriá (Universidade Federal do Ceará), aprovada; Dra. Carla de Oliveira Barbosa Rosa (Universidade Federal de Viçosa), aprovada; Dra. Luciana Bastos Rodrigues (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Helton da Costa Santiago (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 19 de março de 2025.

Documento assinado digitalmente

gov.br REINALDO BARRETO ORIA
 Data: 24/03/2025 11:44:55-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Reinaldo Barreto Oriá (UFC)

Documento assinado digitalmente

gov.br CARLA DE OLIVEIRA BARBOSA ROSA
 Data: 24/03/2025 13:32:59-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Carla de Oliveira Barbosa Rosa (UFV)

Documento assinado digitalmente

gov.br LUCIANA BASTOS RODRIGUES
 Data: 22/03/2025 12:01:08-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Luciana Bastos Rodrigues (UFMG)

Documento assinado digitalmente

gov.br HELTON DA COSTA SANTIAGO
 Data: 22/03/2025 12:50:58-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Helton da Costa Santiago (UFMG)

Documento assinado digitalmente

gov.br JACQUELINE ISAURA ALVAREZ LEITE
 Data: 21/03/2025 15:34:51-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (UFMG)

À Jacqueline Alvarez-Leite ,
minha estrela guia da ciência

Agradecimentos

Agradeço primeiro a Deus por ter me dado forças para dedicar tanto tempo, esforço, abdicar à vida pessoal e resiliência a essa árdua tarefa de me tornar uma Doutora em Bioquímica e Imunologia. Agradeço também a todos que de alguma forma contribuíram com essa jornada, desde os pacientes por se voluntariarem pela ciência, àqueles que ajudaram na coleta de dados, aos que me ensinaram a pipetagem e toda a parte da base de laboratório, aos que tiveram paciência comigo em casa: esposo, filhos, mãe, pai, amigos. Agradeço em especial à professora Ana Caetano Faria, à Larissa Oliveira Assis e ao Lucas Haniel Ventura por terem compartilhado o material e banco de dados que tornou possível a nossa pesquisa. Agradeço à CAPES pela bolsa de doutorado. Agradeço a todos que acreditaram que seria possível vencer essa etapa e principalmente à Jacque por todo o apoio e carinho ao longo desses 4 anos.

"O que sabemos é uma gota d'água; o que ignoramos é o oceano."
(Isaac Newton)

RESUMO

Sugere-se que a apolipoproteína E (ApoE), especialmente a isoforma ApoE4, influencia a gravidade das infecções virais respiratórias; no entanto, essa associação ainda não está clara.

Hipótese: A presença do alelo $\epsilon 4$ impacta o desenvolvimento de síndromes semelhantes à gripe.

Objetivo: Este estudo teve como objetivo avaliar o impacto do alelo $\epsilon 4$ de Apo E na gravidade e duração de síndromes semelhantes à gripe, incluindo COVID-19.

Metodologia: Este estudo de coorte compreendeu 280 indivíduos apresentando sintomas semelhantes aos da gripe, todos genotipados para isoformas de ApoE. Dados foram coletados sobre curso clínico, comorbidades, estado nutricional, marcadores bioquímicos e inflamatórios, resultados de RT-PCR do *SARS-CoV-2* e gravidade da doença de acordo com os parâmetros de gravidade da OMS. Os indivíduos foram analisados como um todo e dentro de subgrupos com base no teste positivo (grupo COVID-19) ou negativo (grupo síndrome semelhante à gripe) para *SARS-CoV-2*.

Resultados: A frequência do alelo $\epsilon 4$ foi similar, considerando toda a população e os subgrupos COVID-19 e síndrome semelhante à gripe (17 e 18%, respectivamente). Não foram observadas diferenças em todos os parâmetros analisados (sexo, faixa etária, cor da pele autorrelatada, IMC, número de comorbidades, perfil bioquímico e perfil de citocinas, estado de vacinação e colesterol LDL, HDL, exceto colesterol total) no grupo semelhante à gripe ao comparar portadores e não portadores do alelo $\epsilon 4$. No grupo COVID-19, o alelo $\epsilon 4$ não se correlacionou com a gravidade da doença (os resultados foram hospitalização sem ventilação invasiva ou ventilação mecânica ou ventilação mais suporte de órgãos ou morte), duração, comorbidades ou biomarcadores inflamatórios. Embora a distribuição de gênero tenha sido igual na população geral de COVID-19, o sexo masculino se correlacionou fortemente com a gravidade da COVID-19. A análise multivariada mostrou que indivíduos mais velhos, do sexo masculino, com IMC mais alto e a presença de comorbidades estavam associados a maiores chances de desenvolver doença moderada e grave. A IL-4 foi o único fator que reduziu o risco de COVID-19 grave.

Conclusão: A presença de um alelo $\epsilon 4$ de Apo E não mostrou associação com a duração e gravidade de síndromes semelhantes à gripe, incluindo COVID-19. No entanto, indivíduos positivos para *SARS-CoV-2* tendem a ser homens mais velhos, com IMC mais alto, com sobrepeso e obesidade. Em relação à gravidade da COVID-19, o IMC, o sexo masculino e o número de comorbidades associadas foram os fatores que aumentaram as chances de desenvolver uma forma mais grave de COVID-19 e a IL-4 foi o único fator que reduziu as chances.

Palavras-chave: Apolipoproteína E, COVID-19, infecção viral, inflamação, citocinas, obesidade

ABSTRACT

Apolipoprotein E (ApoE), especially the ApoE4 isoform, is suggested to influence the severity of respiratory viral infections; however, this association is still unclear.

Hypothesis: The presence of allele $\epsilon 4$ impacts the development of Flu-like syndromes.

Aim: This study aimed to evaluate the impact of the $\epsilon 4$ allele on the severity and duration of Flu-like syndromes, including COVID-19.

Methodology: This study comprised 280 individuals presenting flu-like symptoms, all genotyped for ApoE isoforms. Data were collected on clinical course, comorbidities, nutritional status, biochemical and inflammatory markers, *SARS-CoV-2* RT-PCR results, and disease severity (mild, moderate/severe) according to the World Health Organization (WHO) criteria. The individuals were analyzed as a whole and within subgroups based on the *SARS-CoV-2* positive (COVID-19 group) or negative (flu-like syndrome group) test.

Results: The frequency of the $\epsilon 4$ allele was similar across the whole population and in both the COVID-19 and Flu-like syndrome subgroups (17 and 18%, respectively). No differences were seen in sex, age range, self-reported skin color, BMI, number of comorbidities, vaccination status, biochemical, cytokine, and lipid profiles (except for total cholesterol) in the flu-like group when $\epsilon 4$ allele carriers and non-carriers were compared. In the COVID-19 group, the $\epsilon 4$ allele did not correlate with disease severity or duration, number of comorbidities, or inflammatory biomarkers.

While gender distribution was equal in the overall COVID-19 population, male gender strongly correlated with COVID-19 severity. Multivariate analysis showed that older individuals, male gender, higher BMI, and the presence of comorbidities were linked to increased chances of

developing moderate and severe disease. IL-4 was the only factor found to reduce the risk of severe COVID-19.

Conclusion: The presence of one $\epsilon 4$ allele showed no association with the duration and severity of Flu-like syndromes, including COVID-19. Nonetheless, *SARS-CoV-2*-positive individuals tend to be older men with a higher BMI and a tendency to be overweight and obese. Regarding COVID-19 severity, BMI, male sex, and the number of associated comorbidities were the factors that increased the chance of developing a more severe form of COVID-19, while IL-4 decreased the chance.

Keywords: Apolipoprotein E, COVID-19, viral infection, inflammation, cytokines, obesity

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	Pág.11
Apo E	Pág.11
Apo E, viroses e síndromes gripais	Pág.14
COVID-19	Pág. 15
Mecanismos de gravidade	Pág. 17
Citocinas e COVID-19	Pág.19
Classificação da gravidade da COVID-19	Pág.22
Apo E e COVID-19	Pág.23
Mecanismos pelos quais a Apo E 4 poderia agravar a COVID-19	Pág.24
Colesterol Intracelular	Pág. 24
Inflamassoma	Pág. 25
Oxidação de LDL	Pág. 26
Apo E, alterações vasculares cerebrais e atividade de ECA-2	Pág. 27
COVID-19 e outros fatores de risco	Pág. 27
JUSTIFICATIVA	Pág. 28
OBJETIVOS	Pág. 29
MÉTODOS	Pág. 29
Seleção das amostras	Pág. 29
Comitê de ética e pesquisa	Pág. 30
Critérios de Inclusão e Exclusão	Pág. 30
Coleta do Coágulo	Pág. 31
Teste RT-PCR	Pág. 32

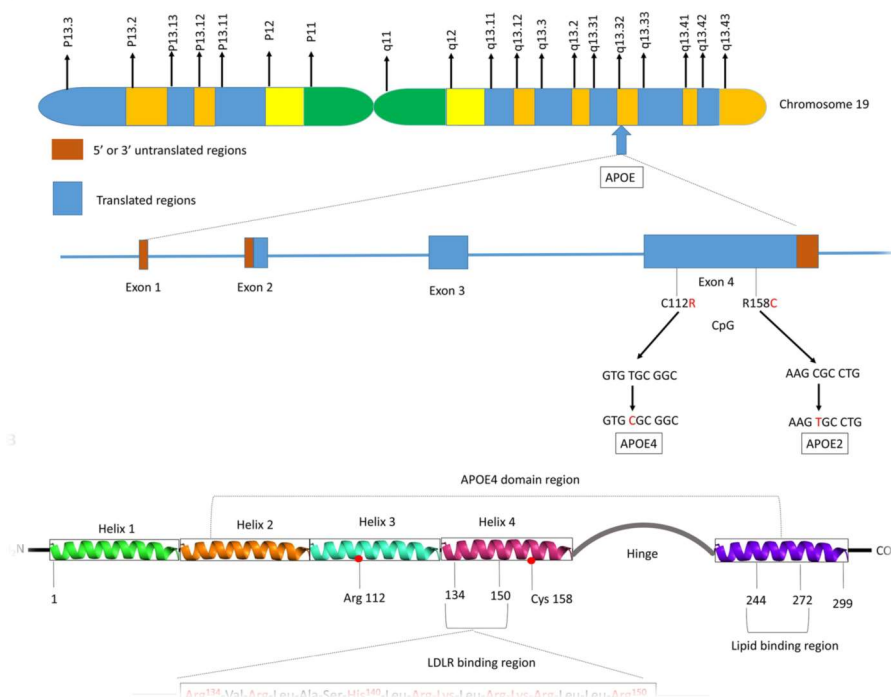
Extração do DNA	Pág. 33
Quantificação do DNA	Pág. 33
Genotipagem de Apo E	Pág. 34
Dados antropométricos	Pág. 34
Questionários e banco de dados	Pág. 34
Dosagem das citocinas inflamatórias	Pág. 35
Dosagem de perfil lipídico, hemograma e proteína C	
reativa	Pág. 36
Análise estatística	Pág. 36
RESULTADOS	Pág. 37
DISCUSSÃO	Pág. 49
CONCLUSÃO	Pág. 54
LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	Pág. 55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Pág. 56
ANEXO 1: Artigo publicado	Pág. 66

1.INTRODUÇÃO

1.1 Apo E

A Apo E é uma proteína produzida em várias células humanas como hepatócito, adipócito, astrócitos e macrófagos da parede arterial, células gliais, neurônios, e alguns tipos de células epiteliais e está associada ao metabolismo e transporte das lipoproteínas, funções vasculares, cerebrais e do sistema imunológico(1). Ela participa do transporte e efluxo de lipídeos hepáticos e não hepáticos, e eliminação de remanescentes de lipoproteínas no plasma formando complexos lipoproteicos após a ligação aos receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDLRs), ou proteína 1 relacionada ao receptor de LDL (LRP1)(2). Ao se ligar a esses receptores, a Apo E fornece lipídeos às células extra-hepáticas. Secundariamente, a Apo E se associa com partículas de lipoproteína de alta densidade (HDL) participando do transporte reverso de colesterol (RCT), um processo que transfere o excesso colesterol dos tecidos não hepáticos de volta ao fígado para sua reutilização. O efluxo de colesterol associado à Apo E pode retirar lipídios presentes em células espumosas das placas ateroscleróticas, reduzindo as lesões na parede arterial(3). A Apo E atua também no sistema imunológico(4) se ligando de forma inespecífica a componentes lipofílicos inflamatórios com alta afinidade como a proteína beta-amiloide, lipopolissacarídeos, ácidos lipoteicoicos e beta-glucanos que podem levar à eliminação de agentes patogênicos, contribuindo para a resposta imune inata(5).

Figura 1 . Representação do gene de APO E3 e polimorfismos para as isoformas E4 e E2.



Adaptado de Husain et al. *Front. Neurosci.*, 16 February 2021 Sec. Neurodegeneration

Volume 15 - 2021 | <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.630502>

Existem 3 principais isoformas de Apo E em humanos (Apo E 2, Apo E 3 e Apo E 4), codificadas por 3 genótipos homozigóticos e 3 genótipos heterozigóticos. A frequência entre os alelos varia de acordo com a população da seguinte forma : ϵ_2 : 5-10%, ϵ_3 : 65-70%, ϵ_4 : 15-20%(6). As 3 isoformas são diferentes graças a troca de bases nitrogenadas no gene *ApoE* como segue: Apo E2 (Cys112, Cys158 – rs7412, havendo a troca de uma base nitrogenada citosina por uma timina na posição 526 do gene), Apo E3 (Cys112 e Arg158) e Apo E4 (Arg112 – rs429358, Arg158, havendo a troca de uma base nitrogenada de timina para uma citosina na posição 388 do gene) (**figura 1**). A Apo E4 pode ser considerada, seguindo a teoria Darwinista, um ancestral das isoformas 2 e 3, que persistiu por ser vantajoso ao hospedeiro contra patógenos lipofílicos(7). As outras 2 isoformas vieram após a evolução de 250 mil anos(8). A Apo E se caracteriza pela estrutura tridimensional determinada pelos domínios C-terminal (CT) e N-terminal (NT) com a presença de hélices anfipáticas codificadas por múltiplos nucleotídeos com repetições em tandem. Praticamente não há Apo E livre no corpo, estão sempre ligadas a lipídeos. As raras formas livres são rapidamente oligomerizadas(5). Os domínios são ligados através de pontes salinas e pontes de hidrogênio entre a segunda e terceira hélices do CT e a terceira e quarta hélices do NT. Essa interação entre os domínios protege os resíduos carregados da região de ligação no NT, expondo uma superfície externa hidrofóbica que interage com lipídeos como proteoglicanos e beta-amiloide. Após essa interação ela sofre uma mudança conformacional de modo que a estrutura do feixe da hélice se abre e o CT se afasta do NT expondo a parte hidrofílica interna. Assim forma-se a sua natureza anfipática, tornando-se um potente ligante da família dos receptores de LDL. A diferença entre as isoformas com a troca de aminoácidos na estrutura da Apo E leva a um impacto em sua conformação como por exemplo a presença de uma ponte salina entre a Arg61 e o Glu255 na Apo E 4 que não estão presentes nas isoformas 2 e 3. Na Apo E4 a Arg-112 reorienta a cadeia lateral da Arg-61 no domínio N-terminal mudando sua conformação em relação às Apo Es 2 e 3 e permitindo a formação de uma ponte salina com Glu-255 no domínio CT(9). Na Apo E 3 os domínios NT e CT interagem formando uma ligação de hidrogênio entre Arg61 e Thr194 e uma ponte salina entre Lys95 e Glu255, o que não ocorre nas demais isoformas. Essas mudanças nas pontes geram uma interação do domínio menos estável na Apo E4 do que no Apo E3(5). A troca do aminoácidos no resíduo 112 da Apo E4 também ocorre nos resíduos 5-21 e 271-279, que apesar de parecerem distantes na sequência, estão próximos na forma espacial. Essa troca leva a um maior resíduo de arginina na Apo E4 que é reponsável pela perturbação das interações não

covalentes, criando maior movimento dinâmico em diferentes regiões na ApoE4 em comparação com a Apo E3. Isso contribui para uma facilidade da dissociação dos domínios, permitindo que a Apo E4 se ligue a partículas maiores como o VLDL. Essa diferença deixa a Apo E3 mais estável e a Apo E4 com uma forma mais desorganizada e instável. A troca do T pelo C na posição 388 do gene da *Apo E4* também afeta o comportamento de auto-associação, levando a uma dissociação mais rápida dos oligômeros de Apo E4 e uma ligação mais rápida desta à lipoproteínas em comparação com a Apo E3(5). A Tabela 1 a seguir mostra as diferenças entre Apo E3 e 4.

Tabela 1. Diferenças entre Apo E4 e Apo E3

	APO E4	APO E3
Aminoácido no resíduo 112	Arginina	Cisteína
Lipídeo de maior afinidade	VLDL	HDL
Ligação beta-amiloide	Similar, mas no clareamento de beta-amiloide Apo E4<Apo E3	
Resíduos 3-50	Diferentes interações não covalentes e orientação espacial levando a movimento dinâmico diferente entre as isoformas. Não afeta a interação entre NT e CT	
Resíduos 116-123	Diferentes interações não covalentes e orientação espacial levando a maior movimento dinâmico de Apo E4	
Resíduos 261-272	Envolvidos na ligação lipídica com afinidade semelhante, mas leva a um dobramento diferente entre as isoformas devido a oligomerização. Possível razão da diferença de ligação lipídica entre as isoformas	
Resíduos 271-279	Diferentes interações não covalentes e orientação espacial levando a movimento dinâmico diferente entre as isoformas.	
Interação entre os domínios NT e CT	Maior dinâmica motora	Maior estabilidade
Estabilidade térmica	Apo E4<Apo E3	
Dissociação de oligômeros	Mais rápida	Mais lenta
Orientação espacial	Menos organizado	Altamente organizado

(adaptado de Huebber, 2017(5))

A Apo E 2 também tem sua estrutura alterada em relação à Apo E3 com a presença da cisteína na posição 158. Isso acarreta um prejuízo da ligação de seu receptor pela alteração das pontes salinas, diminuindo o potencial positivo e reduzindo a ligação aos lipídeos(10). Conseqüentemente há aumento de triglicérides e colesterol causados pelo atraso na depuração das lipoproteínas remanescentes hepáticas e intestinais, resultando no quadro clínico de hipercolesterolemia tipo III. Enquanto na Apo E3 Arg-158 forma uma ponte salina com Asp-154, na Apo E2 a Cys-158 interrompe a ponte salina fazendo com que o Asp-154 interaja com a Arg-150. Isso altera o tamanho do domínio carregado positivamente, reduzindo a ligação ao receptor de LDL(11).

A frequência do alelo $\epsilon 4$ pode variar de acordo com a região do mundo, sendo mais frequente em Africanos (30 a 40%) do que em europeus (7 a 20%) e asiáticos (5 a 15%)(12). No Brasil, varia de 9 a 32% sendo mais prevalente em pessoas com comorbidades(13-15).

Dependendo do genótipo da isoforma de Apo E, o indivíduo pode ter maior ou menor susceptibilidade a determinadas doenças. Indivíduos carreadores de Apo E $\epsilon 4\epsilon 4$ apresentam colesterol total, colesterol LDL e Apo B elevados, enquanto em carreadores do alelo $\epsilon 2$ de Apo E, os valores se encontram baixos (16). Além disso, ser carreador da isoforma $\epsilon 4\epsilon 4$ está associado ao aumento da espessura da camada íntima-média das artérias carótidas em conjunto com o LDL elevado(17) e, como consequência, há nessas pessoas maior risco para aterosclerose, hipercolesterolemia e doenças cardiovasculares. Foi apontado também aumento de 10 vezes no risco de Alzheimer(18) e maior susceptibilidade a infecções bacterianas, parasitárias e virais(6).

1.2 Apo E, viroses e síndromes gripais

Diversos patógenos podem desencadear um quadro de síndrome gripal: rinovírus, influenza, adenovírus, parainfluenza, dentre outros (19). Em especial o vírus influenza (IAV) é responsável por quase meio milhão de mortes todos os anos e, portanto, representa uma séria ameaça à saúde global em especial para o público imunocomprometido, como idosos (>65 anos) e crianças (20). Além disso, a superinfecção pelo vírus influenza leva a possibilidade de mutação gênica do vírus que pode produzir genótipos mais patogênicos como as cepas de H1N1 podendo causar uma pandemia mundial (21). Dentre os fatores de risco para as síndromes gripais pode-se citar a obesidade. Independentemente de outras comorbidades ou fatores de risco, durante a pandemia de 2009 de influenza, os indivíduos com obesidade apresentaram maior risco de morte devido à infecção por IAV (22). Mesmo após vacinados contra a gripe, adultos com obesidade ainda têm duas vezes mais chance de desenvolver gripe ou síndromes

semelhantes à gripe do que adultos eutróficos(23). Um estudo mostrou que camundongos obesos infectados com influenza aumentaram a mortalidade em seis vezes em comparação com seus equivalentes não obesos(24). Ainda não se sabe ao certo por que a obesidade aumenta as chances de gravidade da influenza, mas acredita-se que a dislipidemia encontrada na maior parte dos portadores de obesidade, por aumentar o sítio endocítico de entrada viral, possa estar envolvida nesse mecanismo. É plausível acreditar que a Apo E4, associada às dislipidemias possa ser um dos fatores que explicam o aumento da gravidade das síndromes gripais em portadores de obesidade.

Sabe-se como já citado que a Apo E desempenha um papel essencial no transporte de lipoproteínas estando envolvida na patogênese das dislipidemias. Para algumas infecções virais, as apolipoproteínas são usadas pelo vírus, como o da hepatite C (HCV), para facilitar a entrada, montagem e transmissão do vírus. Além disso, a Apo E contribui para a patogênese do HCV e a evasão viral contra anticorpos neutralizantes(25). Poucos estudos abordam as infecções respiratórias virais e a Apo E. Um estudo *in vitro*, no entanto, mostrou que a Apo E foi um dos fatores capazes de restringir a infecção pelo influenza(26). Nesse estudo, a depleção de Apo E resultou em aumento da suscetibilidade, da gravidade e da mortalidade por infecção por influenza tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os camundongos “knock out” tiveram mais necrose e fibrose pulmonares além de maior sangramento alveolar, infiltração de neutrófilos e maior carga viral em comparação com o controle selvagem. A deficiência de Apo E conferiu maior infecção pelo vírus influenza humano H1N1 e alta patogenicidade pelo vírus influenza aviário H5N1 e H7N9 *in vitro* e *in vivo*. Uma das funções do Apo E é regular a homeostase do colesterol celular e foi estabelecido que essa homeostase desempenha um papel crítico na inibição da infecção pelo vírus da gripe. O nível de colesterol reduzido, modulado pela presença de Apo E, restringe a ligação do vírus, sugerindo que o colesterol celular reduzido pode contribuir para a defesa do hospedeiro contra a infecção por influenza(26).

Poucos estudos foram endereçados para a relação entre Apo E e síndromes gripais. Porém, com a instalação da pandemia por COVID-19, surgiram alguns estudos sobre a associação entre Apo E e COVID-19(27, 28). Assim, a maioria do conhecimento atual sobre Apo E e síndromes gripais são relacionadas à infecção por *SARS-CoV-2*.

1.3 COVID-19

No mundo, até meados de novembro de 2024, já ocorreram 704.753.890 casos e 7.010.681 óbitos por COVID-19(29). Apenas no Brasil são mais de 38.743.918 casos e 711.380 mortes.

A COVID-19 apresenta-se como uma doença multissistêmica causada por vírus cuja origem ainda é indeterminada, altamente contagiosa e de transmissão respiratória, com manifestação clínica variada, podendo ser assintomática ou provocar dano pulmonar difuso e altamente letal(30).

O *SARS-CoV-2* é um vírus com envelope e com RNA fita simples, do gênero β -coronavírus da família *Coronaviridae*. O vírus entra nas células epiteliais respiratórias anexando-se à enzima conversora de angiotensina-2 (ECA-2) via proteína S em sua superfície. Essa entrada decorre da clivagem proteolítica da ECA-2 pela serina protease-2 transmembrana(31). A porta de entrada é a mesma do *SARS-CoV-1*, no entanto, a afinidade do *SARS-CoV-2* pela ECA-2 é aproximadamente 10 a 20 vezes maior do que o *SARS-CoV-1*, o que poderia explicar a maior infectividade do vírus da COVID-19(32). A ECA-2 é encontrada em diversos tecidos como o do epitélio da mucosa nasal, oral, nasofaríngea e orofaríngea, epitélio alveolar, células endoteliais dos vasos sanguíneos, coração, túbulos renais e enterócitos no intestino delgado(33) (34). Recentemente foi descrito também as proteínas CD-147 e proteína-78 regulada por glicose como possíveis receptores *SARS-CoV-2* para entrada celular(35, 36). Acredita-se que a neuropilina-1, (NRP1) um receptor transmembrana com alta expressão no epitélio respiratório e olfatório, também pode estar envolvido na COVID-19, aumentando a entrada do *SARS-CoV-2*(37) no SNC via trato olfatório.

Após a entrada viral no citoplasma da célula hospedeira, ocorre a replicação, transcrição e a tradução das proteínas estruturais virais. A proteína S direciona então a fusão célula-célula entre células infectadas, levando à formação de grandes células multinucleadas que não são detectadas por anticorpos específicos contra o vírus, permitindo assim que o vírus burle o sistema imunológico e facilitando a disseminação do vírus no indivíduo infectado. Ao ocupar receptor de ECA-2 para a entrada viral nas células-alvo, ocorre então a regulação negativa desses receptores que deixam de exercer seu efeito contrarregulador sobre a angiotensina 2 através da produção de angiotensina 1-7 (que tem efeitos contrários aos da angiotensina 2, como vasodilatação e antitrombóticos). Assim, com a maior atuação da angiotensina 2 ocorre o aumento da permeabilidade vascular pulmonar podendo causar lesão pulmonar. Além disso, a disfunção de múltiplos órgãos, observada nesses pacientes, pode ser atribuída à ampla distribuição de receptores ECA-2 em tecidos pulmonares e extrapulmonares, incluindo coração, rim, endotélio e intestino(38). Os casos graves evoluem para Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) com dano alveolar difuso com exsudatos fibromixoides celulares e edema pulmonar além de superestimulação do sistema imunológico com tempestade de citocinas e falência múltipla de órgãos como será explicado a seguir(39, 40).

1.4 Mecanismos de gravidade

Após a fase inicial da infecção viral, aproximadamente 30% dos pacientes hospitalizados com COVID-19 desenvolvem doença grave que resulta em dano pulmonar progressivo, em parte devido a uma resposta inflamatória exacerbada. A quebra da barreira vascular leva às complicações pulmonares com o aparecimento de edema tecidual, endotelite, ativação da coagulação e potencial desenvolvimento de coagulação intravascular disseminada (DIC) além de inflamação exuberante local e sistêmica(30).

Dentre as manifestações clínicas da COVID-19 grave, pode-se citar o acometimento vascular(41). A inflamação e a ativação do endotélio contribuem para a lesão vascular (42) com extravasamento de substâncias e formação de edema pulmonar. Esse edema pode ocorrer por 5 fatores principais:

1. Dano à célula endotelial provocado pelo *SARS-CoV-2* levando a endotelite generalizada com disfunção, lise e morte da célula endotelial pulmonar;
2. O *SARS-CoV-2* liga-se ao receptor ECA-2, prejudicando a sua ação na formação de angiotensina 1-7 que agiria de forma antagônica à angiotensina 2. A redução da atividade de ECA-2 também, indiretamente, ativa a via da calicreína-bradicinina aumentando a permeabilidade vascular e contribuindo para formação do edema;
3. Espécies reativas de oxigênio produzidas por neutrófilos ativados, recrutados pelas células endoteliais podem lesar as células endoteliais pulmonares piorando o quadro do edema;
4. Pode ocorrer o afrouxamento das junções intercelulares após contração das células endoteliais pulmonares por mecanismo mediado por células imunes, citocinas inflamatórias e moléculas vasoativas;
5. O glicocálice das células endoteliais pode ser degradado por citocinas como IL-1 β e TNF, através da ativação das glicuronidases que, além da degradação citada, também regulam positivamente a ácido hialurônico sintase 2, levando ao aumento da deposição de ácido hialurônico na matriz extracelular e promoção da retenção de líquidos. Juntos, esses mecanismos levam ao aumento da permeabilidade vascular contribuído para a formação do edema pulmonar(30).

A IL-1 β pode ainda se ligar ao receptor para IL-1 (IL1-R1) na membrana da célula endotelial e o TNF produzido por neutrófilos e linfócitos ativados pode se ligar ao seu receptor (TNFR1) também presente na membrana dessas células. O IL-1 β estimula uma cascata que envolve a formação de um complexo com o gene 88 de diferenciação mieloide (MyD 88) e proteína acessória do receptor Toll/IL-1 (TIRAP) conhecido como mecanismo de ativação do

tipo II da célula endotelial. MyD88 dissocia-se do receptor e interage com a quinase 1 associada a IL-1R (IRAK1 e IRAK4) e com fator 6 associado ao TNFR1 formando a TRAF6(43).

A ligação do TNF ao seu receptor leva ao recrutamento de TNFR-associado via proteína de domínio de morte (TRADD), que, por sua vez, liga-se à proteína 1 que interage com o receptor (RIP1) e TRAF2. O complexo TRADD – RIP1 – TRAF2 então se dissocia do TNFR1. Ambos os complexos que são formados como resultado da ligação de IL-1 β ou TNF aos seus respectivos receptores levam a iniciação de sinais que culminam na ativação do fator de transcrição nuclear do fator- κ B (NF- κ B) e proteína ativadora 1 (AP1)(44).

Esses fatores iniciam a transcrição de genes específicos dentro do núcleo levando à expressão de proteínas pró-inflamatórias. Como por exemplo a ativação do NF- κ B mediada por MyD88 inicia a produção de TNF, IL-6, IL-1 β e interferons(44). As quimiocinas sintetizadas podem contribuir para a maior adesão de leucócitos, piora da inflamação, bem como estimulação da cascata de coagulação(43). As NETS (Neutrophil extracellular traps) produzidas pelos neutrófilos ativados também são vistas no pulmão de pacientes com COVID-19 e podem contribuir para o mecanismo de trombose, lesão tissular e inflamação(44).

A ativação de vias de coagulação com potencial desenvolvimento de coagulação intravascular disseminada é característica da COVID-19 grave. A lesão do endotélio também está envolvida nesse processo pois a ruptura da integridade vascular e morte dessas células leva à liberação do fator tissular da membrana basal com ativação da cascata de coagulação. A ativação de plaquetas ocorre tanto pelo complexo bradicinina-caliceína quanto pela ação da fosfatidilcolina na membrana da célula endotelial que sofre a ação da lisofosfatidilcolina e da acetilase derivada do fator ativador de plaquetas (PAF). O PAF ativa então as plaquetas(43) a produzirem fatores envolvidos na cascata de coagulação(30) e na contração vascular(45).

Além disso, tanto as células endoteliais ativadas quanto os pericitos também começam a expressar o fator tissular um dos principais ativadores da cascata de coagulação. O corpo libera, em resposta, contramedidores para degradar os coágulos ricos em fibrina. Isso explica por que altos níveis de produtos de degradação de fibrina (dímero- D), preditivos de mau prognóstico, podem ser encontrados nos casos graves. Desse modo, na COVID-19 ocorre além do dano endotelial, a ativação do sistema de coagulação, aumentando o risco de eventos protrombóticos(43).

No quadro grave também há dano nos capilares dos alvéolos interferindo na troca gasosa e evoluindo para síndrome da insuficiência respiratória aguda. Essa síndrome cursa com

infiltrado pulmonar bilateral, hipoxemia e alteração da resposta imunológica podendo culminar com um quadro de choque séptico, disfunção múltipla de órgãos e óbito.

Na COVID-19 grave, as vias de inflamação e de ativação do sistema imune estão alteradas ocorrendo primeiro a resposta pro-inflamatória antes da resposta viral mediada por interferon(46), ao contrário do que seria esperado após uma infecção por vírus. Pode ocorrer a chamada “tempestade de citocinas” que pode levar à falência múltipla de órgãos e piora do quadro(47) como será explicado a seguir em “citocinas e COVID-19”. Ela ocorre quando altos níveis de citocinas amplificam o processo destrutivo, levando a mais disfunção da célula endotelial, CID, inflamação e vasodilatação do leito capilar pulmonar. Isso resulta em disfunção alveolar, com insuficiência respiratória, hipóxia, falência de múltiplos órgãos e morte(30).

1.5 Citocinas e COVID-19

Desde o surgimento da COVID-19 os estudos tem mostrado que as respostas imunológicas do hospedeiro e sintomas imune-relacionados são diferentes entre pacientes assintomáticos e pacientes graves, onde ocorre uma desregulação do mesmo associada à gravidade da doença(48). A tempestade de citocinas atua piorando o quadro clínico pois, além do dano causado pelo *SARS-CoV-2*, a liberação excessiva de citocinas pelo paciente leva a danos teciduais além de uma resposta imunológica contra o patógeno prejudicada(49).

Diferentes citocinas foram descritas como fatores prognósticos baseando-se na hipótese que a imunidade inata pró-inflamatória e o sistema antiinflamatório estão relacionados à gravidade da doença ou à morte na COVID-19(50-52). A figura 2 ilustra o papel das citocinas no curso de evolução da COVID-19:

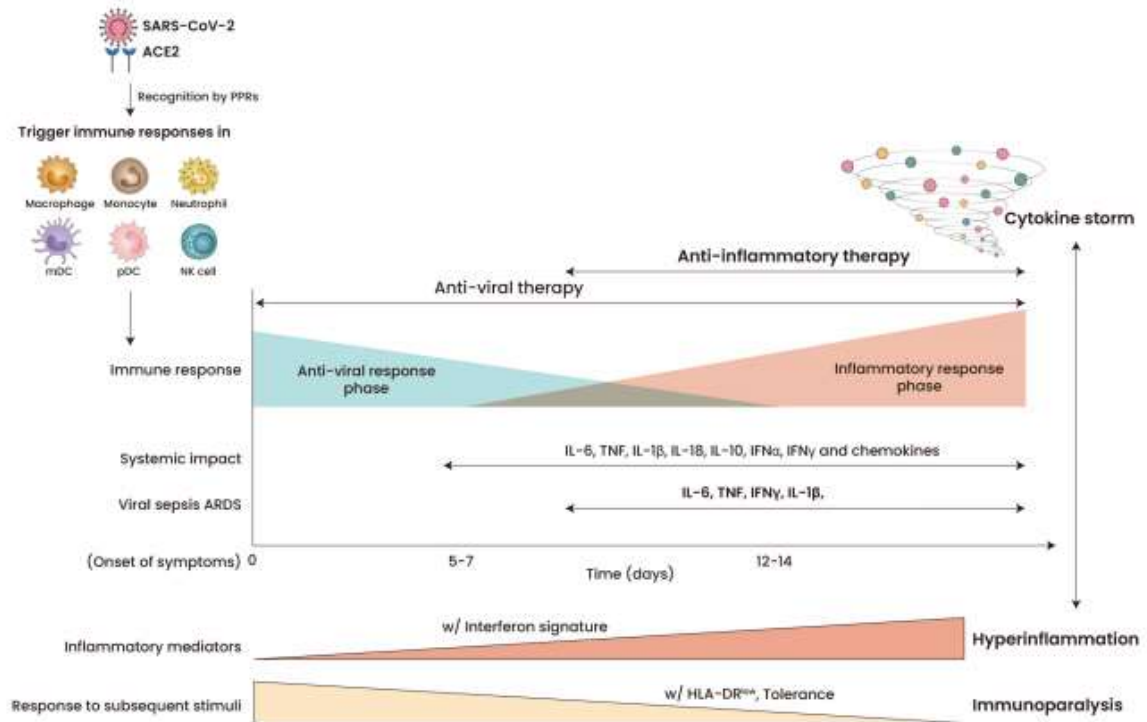


Figura 2 . Mediadores inflamatórios e respostas imunes inatas durante a infecção por COVID-19. Pacientes com COVID-19 grave apresentam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, causando uma tempestade de citocinas e danos colaterais ao tecido na fase tardia. As células imunes inatas na COVID-19 grave têm a característica proeminente de maior expressão gênica de mediadores inflamatórios e respostas prejudicadas a estímulos subsequentes. PPRs, receptores de reconhecimento de padrões; ARSD, síndrome do desconforto respiratório agudo. (Adaptado de Mol. Cells 2021; 44(6): 384-391)

Dentre as citocinas, a IL-6 pode ser considerada um biomarcador da gravidade da COVID-19 uma vez que níveis séricos se correlacionam positivamente com a gravidade e com a carga viral (53-56) desempenhando papel importante na tempestade de citocinas. A IL-6, um mediador inflamatório altamente produzido durante o estágio inicial da inflamação, ativa rapidamente múltiplos reagentes inflamatórios de fases agudas. Em pacientes com COVID-19, ela é produzida, em resposta a PAMPS e DAMPS, por vários tipos de células imunes. Além da IL-6 o TNF pode ser considerado um dos principais mediadores da inflamação estando aumentado em infecções virais (57). A IL-6 e o TNF são considerados preditores independentes em relação à gravidade e à sobrevivência dos pacientes(44). Além deles, a IL-1β participa da patogênese da injúria pulmonar aguda(58) como já citado anteriormente. O IL-1β é uma citocina mediada pelo inflamassoma e produzida por macrófagos e células epiteliais e foi encontrada em níveis mais altos em pacientes com COVID-19 grave comparados com COVID-19 moderada(59) no entanto, alguns trabalhos não encontraram correlação entre seus níveis e a gravidade da COVID-19(60). Pode-se citar ainda uma importante citocina em todas as fases da resposta imune e na defesa antiviral em especial na COVID-19: o IFN-γ. Ele é um IFN do tipo

II produzido pelas células “natural killers” (NK) e linfócitos T (61). O IFN- γ regula negativamente a replicação do vírus e ativa a produção de citocinas pelas células T, aumentando a capacidade de atuação do linfócito T citotóxico(62). No entanto, altos níveis persistentes de IFN- γ pioram a inflamação sistêmica e aumentam a lesão tecidual e falência de órgãos (63) . O IFN- γ em sinergismo com o TNF pode induzir a um processo de apoptose inflamatória contribuindo para diversas lesões encontradas na COVID-19 (64). Acredita-se ainda que o vírus da COVID-19 tem a capacidade de modular os níveis de INF do tipo 1. Isso ocorre através de vários mecanismos como inibição de detecção inata, alteração da sinalização de IFN e de sua função efetora. O *SARS-CoV-2* pode desencadear baixa produção de IFN e respostas limitadas (ou ausentes), que são acompanhadas por altas cargas virais, levando a quadros graves de COVID-19 (65-67). Portanto, as principais citocinas pró inflamatórias encontradas no curso da COVID-19 são IL-6, TNF, IL-1 e IFN- γ enquanto outras citocinas atuam na redução da inflamação como IL-4 , IL1ra e IL-10 (68).

Acredita-se que a IL-1ra exerce um papel contra-regulatório, controlando a produção de IL-1, TNF e IFN e um papel inibitório contra a ativação de citocinas pró-inflamatórias e respostas de linfócitos T(69). A IL-10 também é uma citocina com atividade anti-inflamatória. Ela pode reduzir a ativação de macrófagos e células dendríticas e suprimir as respostas efetoras Th1 e Th2 de células NK(70). Já foi demonstrado que ela é capaz de inibir o TNF e a ativação de neutrófilos na lesão pulmonar aguda(71). Na COVID-19, a IL-10 pode estar envolvida na neutralização da hiperativação imunológica, reduzindo o risco de lesões. No entanto, na COVID-19 grave, pode haver a desregulação na concentração de IL-10. Isso pode influenciar a resposta imune relacionada a essa interleucina e a gravidade dos pacientes infectados com *SARS-CoV-2*. Nesse contexto, o nível sérico de IL-10 também mostrou elevação significativa em casos graves e críticos de COVID-19, compatível com o nível sérico de IL-6. Uma metanálise com 147 estudos mostra evidências de que tanto a IL-6 quanto a IL-10 estão positivamente relacionadas à gravidade e mortalidade da COVID-19(56) e, portanto, a IL-10 pode exercer um papel ambíguo. Mas na fase de convalescência, tanto a IL-10 quanto a IL-4 tem seus níveis aumentados na COVID-19(60). Acredita-se que o mecanismo de participação da IL-4 nesse processo seja pelo papel das respostas mediadas por Th2 adaptativa na recuperação da doença e na remodelação inflamatória fibrogênica local (enquanto as células Th1, associadas ao IFN- γ exercem atividade antifibrótica). A IL-4 apresenta tendência ascendente na progressão da COVID-19 em pacientes críticos(72). Ela pode inibir células CD4+ virgens a se diferenciarem em células Th1 ou mesmo bloquear a transcrição do gene do IFN- γ (73), promovendo a evolução para a fase de recuperação da doença. Ao mesmo tempo, a

IL-4 também induz ativação alternativa de macrófagos M2, promovendo a liberação de TGF- β e fator derivado de plaquetas. Com isso há expansão de fibroblastos residentes remodelação da matriz (74) podendo levar a danos alveolares difusos e desenvolver fibrose septal. Pacientes com quadros graves em recuperação com altos níveis de IL-4 podem progredir para fibrose pulmonar, agravando o comprometimento das funções pulmonares a longo prazo.

Considerando papel ambíguo do IFN- γ , IL-10, da IL4 e de outras citocinas no desfecho, é importante compreender o padrão sérico delas em pacientes com COVID-19. Diante disso, otimizando os gastos da pesquisa, para nosso trabalho selecionamos as citocinas com maiores evidências de associação em trabalhos prévios com a COVID-19 (75, 76).

1.6 Classificação da gravidade da COVID-19

A classificação da gravidade da COVID-19 foi divulgada pela Organização Mundial de Saúde periodicamente durante a pandemia através de boletins de orientação aos profissionais de saúde sobre o manejo da doença. Foram classificados como casos leves aqueles pacientes com sintomas de COVID-19 como febre, tosse, fadiga, anorexia, taquipneia, mialgia, odinofagia, congestão nasal, cefaléia, diarreia, náuseas ou vômitos, anosmia, ageusia, tonteira, agitação, sintomas respiratórios, perda sensorial, de equilíbrio ou de deambulação, dispneia, com suspeita de serem casos de COVID-19 pelo critério epidemiológico de contato com pessoas sabidamente com COVID-19 e que não tenham apresentado hipóxia ou pneumonia viral(77).

Segundo a OMS, foram pessoas consideradas suspeitas de COVID-19 para o critério acima citado aquelas que preenchem os critérios clínicos e epidemiológicos abaixo.

Critérios clínicos:

1. Febre de início agudo e tosse; ou
2. Início agudo de 3 ou mais dos seguintes sinais ou sintomas: febre, tosse, fraqueza/fadiga, cefaleia, mialgia, dor de garganta, coriza, dispneia, anorexia/náusea/vômito, diarreia, estado mental alterado.

Critérios epidemiológicos:

1. Residir ou trabalhar em uma área com alto risco de transmissão do vírus: por exemplo, ambientes residenciais fechados e ambientes humanitários, como acampamentos e ambientes

semelhantes a acampamentos para pessoas deslocadas, a qualquer momento nos 14 dias anteriores ao início dos sintomas; ou

2. Residir ou viajar para uma área com transmissão comunitária a qualquer momento nos 14 dias anteriores ao início dos sintomas; ou

3. Trabalhar em ambiente de saúde, incluindo unidades de saúde e domicílios, a qualquer momento nos 14 dias anteriores ao início dos sintomas(78)

Foram classificados como casos moderados para adultos com COVID-19 aqueles com sinais clínicos de pneumonia (febre, tosse, dispneia, taquipnéia), mas sem sinais de pneumonia grave, e que mantem saturação pulmonar de oxigênio (SpO₂) \geq 90% em ar ambiente(77).

Foram classificados como casos graves segundo a OMS aqueles indivíduos com sinais clínicos de pneumonia (febre, tosse, dispneia) e mais um dos seguintes: frequência respiratória $>$ 30 respirações/min; desconforto respiratório grave; ou SpO₂ $<$ 90% em ar ambiente(77).

1.7 Apo E e COVID-19

A análise de dados de 382.188 participantes de ascendência europeia no UK Biobank (79) revelou um alto risco de COVID-19 grave em pessoas portadoras do alelo de Apo E do tipo ϵ 4 quando em homozigose e com teste positivo para COVID-19 (independente de doenças preexistentes como demência, doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2) quando comparadas com ϵ 3 ϵ 3. Em comparação com o genótipo ϵ 3 ϵ 3, o mais comum, o risco de contrair a COVID-19 para pessoas carreadoras de dois alelos ϵ 4 foi duplicado (OR = 2,31)(80). Um outro estudo com 22.384 participantes na Inglaterra evidenciou que o genótipo ϵ 4 ϵ 4 foi associado a positividade do teste de COVID-19 e a um aumento de 4 vezes na mortalidade após testar positivo para COVID-19 (OR = 4.29, 95% CI: 2.38–7.72, $p = 1.22 \times 10^{-6}$) quando comparado com os carreadores do genótipo ϵ 3 ϵ 3(81). Outro estudo mostrou que pacientes carreadores de pelo menos um alelo ϵ 4 eram mais sintomáticos para COVID-19 quando comparados aos demais pacientes positivos para COVID-19 carreadores de outras isoformas de Apo E(82). De maneira semelhante, idosos acima de 75 anos carreadores do ϵ 4 estão em risco aumentado de COVID-19 grave a moderada dentre os pacientes positivos para COVID-19 quando comparados a carreadores de outros alelos(83). Essa isoforma também tem maior associação com pacientes com COVID-19 na terapia intensiva em relação às outras isoformas (OR=2.47, 95% CI 1.25–4.89, $p=64 \times 10^{-4}$), com microhemorragias cerebrais quando em

homozigose, além de maior taxa de fadiga e síndrome pós-COVID-19 (28). Acredita-se que as diversas pleiotropias de Apo E4 podem mediar múltiplas morbidades, aumentando a vulnerabilidade do hospedeiro ao *SARS-CoV-2*(4). Várias morbidades associadas à Apo E4 também são relacionadas à maior mortalidade e morbidade na COVID-19 como diabetes mellitus, obesidade(84), demência e doenças cardiovasculares(80, 85). Um volume crescente de estudos, incluindo estudos de *Genome-wide associations* (GWAS), mostra associações entre perfis de polimorfismos genéticos e COVID-19(86-89). E alguns estudos (27, 90) mostram que a isoforma 4, pode estar associada a casos mais graves da doença(81, 90). Entretanto, essa associação ainda requer evidências mais robustas na literatura, indicando a necessidade de novos estudos com diferentes perfis de população.

Cerca de 20 a 40% da produção de Apo E vem de células como pneumócitos I e II, que funcionam também como porta de entrada do *SARS-CoV-2*, pois essas células expressam o receptor da enzima ECA2 na qual o vírus se liga(91). Estudos em ratos com ablação de Apo E mostraram defeitos de alveologênese, aumento da resistência do fluxo aéreo e perda acelerada de retração pulmonar durante o envelhecimento(92), o que mostra que a Apo E é importante para a manutenção adequada do microambiente e arquitetura pulmonar. A concentração pulmonar de Apo E pode ser considerada como um sinal de alerta em asmáticos, pois está associada à ativação do inflamassoma e produção de interleucina IL-1 β por macrófagos(93). Desse modo, a Apo E parece ser importante para o adequado funcionamento pulmonar e imunológico contra patógenos, ao mesmo tempo em que participa da formação do inflamassoma, mecanismo este relacionado ao desenvolvimento da síndrome respiratória aguda grave e de morte na COVID-19.

1.8 Mecanismos pelos quais a Apo E 4 poderia agravar a COVID -19

1.8.1 Colesterol intracelular: As diferentes isoformas de Apo E podem afetar tanto o colesterol circulante quanto o intracelular. Carreadores do alelo $\epsilon 4$ tiveram níveis mais elevados de colesterol plasmático e nos pneumócitos do que indivíduos com o genótipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ em uma meta-análise envolvendo 14.799 indivíduos de 17 diferentes etnias(94). O colesterol intracelular elevado poderia ter impacto na COVID-19 em especial, tanto pelo aumento de células espumosas quanto pelo aumento da chance de entrada do vírus, como será explicado abaixo. Um desses mecanismos está ligado a defeitos na via de RCT, da qual a Apo E participa diretamente sendo responsável pela homeostase lipídica nos tecidos periféricos(95, 96). Sem o RCT adequado, como ocorre em portadores de $\epsilon 4/\epsilon 4$, pode haver acúmulo de células espumosas (macrófagos carregados de lipídeos) no pulmão, e a geração de um acúmulo anormal dessas

células na infecção por *SARS-CoV-2* leva aumento da gravidade por mudança da arquitetura pulmonar, aumento da aterosclerose e risco de eventos trombóticos. Além disso, o aumento do colesterol intracelular nos pneumócitos se correlaciona com a maior gravidade da COVID-19 em idosos(97), que tem maior chance de aterosclerose e, naturalmente, mais células espumosas que os não idosos. Com relação à correlação positiva entre o aumento do colesterol intracelular e a infectividade do *SARS-CoV-2*(98), sabe-se que o aumento desse lipídeo nas células duplica as chances de entrada do vírus por aumento o tráfego do receptor de ECA2 para o sítio de entrada endocítico. Além disso, a produção de vírions mais infecciosos pode ser afetada pelo colesterol intracelular e levar a uma ligação mais eficaz deles ao receptor de ECA2. Isso ocorre quando enzimas chamadas furina proteases, que são abundantes no tecido pulmonar, clivam a sequência PRRAR contida na glicoproteína S (spike), porta de entrada do *SARS-CoV-2*. O colesterol intracelular é capaz de afetar o local de clivagem da glicoproteína S pela furina, posicionando-a de maneira ideal para a infecção viral nas células epiteliais e, desse modo, aumentando a eficiência da infecção do *SARS-CoV-2* nas células(98).

1.8.2 Inflamassoma: A Apo E4 pode estar envolvida na iniciação do inflamassoma mediado por NLRP3. Assim como na COVID-19 grave, a ativação de citocinas inflamatórias como IL-6, TNF e CCL3 (marcadores de tempestade de citocinas(99)), além de propriedades pró-trombóticas das células endoteliais(100) e neuro inflamação (caracterizada pelo aumento da expressão de CCL3 no cérebro), podem ser associados a Apo E4(101). Além disso, como a Apo E4 leva a um aumento do colesterol intracelular nos pneumócitos(98), esse pode ser um mecanismo que ativa o inflamassoma por NLRP3 levando à superprodução de IL-1 β , que encontra-se aumentada na COVID-19. Alguns estudos têm mostrado que o colesterol e ácidos graxos intracelulares são importantes reguladores da sinalização de NLRP3 através de várias vias (102, 103). Ácidos graxos saturados como o palmítico e esteárico servem como “padrões moleculares associados a danos” (DAMPs) endógenos, ativando o inflamassoma mediado por NLRP3 *in vitro e in vivo*, por cristalização intracelular em macrófagos(104). Esses cristais de colesterol estimulam neutrófilos a liberar armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs)(105). As NETs também são encontradas em casos graves de COVID-19(106) como já citado anteriormente. O inflamassoma mediado por NLRP3 também está aumentado em modelos animais de obesidade(107, 108) e em idosos(109), que também são fatores de risco para COVID-19 grave.

Assim, esses mecanismos poderiam explicar por que a desregulação metabólica que ocorre nos indivíduos carreadores da isoforma Apo E4 poderia ativar o inflamassoma aumentando a produção de citocinas e amplificando a gravidade da COVID-19.

1.8.3 Oxidação de LDL: A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são gerados como resultado do estresse oxidativo vascular em doenças como hipercolesterolemia, diabetes mellitus, hipertensão ou tabagismo leva à oxidação do LDL(110). Ela pode ocorrer por processos oxidativos enzimáticos ou não enzimáticos levando à modificações de lipídios LDL e apolipoproteínas(111). O produto final da oxidação lipídica é a formação de LDL oxidado que contém fosfolipídios bioativos e triglicérides de produtos derivados do colesterol. Macrófagos reconhecem o LDL oxidado através dos receptores “scavenger” e os fagocitam formando as células espumosas, que são o processo patológico chave para a formação de placas ateroscleróticas. O LDL oxidado pode ser internalizado por sua ligação a receptores 1 de lectinas oxidadas (LOX-1) e ao heterotrímero de CD36/TLR4/TLR6 expresso em monócitos/macrófagos e células endoteliais. Uma vez internalizado, o acúmulo de lipídios intracelulares leva a ativação de várias vias pró-inflamatórias e pró-oxidativas(111). O LDL oxidado também funciona como DAMP que ativa o NLRP3 e conseqüentemente gera um inflamassoma com secreção de IL-1 β e IL-18(111, 112).

O LDL oxidado pode levar a alterações pulmonares. Isso foi demonstrado com a administração intranasal de LDL oxidado humano a camundongos, resultando em uma resposta inflamatória que espelha as características da inflamação pulmonar induzida pela fumaça do cigarro(113). Doenças como obesidade, síndrome metabólica e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), que são fatores de risco para COVID-19 grave, também estão associadas ao LDL oxidado(113-115).

O LDL oxidado estimula vias pró-inflamatórias com DAMPs em comum com as ativadas por *SARS-CoV2*. Os pacientes com COVID-19 têm fosfolípidos oxidados na membrana de pneumócitos e macrófagos lesados pelo vírus, que poderiam atuar como DAMPS aumentando a inflamação da doença. Assim, a oxidação de lipídeos parece estar envolvida na patogênese do *SARS-CoV-2*, na piora da inflamação e do quadro clínico dos pacientes, induzindo lesão pulmonar e produção de citocinas pelos macrófagos pela via TLR4-TRIF (116). Além disso, ao aumentar os níveis de expressão de ECA2 e TMPRSS2(117) e a densidade de colesterol nas membranas formando as chamadas jangadas lipídicas, (locais onde o vírus irá se ligar para infectar a célula pois contem alta concentração de ECA2) (118) a LDL oxidada contribui para o aumento da susceptibilidade à infecção viral.

Os carreadores da isoforma de Apo E4 têm maior estresse oxidativo(119) e níveis mais altos de LDL circulantes que os demais pacientes com outras isoformas de Apo E (16, 120), podendo-se observar que o nível sérico de LDL oxidada em fumantes e carreadores da isoforma 4 é 26,7% maior (121)do que portadores de outras isoformas. Assim, esse poderia ser um dos mecanismos pelo qual os carreadores de Apo E4 apresentariam maior infectividade e maior morbidade da COVID-19.

1.9 Apo E, alterações vasculares cerebrais e atividade de ECA-2

O dano em microvasculaturas cerebrais na COVID-19 em pacientes graves é o principal causador de complicações neurológicas(41) e, ao mesmo tempo, essas lesões também são vistas em carreadores de Apo E4 em doenças neurodegenerativas(122). Um estudo encontrou uma associação entre Apo E4, gravidade da COVID-19 e lesões microvasculares cerebrais(28).

Ao se ligar à proteína de membrana, receptor da ECA-2(123), presente em larga escala nas células endoteliais(124), o coronavírus desencadeia a ativação de uma cascata inflamatória com formação do complexo calicreína-bradinina(45) que, por sua vez, leva à ativação de neutrófilos e plaquetas. A inflamação exuberante é um dos mecanismos de gravidade da COVID-19. Acredita-se ainda que indivíduos carreadores da isoforma Apo E4 também tenham menos atividade de ECA-2(41). Assim, com essa enzima menos ativa quando o vírus se liga a ela, e ocupa, portanto, seu sítio de ligação, sobra menos ECA-2 impedindo a formação adequada da angiotensina 1-7, que é uma importante enzima contrarreguladora que inibe vários processos inflamatórios. Sem esses efeitos contrarregulatórios sobre a angiotensina II poderia haver exacerbação dos efeitos deletérios de vasoconstricção, que também estão presentes na COVID-19 grave. Assim, é plausível acreditar que portadores do alelo 4 possam ser mais susceptíveis à COVID-19 mais grave.

1.10 COVID-19 e outros fatores de risco

Embora muito ainda precise ser entendido sobre a COVID-19, alguns fatores relacionados a idade, estado nutricional, obesidade e suas principais comorbidades como hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, doença crônica pulmonar e comorbidades associadas além do perfil genético se mostram como fatores de risco para os quadros graves da doença. No entanto, por vezes não se encontra um fator envolvido (125).

Além dos fatores genéticos como a Apo E4 já elucidados a obesidade também se mostra como um fator de risco para a maior gravidade da COVID-19. O primeiros trabalhos na pandemia já apontaram que a mortalidade da COVID-19 grave era maior em indivíduos com obesidade e, em especial, naqueles em estado mais grave na terapia intensiva(126) e pacientes

jovens portadores de obesidade(127, 128). Um estudo com 5662 pacientes com COVID-19 mostrou que aqueles com índice de massa corporal (IMC) $> 40\text{kg/m}^2$ tiveram maior taxa de mortalidade em relação aos eutróficos. Aquelles com IMC $> 45\text{kg/m}^2$ tiveram uma razão de risco de 4,18, mesmo ajustado para várias comorbidades como hipertensão, insuficiência cardíaca, diabetes, infarto agudo do miocárdio, doença renal e pulmonar crônicas. O risco de óbito foi maior em pacientes do sexo masculino e abaixo de 60 anos de idade(129). Outros estudos também encontraram maior morbidade e gravidade da doença em pacientes com IMC $> 40\text{kg/m}^2$ (130, 131).

Um dos grandes desafios em se entender a doença passa pela predição de quais pacientes obesos tem maior chance de evoluir para o quadro grave ou mesmo o óbito devido à síndrome da resposta inflamatória sistêmica. Nessa síndrome, o paciente evolui com uma cascata de eventos que culmina na intensa produção de citocinas inflamatórias.

Dentre os mecanismos que justificam o maior risco de morbidade da COVID-19 em indivíduos com obesidade, pode-se citar a fisiologia pulmonar restritiva e apneia do sono, diabetes e dislipidemia, disfunção imunológica com sinalização anti-inflamatória deprimida (redução de citocinas anti-inflamatórias como a adiponectina) e aumento da sinalização pró-inflamatória (com aumento da leptina, interleucina-6 e fator de necrose tumoral), disfunção endotelial e ainda alteração do sistema renina-angiotensina, que aumenta o risco de hipertensão e piora a inflamação e o risco de dano alveolar(132). Além disso, sabe-se que o tecido adiposo em excesso tem alta expressão do receptor da enzima conversora de angiotensina 2 que serve de ligação para entrada do *SARS-CoV-2* para a célula(133). Assim, poderia servir como um reservatório viral e local de replicação, prolongando a disseminação do vírus.

2. JUSTIFICATIVA

A relação entre diferentes isoformas de Apo E e síndromes gripais, particularmente no contexto da COVID-19, continua sendo uma área de interesse de pesquisa. Estudos que aprofundam a compreensão das interações hospedeiro-patógeno e o papel da Apo E na gravidade da doença são essenciais. Entender os efeitos dos genótipos de Apo E durante surtos contínuos de vírus respiratórios pode revelar novas estratégias de tratamento que podem melhorar os resultados dos pacientes e reduzir a carga geral da doença.

Uma vez que portadores do alelo $\epsilon 4$ em homozigose tem associação com o aumento de formação do inflamassoma, fator que acompanha a fisiopatologia da COVID grave, e pode também estar associada a outras doenças virais; e sabendo que a COVID-19 é uma doença nova e com consequências devastadoras, selecionamos, por estudos de G-WAS(27, 86, 87,

134), os polimorfismos de Apo E , em especial a Apo E4, por estar potencialmente associada positivamente com a gravidade dessas síndromes gripais.

Ao incluir apenas pacientes que apresentaram sintomas semelhantes aos da gripe em vez da população em geral, este estudo busca mitigar potenciais vieses na análise, excluindo aqueles menos expostos a contaminações ambientais. Todos os participantes deste estudo apresentaram sintomas semelhantes aos da gripe que os levaram a procurar serviços médicos, permitindo uma investigação aprofundada da gravidade e progressão da doença em indivíduos portadores do alelo $\epsilon 4$ em comparação com aqueles que não os apresentam. Entender o perfil genético da Apo E, dados antropométricos, demográficos e de citocinas em uma população brasileira, uma vez que o Brasil teve um dos maiores índices de COVID vistos durante a pandemia, é fundamental no intuito de traçar estratégias futuras de políticas públicas de prevenção e de vacinação para pessoas que possam ter um perfil indicativo de maior risco da doença grave. Além disso, a descoberta de fatores de suscetibilidade genética pode abrir novos caminhos para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas no futuro com base nos processos moleculares relacionados às consequências clínicas da infecção por COVID-19.

3. OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo avaliar a possível interferência do alelo $\epsilon 4$ na gravidade e progressão de síndromes semelhantes à gripe e COVID-19.

3.1 Objetivos específicos:

1. Observar a frequência dos polimorfismos da Apo E em indivíduos com síndromes gripais e naqueles com teste confirmatório para COVID-19.
2. Observar as possíveis diferenças em indivíduos carreadores ou não do alelo $\epsilon 4$ nos parâmetros sociodemográficos e antropométricos em indivíduos com síndrome gripal e no subgrupo dos indivíduos que desenvolveram COVID-19.
3. Avaliar se a presença da Apo E4 influencia no perfil de citocinas em indivíduos com SG e no subgrupo de COVID-19 .
4. Observar se a gravidade de COVID-19 está relacionada com a presença do alelo $\epsilon 4$ ou com outros parâmetros sociodemográficos e antropométricos estudados.

4.MÉTODOS

4.1 Seleção das amostras: Os dados do presente estudo fazem parte do banco de dados obtidos pela Prof. Ana Caetano Faria, exceto o genótipo de Apo E que foi determinado para este estudo

específico. Nosso estudo incluiu indivíduos adultos a partir de 17 anos que procuraram centros de saúde (UPA Centro-Sul ou Hospital Risoleta Neves) em Belo Horizonte, MG no período de novembro de 2020 a junho de 2021, por apresentarem sintomas gripais durante a pandemia de COVID-19 no Brasil. Esses foram então submetidos ao exame de RT-PCR com material de swab nasal para a confirmação do diagnóstico de COVID-19. Aqueles que se mostraram negativos para *SARS-CoV-2* foram denominados portadores de Síndromes Gripais. Aqueles com teste positivo para *SARS-CoV-2* (grupo COVID-19) foram acompanhados por 7 a 14 dias para avaliação da evolução do quadro, gravidade e necessidade de internação e desfecho clínico. O plasma obtido das coletas de sangue foi usado para dosagem de citocinas, o sangue total para o hemograma, perfil lipídico e proteína C reativa ultrasensível, enquanto o coágulo foi usado para a genotipagem das isoformas de Apo E. Apesar de não ter sido feita a identificação das cepas do vírus da COVID-19, sabe-se que as cepas circulantes na época da coleta de dados eram as cepas original e a P1.

O banco de dados original contava com 738 indivíduos, sendo que 458 deles foram excluídos por falta ou impossibilidade de obtenção de todos os dados relevantes.

4.2 Comitê de ética e pesquisa

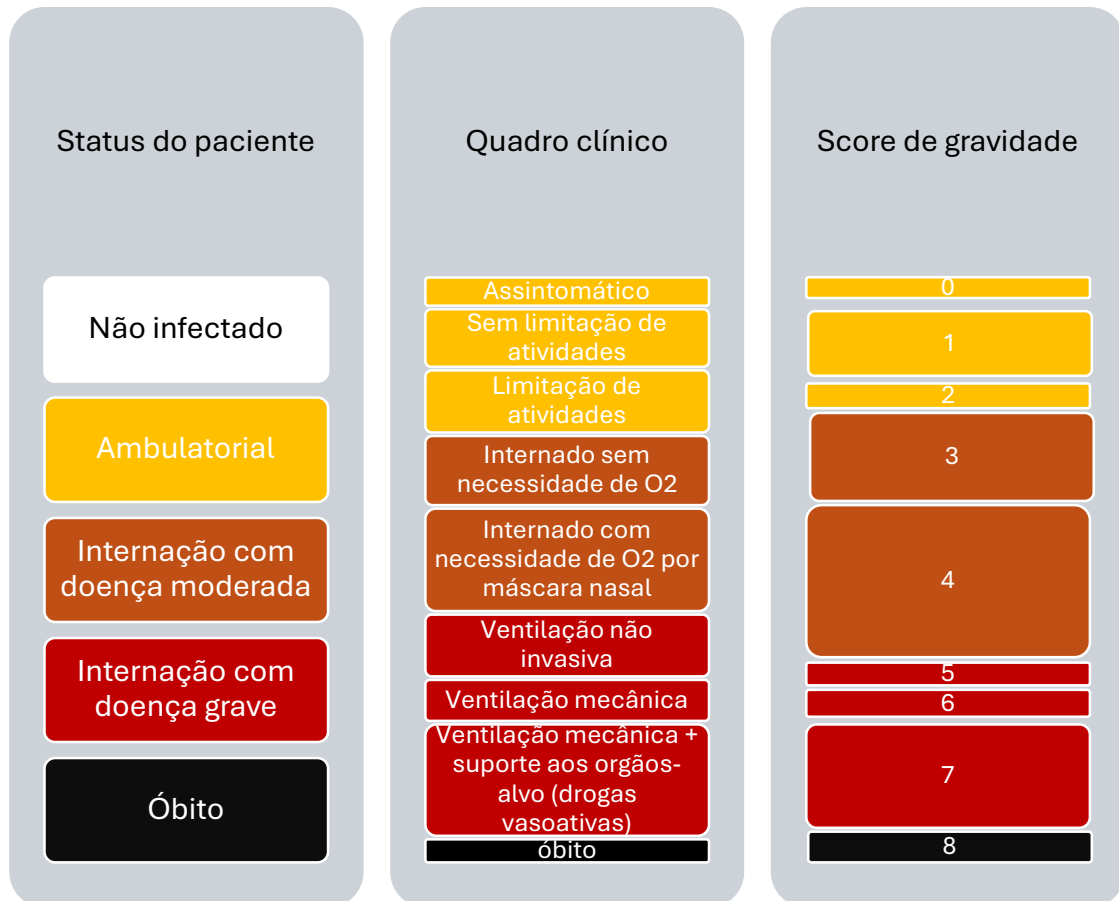
Todos os pacientes assinam um termo de consentimento informado como voluntários. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética nº 5.498.897, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e pelo Conselho de Ética em Pesquisa, comissões da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), (CAAE 40208320.3.2001.0061). Este estudo está registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) - [REBEC \(ensaiosclinicos.gov.br\)](http://REBEC(ensaiosclinicos.gov.br)) número: RBR-2sm4qmy

4.3 Critérios de Inclusão e Exclusão: Foram incluídos os pacientes que tiveram resultado conclusivo no teste de COVID-19 por PCR (sendo positivo ou negativo para COVID-19), classificados de acordo com score 1-2: leve, 3-4: moderado, > 5: grave) (135) (**Figura 3**).

Foram selecionados apenas indivíduos com sintomas gripais com idade entre 17 a 90 anos, que possuíam no máximo 7 dias de sintomas gripais relatados. Indivíduos sem sintomas gripais foram excluídos do atual estudo por serem fontes de variáveis de confusão como reclusão em casa, tipo de exposição, etc. Assim, assumimos que indivíduos com sintomas gripais foram igualmente expostos a ambientes capazes de contaminá-los com vírus, sejam eles rinovírus, influenza, entre outros (no caso de SG) ou *SARS-CoV-2* (subgrupo COVID-19). Os pacientes com SG não tiveram seus agentes etiológicos definidos por testes diagnósticos e

foram todos agrupados com diferentes etiologias no grupo SG. Foram incluídos pacientes com comorbidades (discriminadas no banco de dados), exceto as listadas nos critérios de exclusão.

Figura 3. Escala WHO de gravidade dos pacientes com COVID-19

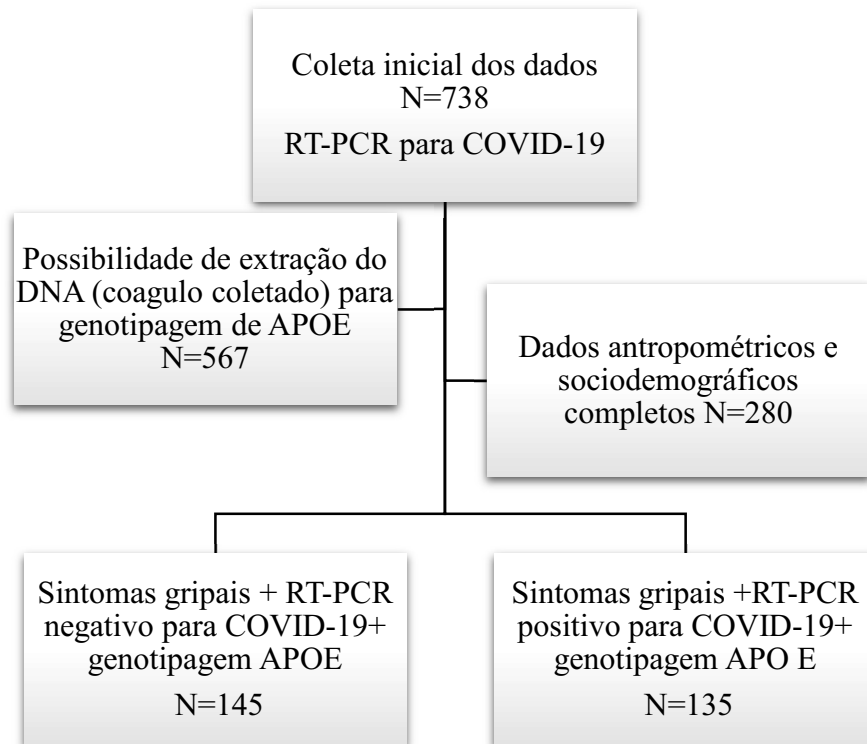


Legenda: branco – não infectado, amarelo :COVID leve, laranja: COVID moderada, vermelho: COVID grave, preto: óbito.

Foram excluídos indivíduos convalescentes, HIV positivo com carga viral detectável, portadores de câncer em atividade, crianças e adolescentes menores de 17 anos. Além disso, foram excluídos os pacientes que não tinham coágulo disponível para a extração do DNA, ou que tivessem algum teste de confirmação ou exclusão da COVID-19 faltante, ou que não tivessem os dados antropométricos e sociodemográficos no banco de dados.

O recrutamento dos pacientes foi feito segundo o fluxograma mostrado na Figura 4:

Figura 4: Fluxograma do recrutamento dos pacientes



4.4 Coleta do Coágulo

A coleta do coágulo foi feita pela equipe da professora Ana Caetano Faria. Foram coletados cerca de 40 ml de sangue periférico (3 tubos de heparina, 1 tubo ativador de coágulo), as amostras foram processadas no Instituto René Rachou - FIOCRUZ em Belo Horizonte, MG. O processamento do material biológico ocorreu em até 24 horas após a coleta. O sangue foi processado em 3000 rpm com 9 minutos de aceleração e 4 minutos de desaceleração na centrífuga refrigerada de mesa Sorvall modelo ST16R - Thermo scientific. As alíquotas do soro e do plasma foram congeladas em um freezer com temperatura a -80° celsius. O coágulo foi congelado a -10° celsius.

4.5 Teste RT-PCR

Para o diagnóstico dos indivíduos com COVID-19, foram coletadas amostras de esfregaço nasofaríngeo por swab nasal para a realização do teste RT-PCR. As amostras foram processadas e analisadas no Laboratório do Centro de Tecnologia em Vacinas (Centro de Pesquisa UFMG/FIOCRUZ/BH-TEC) em Belo Horizonte, MG.

Após a identificação das amostras foi iniciado o processo de extração e purificação do RNA. Para tanto, foi adicionado um tampão que realiza a lise de células presentes, em seguida

o material passou por uma coluna de purificação que filtra o RNA para então ter sua eluição e purificação. Posteriormente a essa fase, teve início o processo de amplificação de detecção do RNA viral. Para a realização do teste de RT-PCR o CT vacinas utilizou dois tipos de protocolos, o protocolo CHARITÉ do hospital de Berlim (tem como alvo o gene do envelope viral) e o protocolo do Centers for Disease Control and Prevention dos Estados Unidos (que tem como gene alvo duas regiões no gene do nucleocapsídeo). Também foi utilizado a RNaseP humana como controle para verificação de que amostra foi coletada de forma correta. Nesse teste primeiramente ocorre a etapa de transcrição reversa, onde um primer liga-se a região complementar de interesse, desencadeando a ação da transcriptase reversa, que sintetiza uma fita de DNA complementar, sob a temperatura de 45° graus celsius por 15 minutos. Na sequência, a temperatura é elevada a 95° graus celsius por 3 minutos para fazer a dissociação da dupla fita. Uma vez separada, a fita de DNA complementar passa pelo processo de amplificação, na qual novamente um primer se liga de maneira específica na região de interesse, e a DNA polimerase começa sua atividade. Esse processo ocorre a 58° graus celsius durante 1 minuto. Assim, no final do primeiro ciclo de amplificação uma fita gera duas fitas e a seguir o processo permanece ocorrendo em uma progressão geométrica. A cada amplificação é gerado uma fluorescência a qual é captada pelo equipamento. O equipamento gera um gráfico que avalia se a fluorescência alcançou o limiar “Threshold”. Ao alcançar esse limiar é gerado um valor de CT, que corresponde ao ciclo de amplificação, onde quanto menor o CT, maior a carga viral.

4.6 Extração do DNA

A extração do DNA teve início após a primeira reunião de qualificação e o método de extração do DNA foi feito de acordo com o protocolo do kit de extração da thermofisher Purelink Invitrogen K182002.

Nesse protocolo foram feitos os seguintes passos:

1. Adicionado 20 µl de Proteinase K (20 mg/mL) a um tubo de microcentrífuga estéril.
2. Transferido 200 µl de do coágulo para o tubo contendo proteinase K (20 mg/mL).
3. Adicionado 20 µl de RNase (20 mg/mL) A à amostra. Misturado bem em vórtex breve e incubado à temperatura ambiente por 2 minutos.
4. Adicionado 200 µl de PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer e misturado bem por vórtex para obter uma solução homogênea.
5. Incubado a 55°C por 10 minutos para promover a digestão de proteína.

6. Adicionado 200 µl de etanol 96-100% ao lisado. Misturado bem por vórtex para produzir uma solução homogênea.
7. Prosseguimos imediatamente para o protocolo de purificação.
8. Adicionado o lisado (~640 µl) preparado com PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer e etanol para a coluna.
9. Centrifugada a coluna a 10.000 × g por 1 minuto em temperatura ambiente.
10. Descartado o tubo de coleta e colocada a coluna em um tubo de coleta limpo.
11. . Adicionado 500 µl de Wash Buffer 1 preparado com etanol à coluna.
12. Centrifugada a coluna a 10.000 × g por 1 minuto em temperatura ambiente.
13. Descartado o tubo de coleta e colocada a coluna em um tubo limpo.
14. Adicionado 500 µl de Wash Buffer 2 preparado com etanol à coluna.
15. Centrifugado a coluna à velocidade máxima durante 3 minutos à temperatura ambiente. Descartado o tubo coletor.
16. Colocado a coluna em um tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml.
17. Adicionado 25-200 µl de PureLink™ Buffer de eluição genômica para a coluna. Escolhido o volume de eluição adequado às suas necessidades (escolhemos o volume de 30 µl).
18. Incubado à temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugada a coluna à velocidade máxima durante 1 minuto à temperatura ambiente. O tubo continha o DNA genômico purificado. Descartada a coluna.

4.7 Quantificação do DNA

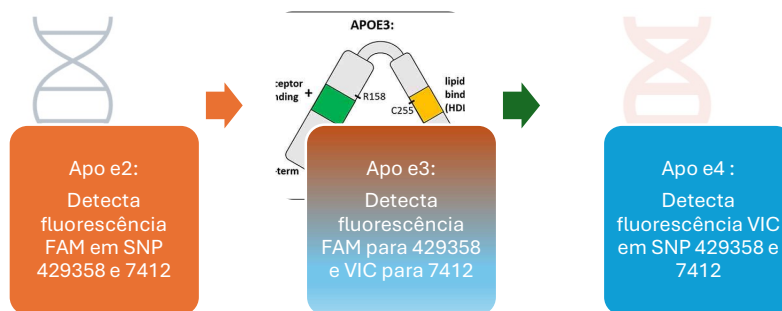
Usando a espectrofotometria, mediu-se a quantidade e pureza do DNA. A concentração de DNA foi obtida por leituras a 260 nm. Usou-se a razão de leituras em 260 nm/280 nm para estimar a pureza do DNA.

4.8 Genotipagem de Apo E

O genótipo da Apo E foi identificado por PCR em tempo real com ensaios TaqMan. Foram analisados dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) da Apo E, rs429358 e rs7412, correspondentes às posições 112 e 158 da proteína, respectivamente. Para cada SNP, as reações foram realizadas em duplicata em placas de microtitulação de 96 poços com volume final de 10,1 µl cada, contendo 5 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix (ThermoFisher, Brasil), 2,5 µl de água (grau biomol), 0,6 µl de cada sonda (FAM ou VIC) e 2µl de DNA (30–

100 ng). As condições de corrida foram 1 ciclo a 60° por 30 segundos, 1 ciclo a 95° por 10 minutos, 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 15s e 50 ciclos de hibridação e extensão a 60°C por 1 min e 1 ciclo a 60° por 30 segundos. Foi usado equipamento QuantStudio™ 5 System Invitrogen Thermo Fisher. As sondas de cada SNP foram da marca Thermo Fisher (Rack ID7446150-2) e tinham duas sequências marcadas com um corante VIC/FAM diferentes para os polimorfismos C/T, respectivamente. Esta técnica permite a identificação dos seis genótipos possíveis: $\epsilon 2/\epsilon 2$; $\epsilon 2/\epsilon 3$; $\epsilon 2/\epsilon 4$; $\epsilon 3/\epsilon 3$; $\epsilon 3/\epsilon 4$; e $\epsilon 4/\epsilon 4$, de acordo com a combinação de fluorescência detectada para cada posição. Assim, $\epsilon 2$ seria apenas a detecção de fluorescência FAM; $\epsilon 3$ apresentaria FAM para rs429358 e VIC para detecção de fluorescência de rs7412 e; $\epsilon 4$ seria apenas detecção de VIC para ambos os SNPs vide **figura 5**.

Figura 5 . Fluorescência para definição de isoformas de Apo e



4.9 Dados antropométricos

Os participantes foram pesados sem sapatos e com roupas leves em balança de plataforma da marca Welmy w200a com capacidade para 200 kg. A altura foi aferida com os pacientes descalços e eretos, com os pés paralelos e com calcanhares, tronco, e cabeça tocando o estadiômetro (acurácia de 0,5 cm). O IMC foi calculado com o peso (kg) dividido pelo quadrado da altura (m) $[IMC = \text{peso}(\text{kg}) / \text{altura}(\text{m}^2)]$ (136). Seguindo o padrão da OMS, foram considerados eutróficos aqueles com IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m^2 , com sobrepeso se $IMC \geq 25$ a 29,9 kg/m^2 , e com obesidade aqueles com IMC maior ou igual a 30 kg/m^2 (137). Os pacientes foram classificados em: pacientes com obesidade, sobrepeso e eutróficos (136).

4.10 Questionários e banco de dados

Os dados coletados e constantes no projeto atual foram coletados pela equipe da Prof.^a Dra. Ana Maria Caetano de Faria e são: classificação clínica para COVID-19; score da WHO para gravidade, desfecho clínico (óbito, alta hospitalar ou perda de seguimento), idade, gênero,

autorrelato de cor da pele (que geralmente é referido como etnia), duração da doença (dias), IMC (eutrófico, sobrepeso ou obesidade), estado vacinal, comorbidades (classificadas em ausentes, 1, 2 ou 3 ou mais) e tempo de internação (dias).

4.11 Dosagem das citocinas inflamatórias

Os mediadores plasmáticos foram medidos usando plasma heparinizado para detecção e quantificação de analitos para 280 indivíduos de Belo Horizonte- MG, Brasil. A técnica de imunoensaio magnético realizada com o equipamento Luminex (Bio-Plex® 200, Bio-Rad) e kit Bio-Rad Laboratories (Bio-Plex® Pro Human Cytokine Standard) foram utilizados, seguindo protocolos de armazenamento e processamento padronizados pelo Grupo Integrado de Pesquisa com Biomarcadores (GIPB) (IRR-FIOCRUZ/MG). A temperatura de -80°C foi utilizada para transporte e armazenamento das amostras. O software Bioplex™ xPONENT versão 3.1 (Bio-Rad) foi usado para analisar o seguinte painel: IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), IFN-γ e TNF. O painel de mediadores e suas configurações padrão são apresentados na tabela 2 a seguir:

Tabela 2. Citocinas analisadas, sua porcentagem de detecção e configurações padrão.

Citocina	Porcentagem de detecção	Configuração padrão (pg/ml)
IFN-γ	95.78	4.495
IL-10	99.33	26.569
IL-12(p70)	99.33	19.101
IL-1β	98.67	1.013
IL-4	98.00	1.588
IL-6	99.11	7.980
TNF	85.78	53.044

4.12 Dosagem de perfil lipídico, hemograma e proteína C reativa

A medida do perfil lipídico foi feita segundo método enzimático usado no laboratório de análises clínicas Hermes Pardini. Os resultados foram apresentados pelos pacientes e feita a coleta desses dados para o banco de dados no Excel. Foi feito o uso da Fórmula de Friedewald para o cálculo do LDL. O hemograma foi realizado no laboratório Hermes Pardini com análise

automatizada com analisador hematológico modelo Hematoclin 5.2-R16646 e a proteína C reativa ultrasensível foi obtida por teste imunoturbidimétrico usando o Kit K059 Bioclin.

4.13 Análise estatística

As variáveis contínuas foram avaliadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, tendo todas sido classificadas como não-paramétricas e expressas como mediana (mínimo e máximo). Para comparação entre grupos foi utilizado o teste U de Mann-Whitney. As demais variáveis foram expressas como n (%) e comparadas por meio do teste de Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher (quando as frequências mínimas esperadas foram menores do que cinco). A correlação de Spearman foi utilizada para avaliar o coeficiente de correlação entre todas as variáveis. A regressão logística binomial foi utilizada para identificar variáveis associadas à classificação clínica da COVID-19 (leve ou moderada/grave), em modelos univariados e multivariados. Para todas as análises, a significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$. O *software* utilizado foi o SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Armonk, NY), na versão 22.0.

5. RESULTADOS

As características da população total (280 pacientes) eram de um grupo equilibrado com 50,4% do sexo feminino e 49,6 % do masculino, a mediana de idade foi de 41 anos, a mediana de IMC foi de 26,6 kg/m² e 48,2% da amostra foram diagnosticados com COVID-19, enquanto os 51,8% restantes tiveram diagnóstico de síndrome gripal (SG) (**Tabela 3**). Não foi feito o diagnóstico etiológico das SG. Comorbidades foram relatadas em 43,57% da população total, 41,4% do grupo com síndrome gripal e 45,1% do grupo com COVID-19. As principais comorbidades relatadas foram hipertensão arterial sistêmica (20,7% da população total), doenças respiratórias como bronquite, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (12,1%), diabetes mellitus (6,4%) e doenças cardíacas (3,9%). Não houve diferença entre os grupos além da mediana do colesterol total, que foi maior nos portadores do alelo $\epsilon 4$ de Apo E. Dentre os pacientes com COVID-19, a maioria apresentou classificação clínica leve (65,9%). O desfecho clínico mais observado foi a alta hospitalar (97,5% da amostra) e a maioria da amostra não apresentou comorbidades (55,4%) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Características sociodemográficas e clínicas dos pacientes incluídos no estudo

Variável	Total (n= 280)
----------	----------------

Sexo, n (%)	
Feminino	141 (50,4)
Masculino	139 (49,6)
Idade (anos), mediana (mín. – máx.)	41 (17 – 90)
Idade (adultos e idosos), n (%)	
Adulto	241 (86,1)
Idoso	39 (13,9)
Etnia segundo cor da pele autorrelatada, n (%)	
Branca	68 (24,3)
Parda	143 (51,1)
Preta	58 (20,7)
Amarela	7 (2,5)
Indígena	1 (0,3)
Não identificado	3 (1,1)
IMC (kg/m²), mediana (mín. – máx.)	26,6 (14,6 – 51,5)
Estado nutricional, n (%)	
Baixo peso	4 (1,4)
Eutrófico	96 (34,3)
Sobrepeso	107 (38,2)
Obesidade	73 (26,1)
Diagnóstico, n (%)	
COVID-19	135 (48,2)
Síndrome gripal	145 (51,8)
Classificação clínica para COVID-19 (n=135), n (%)	
Leve	89 (65,9)
Moderada	22 (16,3)
Grave	24 (17,8)
Desfecho clínico, n (%)	
Óbito	1 (0,4)
Alta hospitalar	273 (97,5)
Desconhecido	6 (2,1)
Dias de doença, mediana (mín. – máx.)	5 (1 – 30)
Dias de doença (por faixas), n (%)	
1 a 7 dias	198 (70,7)
8 a 14 dias	56 (20,0)
Mais de 14 dias	26 (9,3)
Dias de internação, mediana (mín. – máx.)	4 (1 – 9)

Presença de comorbidade ou doença crônica, n (%)	
Sim	125 (44,6)
Não	155 (55,4)
Número de comorbidades por paciente, n (%)	
Sem comorbidades	155 (55,4)
Uma comorbidade	69 (24,6)
Duas ou mais comorbidades	56 (20,0)

IMC: Índice de Massa Corporal

Foi observado que as medianas de triacilglicerol, colesterol total, colesterol HDL (HDL-c) e colesterol LDL (LDL-c) foram de 113,0 mg/dl, 172,0 mg/dl, 44,0 mg/dl e 100,0 mg/dl, respectivamente (**Tabela 4**).

Tabela 4. Dados laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo

Variável	Total (n= 280)
Carga viral (Ct), mediana (mín. – máx.)	22 (13 – 37)
Contagem de células e análises séricas, mediana (mín. – máx.)	
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	172 (29 – 340)
Proteína C reativa(mg/dl)	4,5 (4,0 – 121,0)
Interleucina-1 beta (IL-1 β), pg/ml	0,5 (0,01 – 226,2)
Interleucina-4 (IL-4), pg/ml	0,7 (0,03 – 109,0)
Interleucina-6 (IL-6), pg/ml	0,8 (0,02 – 1148,6)
Interleucina-10 (IL-10), pg/ml	1,6 (0,04 – 154,2)
Interleucina-12 (IL-12(p70)), pg/ml	0,7 (0,03 – 109,0)
Interferon-gama (IFN- γ), pg/ml	5,7 (0,07 – 109,0)
Fator de necrose tumoral (TNF), pg/ml	9,9 (0,3 – 932,7)
Triglicerídeos, (mg/dl)	113,0 (44,0 – 369,0)
Colesterol total, (mg/dl)	172,0 (104,0 – 288,0)
Colesterol HDL, (mg/dl)	44,0 (24,0 – 85,0)
Colesterol LDL, mg/dl	100,0 (49,0 – 203,0)

Em relação às isoformas de Apo E, a maioria dos pacientes era homozigótica para o alelo $\epsilon 3$ e, dos pacientes restantes, 8,2% tinham pelo menos um alelo $\epsilon 2$ e 31,5% tinham pelo menos um alelo $\epsilon 4$ de Apo E. Essa distribuição do alelo $\epsilon 4$ foi semelhante nos grupos com sintomas semelhantes aos da gripe (SG) (29%) e COVID-19 (34,1%) (**Tabela 5**). Observou-se que apenas 10 indivíduos (3,6%) apresentaram homozigose para o alelo $\epsilon 4$, sendo 7 no grupo

com síndrome gripal e 3 no grupo com COVID-19. No entanto, os dados da população total e dos grupos com síndrome semelhante à gripe e da COVID-19 estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg: População total: $X^2= 0,7449$, $p=0,9804$; Grupo com sintomas semelhantes aos da gripe: $X^2= 6,2401$, $p= 0,2835$ e grupo com COVID-19: $X^2= 6,8938$, $p= 0,5648$.

Tabela 5. Genotipagem de Apo E de 280 indivíduos analisados no estudo e nos subgrupos SG e COVID-19

	População Total (N= 280)		Síndrome gripal (N= 145)		COVID-19 (N=135)		Valor P*
	%	(N)	%	(N)	%	(N)	
Distribuição de alelos de Apo E							
ε3	78%	(437)	82%	(237)	78%	(210)	0.381
ε4	17.5%	(98)	17%	(49)	18%	(49)	
ε2	4.5%	(25)	1%	(4)	4%	(11)	
Genotipagem de Apo E							
ε3/ε3	60.6%	(170)	62.7%	(91)	58.5%	(79)	0.771
ε2/ε2	0.4%	(1)	0%	(0)	0.7%	(1)	
ε3/ε2	7.5%	(21)	8.3%	(12)	6.7%	(9)	
ε3/ε4	27.2%	(76)	22.8%	(33)	31.9%	(43)	
ε4/ε4	3.6%	(10)	4.8%	(7)	2.2%	(3)	
ε2/ε4	0.7%	(2)	1.4%	(2)	0%	(0)	

* Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (quando as frequências mínimas esperadas foram menores do que 5)

Quando os indivíduos foram agrupados em portadores do alelo ε4 (genótipos ε4ε4; ε4ε3 e ε4ε2) ou não portadores (genótipos ε3ε3, ε2ε2 e ε3ε2), não houve diferença entre nenhum dos parâmetros analisados, exceto pelo colesterol total que foi maior no grupo portador de ε4, como esperado (**Tabela 6**). Os dados sobre PCR e citocinas não sugerem qualquer influência da presença do alelo ε4 no estado inflamatório desta população. A frequência de teste positivo para *SARSCoV-2* foi semelhante entre os grupos. Cerca de 12% desses indivíduos haviam sido vacinados com uma dose da vacina COVID-19 antes do início deste estudo e distribuídos de forma semelhante em grupos de portadores de ε4 e não portadores. Além disso, foram analisados os dados excluindo os indivíduos vacinados, e o resultado permaneceu inalterado em relação à população total. Dessa forma, esses indivíduos foram mantidos na análise principal.

Tabela 6. Análise de 280 indivíduos incluídos no estudo de acordo com a presença do alelo $\epsilon 4$

	Portador do alelo $\epsilon 4$		Valor P
	Não	Sim	
Sexo			
Masc	51.04% (98)	46.59% (41)	0.5213
Fem	48.96% (94)	53.41% (47)	
Idade (anos)	40.5 (7.0-90.0)	42.5 (19.0-80.0)	0.6610
Idade (faixa etária em anos)			
Adultos (18-59)	85.43% (129)	87.50% (56)	0.8637
Idosos (≥ 60)	14.57% (22)	12.5% (8)	
Cor da pele autorreferida (Classificação brasileira)			
Pardo	16.14% (31)	22.72% (20)	
Preto	42.18% (81)	34,10% (30)	
Branco	19,27% (37)	22.72% (20)	0.3211
Outros	2.08% (4)	4.54% (4)	
Não reportado	20.31% (39)	15,91% (14)	
IMC (kg/m²)	26.6 (16.0-51.5)	26.7(14.6-45.6)	0.8742
IMC Classificação[@]			
Baixo peso	1,04% (2)	2,38% (2)	
Eutrófico	35,41% (68)	33,33% (28)	0.8450
Sobrepeso	36,97% (71)	38,09% (32)	
Obesidade	26,56% (51)	26,19% (22)	
Número de Comorbidades			
0	56.54% (108)	52.27% (46)	
1	25.65% (49)	22.72% (20)	0.1762
2	7.32% (14)	15.90% (14)	
>2	10.47% (20)	9.09% (8)	
Perfil lipídico (mg/dl)			
Colesterol total	163.0 (104.0-235.0)	179.0(128.0-288)	0.0235
VLDL-c	20.0 (13.0-51.0)	24.5 (13.0-44.00)	0.0960
LDL-c	93.0 (49.0-155.0)	104.5 (52.0-203.0)	0.1009
HDL-c	42.0 (24.0-65.0)	49.5(30.0-85.0)	0.0717
Triglicérides	101.0 (49.0-354.0)	150.5 (44.0-369.0)	0.0967
Análise bioquímica			
Leucócitos (x10 ³ /mm ³)	6.9(1.8-18.3)	7.6(2.2-19.0)	0.2839
Hemoglobina (g/dl)	16.2 (8.7-22.8)	16.1(12.0-21.3)	0.7744
Plaquetas (x1000/mm ³)	167.5 (66.0-288.0)	180.0(29.0-340.0)	0.5306
PCR (mg/dl)	8.0 (4.0-153.6)	5.1(4.0-77.0)	0.3040
Citocinas (pg/ml)			

IL-1 β	0.62 (0.01-203.70)	0.44(0.01-226.30)	0.4039
IL-6	0.85(0.02-1149.0)	0.79(0.09-911.10)	0.7173
TNF	13.33(0.34-932.70)	7.49(1.17-406.80)	0.2275
IL-12 (p70)	0.75(0.03-109.00)	0.52(0.09-10.38)	0.7330
IFN- γ	5.82(0.07-109.00)	4.04(0.44-64.88)	0.9485
IL-4	0.66(0.03-109.00)	0.76(0.05-3.69)	0.8113
IL-10	1.68(0.04-154.20)	1.35(0.04-60.91)	0.8950
RT- PCR para <i>SARSCoV-2</i>			
Positivo	46,35% (89)	52,27% (46)	0.3701
Negativo	53,65% (103)	47,73% (42)	
Vacinados contra COVID-19			
Sim	13.61% (26)	7.95% (7)	0.2314
Não	86.39% (165)	92.05% (81)	

Dados em mediana (min-max) ou percentual (n). IMC: Índice de massa corporal. @ baixo peso (IMC<18.5 kg/m²), eutrófico (IMC:18.5-24.9 kg/m²), Sobrepeso (IMC: 25-29.9 kg/m²), obesidade (IMC: >30 kg/m²). Mann-Whitney para dados apresentados em mediana min-max e Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (quando as frequências mínimas esperadas foram menores do que 5) para os resultados apresentados em %(n). Valor P em destaque: significância (p<0.05).

O próximo passo foi avaliar se a isoforma Apo E4 poderia influenciar a COVID-19 ou outras síndromes semelhantes à gripe. Em relação ao grupo com síndrome semelhante à gripe, não foram encontradas diferenças entre portadores de $\epsilon 4$ e não portadores (**Tabela 7**). Nenhum indivíduo foi hospitalizado devido aos sintomas, que foram menos graves e intensos do que aqueles com COVID-19, e também devido à sobrecarga hospitalar na época e ao risco de contaminação pelo *SARSCoV-2*. No entanto, outras citocinas e o PCR foram semelhantes entre portadores e não portadores de $\epsilon 4$, apoiando os resultados da população total que não mostraram diferenças no padrão inflamatório dependente da presença de $\epsilon 4$.

Tabela 7. Análise de 145 indivíduos com Síndrome Gripal acordo com a presença do alelo $\epsilon 4$

	Portador do alelo $\epsilon 4$		Valor P
	Não (N=103)	Sim (n=42)	
Sexo			
Masculino	43% (44)	48% (20)	0,985
Feminino	57% (59)	52% (22)	
Idade (anos)	38 (17-86)	45 (19-73)	
Faixa etária			
Adulto (18-59)	85,4% (88)	85,7% (36)	0,999
Idosos (>_60)	14,6% (15)	14,3% (6)	

Cor da pele autorreferida (segundo a classificação brasileira) #			
Pardo	46% (47)	36% (15)	
Preto	21% (22)	29% (12)	
Branco	21% (22)	26% (11)	0,493
Outro	2% (2)	5% (2)	
Não relatado	10% (10)	5% (2)	
IMC (kg/m²)	25,36 (18,3 - 51,52)	26,71 (14,6-41,1)	
Classificação do IMC@			
Abaixo do peso	1% (1)	5% (2)	
Eutrófico	42% (43)	33% (14)	0,435
Sobrepeso	36% (37)	38% (16)	
Obesidade	21% (22)	24% (10)	
Número de comorbidades ¥			
0	58% (60)	52% (22)	
1	21% (22)	24% (10)	0,276
2	10% (10)	12% (5)	
>2	11% (11)	12% (5)	
Perfil lipídico (mg/dl)			
Colesterol total	175 (130-217)	233,5 (187-180)	0,190
VLDL-c	22,5 (14-51)	23,5 (23-24)	0,857
LDL-c	107 (62-132)	152 (101-203)	0,381
HDL-c	45 (35-65)	58 (54-62)	0,571
Triacilglicerol	126 (61-354)	118 (97-139)	0,471
Análise bioquímica			
Leucócito(x10 ³ /mm ³)	8,5 (3,8-18,3)	9,6 (4,8-19)	0,262
Hemoglobina (g/dl)	16 (9,9-18,2)	15,6 (12-21,2)	0,714
Plaqueta (x10 ³ /mm ³)	185 (71-288)	187 (50-340)	0,435
PCR (mg/dl)	19 (4-153,6)	4 (4-4)	0,151
Citocinas (pg/ml)			
IL-1b	0,48 (0,01-3,40)	0,28 (0,05-1,3)	0,104
IL-6	0,51 (0,02-209,4)	0,45 (0,09-36,34)	0,066
TNF	8,96 (0,34-381,2)	4,31 (1,2-53,53)	0,091
IL-12 (p70)	0,55 (0,03-35,13)	0,46 (0,09-5,17)	0,485
IFN-γ	3,50 (0,18-35,25)	2,92 (0,57-15,14)	0,236
IL-4	0,61 (0,16-2,99)	0,46 (0,14-1,75)	0,060
IL-10	1,09 (0,04-154,2)	0,89 (0,04-1,75)	0,464
Vacinados contra a COVID-19*			
Sim	11% (11)	5% (2)	0,276
Não	89% (92)	95% (40)	

Os dados são apresentados em mediana (min-max) ou porcentagem e (n). IMC: Índice corporal massa.# segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (<https://www.ibge.gov.br>), @baixo peso (IMC < 18,5 kg/m²), eutrófico (IMC: 18,5-24,9 kg/m²), sobrepeso (IMC: 25-29,9 kg/m²), obesidade (IMC: > 30 kg/m²). Teste U de Mann-Whitney para dados apresentados em mediana min-max e Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (quando

as frequências mínimas esperadas foram menores do que 5) para os resultados apresentados em %(n). *Valor de p* em negrito: significância estatística ($p < 0,05$). [‡] As principais comorbidades em $\epsilon 4$ não portadores e $\epsilon 4$ portadores, respectivamente, foram hipertensão (23,8% e 19,4%), doenças respiratórias (10,7% e 14,3%), diabetes (7,8% e 2,38%), doenças cardiovasculares (6,8% e 9,5%). * 5 pacientes receberam 2 doses, 5 receberam apenas 1 e 3 ficaram indecisos. Destes, 4 pacientes foram vacinados com AstraZeneca, 4 com CoronaVac (da Fiocruz, Brasil), 2 receberam Pfizer e 3 ficaram indecisos.

Na **Tabela 8** foram comparados somente os pacientes com COVID-19, de acordo com a presença ou ausência do alelo $\epsilon 4$. Assim como encontrado na população total e no grupo Síndrome gripal, não houve diferenças nos parâmetros analisados (exceto pelo colesterol total), incluindo estado inflamatório (**Tabela 8**).

Tabela 8. Análise de 135 indivíduos com COVID-19 de acordo com a presença ou não do alelo $\epsilon 4$

Variável	Portador de alelo $\epsilon 4$		Valor p
	Não (n=90)	Sim (n=45)	
Sexo, n (%)			
Feminino	36 (40,0)	24 (53,3)	0,148
Masculino	54 (60,0)	21 (46,7)	
Idade (anos), mediana (mín. – máx.)	44 (18 – 90)	39 (23 – 80)	0,208
Idade (adultos e idosos), n (%)			
Adulto	76 (84,4)	41 (91,1)	0,421
Idoso	14 (15,6)	4 (8,9)	
Raça/etnia, n (%)			
Branca	20 (22,2)	13 (28,9)	0,329
Parda	54 (60,0)	20 (44,4)	
Preta	14 (15,6)	10 (22,2)	
Amarela	2 (2,2)	1 (2,2)	
Indígena	0 (0,0)	1 (2,2)	
IMC (kg/m²), mediana (mín. – máx.)	27,5 (16,0 – 41,2)	26,9 (18,7 – 45,6)	
Estado nutricional, n (%)			
Baixo peso	1 (1,1)	0 (0,0)	0,800
Eutrófico	25 (27,8)	14 (31,1)	
Sobrepeso	35 (38,9)	19 (42,2)	
Obesidade	29 (32,2)	12 (26,7)	
Classificação clínica para COVID-19, n (%)			
Leve	56 (62,2)	33 (73,3)	0,433
Moderada	16 (17,8)	6 (13,3)	
Grave	18 (20,0)	6 (13,3)	
Desfecho clínico, n (%)			
Óbito	1 (1,1)	0 (0,0)	0,531
Alta hospitalar	86 (95,6)	42 (93,3)	

Desconhecido	3 (3,3)	3 (6,7)	
Dias de doença, mediana (mín. – máx.)	7 (1 – 18)	6 (2 – 19)	0,606
Dias de doença (por faixas), n (%)			
1 a 7 dias	52 (57,8)	29 (64,4)	
8 a 14 dias	29 (32,2)	12 (26,7)	0,765
Mais de 14 dias	9 (10,0)	4 (8,9)	
Dias de internação, mediana (mín. – máx.)	3 (1 – 9)	5 (2 – 7)	0,643
Presença de comorbidade ou doença crônica, n (%)			
Sim	42 (46,7)	21 (46,7)	1,000
Não	48 (53,3)	24 (53,3)	
Número de comorbidades por paciente, n (%)			
Sem comorbidades	49 (54,4)	24 (53,3)	
Uma comorbidade	27 (30,0)	10 (22,2)	0,377
Duas ou mais comorbidades	14 (15,6)	11 (24,4)	
Carga viral (Ct), mediana (mín. – máx.)	22 (13 – 35)	22 (15 – 26)	0,437
Contagem de células e análises séricas, mediana (mín. – máx.)			
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	149 (66 – 232)	168 (29 – 287)	0,235
Proteína C reativa(mg/dl)	6,0 (4,0 – 121,0)	4,0 (4,0 – 77,0)	0,438
Interleucina-1 beta (IL-1 β), pg/ml	0,7 (0,01 – 203,7)	0,7 (0,01 – 226,2)	0,947
Interleucina-4 (IL-4), pg/ml	0,8 (0,03 – 109,0)	0,8 (0,05 – 3,7)	0,300
Interleucina-6 (IL-6), pg/ml	2,4 (0,03 - 1148,6)	2,9 (0,2 – 911,1)	0,910
Interleucina-10 (IL-10), pg/ml	2,6 (0,04 – 109,0)	3,2 (0,2 – 60,9)	0,508
Interleucina-12 (IL-12(p70)), pg/ml	0,8 (0,03 – 109,0)	0,7 (0,09 – 10,4)	0,950
Interferon-gama (IFN- γ), pg/ml	8,0 (0,07 – 109,0)	7,2 (0,4 – 64,9)	0,972
Fator de necrose tumoral (TNF), pg/ml	15,9 (0,4 – 932,7)	9,9 (1,2 – 406,7)	0,678
Triglicerídeos, (mg/dl)	100,0 (49,0 – 274,0)	163,5 (44,0 – 369,0)	0,060
Colesterol total, (mg/dl)	162,0 (104,0 – 235,0)	176,0 (128,0 – 288,0)	0,029
Colesterol HDL, (mg/dl)	42,0 (24,0 – 61,0)	46,5 (30,0 – 85,0)	0,102
Colesterol LDL, (mg/dl)	92,0 (49,0 – 155,0)	104,5 (52,0 – 183,0)	0,123
Vacinação contra COVID-19			
Sim	16.9% (15)	10.9% (5)	0.448
Não	83.1% (74)	89.1% (41)	

Dados apresentados como n (%) ou mediana (min-max) ou número de indivíduos (% total), IMC: Índice de massa corporal. Classificação do IMC @ baixo peso (IMC <18.5 kg/m²), eutrófico (IMC:18.5-24.9 kg/m²), sobrepeso (IMC: 25-29.9 kg/m²), obesidade (IMC: >30 kg/m²). Ct: cycle threshold na RT-PCR. Interleucina (IL); IFN- γ : Interferon-gamma. TNF: Fator de necrose tumoral. Mann-Whitney para dados apresentados em mediana min-max e Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (quando as frequências mínimas esperadas foram menores do que 5) para os resultados apresentados em %(n). *Valor P em negrito*: significância estatística (p<0.05). [‡] Principais comorbidades em não portadores do alelo $\varepsilon 4$ e em portadores do $\varepsilon 4$ respectivamente foram hipertensão (22.5% e 15,2%), doenças respiratórias (15.7% e 10.9%), diabetes (4.5% e 4.3%), e doenças cardiovasculares (4.5% e 13%). * 16 pacientes receberam 1 dose, 1 recebeu apenas 2 doses, 1 recebeu 4 doses e

2 não tinham certeza. Destes, 9 pacientes foram vacinados com AstraZeneca, 6 com CoronaVac (da Fiocruz, Brasil), 1 recebeu Pfizer e 4 não tinham certeza.

Em seguida, foram analisadas as correlações entre as variáveis estudadas na amostra total. O genótipo Apo E não foi significativamente correlacionado com nenhuma das variáveis avaliadas. Os dias de doença, por sua vez, foram positivamente correlacionados com a idade, número de comorbidades e níveis de quase todas as citocinas, exceto IL-4 (**Tabela 9**).

Tabela 9. Principais correlações entre APOE e Dias de doença com as características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais no total de pacientes do estudo

	Genótipo de Apo E		Dias de doença	
	coeficiente	valor p	coeficiente	valor p
Sexo	0,057	0,346	0,022	0,719
Idade	0,042	0,486	0,242	<0,0001
Cor da pele autorrelatada	-0,017	0,778	-0,006	0,926
Índice de massa corporal	0,047	0,440	0,099	0,100
Genótipo de Apo E	-	-	0,043	0,591
Dias de Doença	-0,015	0,805	-	-
Número de comorbidades	-0,015	0,802	0,178	0,003
Proteína C reativa	-0,029	0,844	0,082	0,569
IL-1 β	-0,006	0,942	0,227	0,004
IL-4	-0,086	0,283	0,088	0,268
IL-6	0,016	0,839	0,338	<0,0001
IL-10	0,043	0,591	0,388	<0,0001
IL-12 (p70)	0,108	0,175	0,305	<0,0001
IFN- γ	-0,010	0,898	0,266	0,001
TNF	0,084	0,336	0,304	<0,0001

Concentração de Interleucina (IL), IFN- γ (Interferon-gama). TNF: (Fator de necrose tumoral). PCR: Proteína C-reativa. Correlação de Spearman. *Valor de p em negrito*: significância estatística ($p < 0,05$).

Quando os pacientes com COVID-19 foram analisados separadamente, a presença do alelo $\epsilon 4$ não foi correlacionada com nenhuma variável clínica (classificação da COVID-19, desfecho clínico, dias de doença, número de comorbidades, dias de hospitalização e carga viral), exceto com o colesterol total (**Tabela 10**). No entanto, a gravidade da COVID-19 foi

negativamente correlacionada com o valor de Ct e positivamente correlacionada com o gênero (maior gravidade em homens), idade, IMC e níveis de PCR, IL-6, IL-10 e IL-12 (**Tabela 10**).

Tabela 10. Correlações entre características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes com COVID-19

	Presença do alelo ϵ 4		Gravidade da COVID-19	
	Coefficiente de Correlação	Valor P	Coefficiente de Correlação	Valor P
Gênero	0,126	0,144	0,273	0,001
Idade	0,109	0,209	0,196	0,023
IMC	0,026	0,765	0,319	<0,0001
Presença do alelo ϵ 4			0,111	0,200
Gravidade da COVID-19	0,111	0,200		
Ct Valor	0,167	0,426	-0,410	0,042
Dias de Doença	0,045	0,608	0,502	<0,0001
Número de comorbidades	0,027	0,758	0,071	0,413
PCR	0,117	0,444	0,449	0,002
IL-1β	0,007	0,947	0,123	0,236
IL-4	0,107	0,303	-0,152	0,141
IL-6	0,012	0,910	0,257	0,011
IL-10	0,068	0,511	0,357	<0,0001
IL-12 (p70)	0,006	0,951	0,423	<0,0001
IFN-γ	0,004	0,973	0,146	0,154
TNF	0,046	0,680	0,197	0,076
Triacilglicerol	0,260	0,060	-0,051	0,718
Colesterol total	0,303	0,027	-0,051	0,718
HDL- colesterol	0,227	0,102	0,115	0,412
LDL- colesterol	0,214	0,124	-0,088	0,530

IMC: Índice de Massa Corporal. IL-1 β : Interleucina-1 beta. IL-4: Interleucina-4. IL-6: Interleucina-6. IL-10: Interleucina-10. IL-12: Interleucina-12. IFN- γ : Interferon-gama. TNF: Fator de necrose tumoral. PCR: Proteína C-reativa. Correlação de Spearman. Valor de p em negrito: significância estatística (p<0,05).

Nas análises univariada ou multivariada, as chances de desenvolver formas mais graves de COVID-19 não foram significativamente alteradas pela presença do alelo ϵ 4 (**Tabela 11**). No entanto, revelou-se que homens com IMC mais alto têm maior chance de desenvolver COVID-19 moderada/grave (OR: 3,32 e 1,16, respectivamente); enquanto níveis mais altos de IL-4 diminuem a chance (OR: 0,49) de estar no grupo mais grave. Na análise multivariada,

incluindo no modelo sexo, idade, IMC, número de comorbidades e nível de IL-4, a chance de homens com IMC mais alto desenvolverem doença moderada ou grave foi ainda mais significativa (OR: 5,53 e 1,17, respectivamente). Além disso, também foi descoberto que quanto maior o número de comorbidades, maior a chance de COVID-19 moderada/grave (OR: 4,10). Mais uma vez, o nível de IL-4 foi o único fator de proteção que reduziu as chances de formas mais graves de COVID-19 (OR: 0,34).

Tabela 11. Razões de chances de dados brutos e ajustados para gravidade clínica da COVID-19 aplicando regressão logística binomial.

	Leve (referência)	Moderado / Grave Dados brutos		Moderado / Grave Ajustado *	
		OR (IC 95%)	Valor P	OR (IC 95%)	Valor P
Portador do Alelo $\epsilon 4$	1	0,59 (0,27-1,31)	0,201		
Sexo masculino	1	3,32 (1,52-7,23)	0,003	5,53 (1,45-21,04)	0,012
Idade	1	1,02 (0,99-1,05)	0,076		
IMC	1	1,16 (1,07-1,25)	<0,001	1,17 (1,05-1,32)	0,006
Comorbidades	1	1,83 (0,89-3,75)	0,101	4,10 (1,13-14,91)	0,032
PCR	1	1,14 (0,94-1,39)	0,179		
Colesterol total	1	0,99 (0,96-1,02)	0,591		
LDL-c	1	0,98 (0,94-1,03)	0,468		
IL-1 β	1	0,99 (0,97-1,00)	0,064		
IL-4	1	0,49 (0,29-0,86)	0,013	0,34 (0,16-0,69)	0,003
IL-6	1	1,00 (0,99-1,00)	0,725		
IL-10	1	1,00 (0,97-1,03)	0,948		
IL-12	1	0,99 (0,94-1,04)	0,619		
IFN- γ	1	0,99 (0,97-1,02)	0,698		
TNF	1	0,99 (0,99-1,00)	0,612		

* Regressão logística binomial. Modelo ajustado :sexo, IMC, número de comorbidades e IL-4. OR odds ratio, IC: intervalo de confiança de 95%. IMC: Índice de Massa Corporal. IL-1 β : Interleucina-1 beta. IL-4: Interleucina-4. IL-6: Interleucina-6. IL-10: Interleucina-10. IL-12: Interleucina-12. IFN- γ : Interferon-gama. TNF : Fator de necrose tumoral. PCR: Proteína C-reativa . *Valor de p* em negrito: significância estatística ($p < 0,05$).

O artigo referente a este estudo já foi publicado na revista *Journal of Medical Microbiology (Anexo 1)*.

6. DISCUSSÃO

Este estudo investigou se a frequência de genótipos contendo o alelo $\epsilon 4$ estava relacionada à maior gravidade de síndromes semelhantes à gripe e COVID-19. Foi também examinado se a presença do alelo $\epsilon 4$ estava associada a uma resposta inflamatória aumentada em síndromes semelhantes à gripe e na COVID-19. Os resultados não mostraram nenhuma diferença na frequência do alelo $\epsilon 4$ na população total estudada assim como nos grupos de pacientes que testaram negativo (SG) ou positivo para COVID-19. A única exceção observada naqueles portadores do alelo 4 foi seu impacto nos níveis de colesterol, corroborando o que já havia sido mostrado em estudos prévios (6, 138, 139).

Vários estudos abordaram a associação entre a presença do alelo $\epsilon 4$ e a incidência ou, em menor proporção, na gravidade da COVID-19 (79, 90, 140). A incidência não foi avaliada no presente estudo, pois todos os indivíduos apresentaram sintomas semelhantes aos de COVID-19. Em vez disso, o estudo foi direcionado à gravidade da doença. No entanto, observamos que entre os indivíduos com sintomas gripais, a frequência do alelo $\epsilon 4$ não foi diferente naqueles positivos ou negativos para COVID-19 pelo teste de RT-PCR. Além disso, a distribuição do genótipo de Apo E no presente estudo estava no equilíbrio de Hardy-Weinberg, sugerindo uma distribuição semelhante à esperada. A frequência do alelo $\epsilon 4$ varia de acordo com a região do mundo, sendo mais frequente em africanos (30 a 40%) do que em europeus (7 a 20%) e asiáticos (5 a 15%) (12). Há pesquisas limitadas sobre genotipagem de Apo E no Brasil, com a maioria dos estudos focando na população idosa. No entanto, a prevalência do alelo $\epsilon 4$ varia entre 9% e 32%, dependendo da região do país (13-15, 141). Essa distribuição também é comparável à população britânica incluída no biobanco do Reino Unido (142). Em relação à influência da Apo E na gravidade da COVID-19, uma meta-análise de Chen e colaboradores (140) concluiu que a Apo E4 estava ligada à gravidade da COVID-19 com base em 5 estudos publicados. Um foi realizado na população brasileira e compreendeu indivíduos com manifestações neurológicas de COVID-19 longa (143), o que difere um pouco da população do nosso estudo que não abordou casos de COVID-19 longa. Os resultados não mostraram diferenças significativas entre os grupos em relação aos genótipos ou alelos específicos. Kuo e colaboradores publicaram estudos sobre a associação entre as isoformas de Apo E e COVID-19 com base no registro do UK Biobank (UKB) (79, 81). O UKB é uma coorte comunitária com idade no momento do estudo de Kuo entre 48 e 86 anos. Naquela época, os testes laboratoriais de COVID-19 na Inglaterra eram restritos a pacientes hospitalizados com

sinais clínicos de infecção e, portanto, a positividade do teste era considerada um marcador de infecção grave por COVID-19. Eles encontraram um risco 2 vezes maior de COVID-19 grave para aqueles portadores do genótipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ versus $\epsilon 3/\epsilon 3$ (8) e um aumento de 4 vezes na mortalidade após teste positivo para COVID-19 (9), independentemente de condições pré-existentes, como demência, doença cardiovascular e diabetes tipo 2. No entanto, é importante observar que os resultados de Kuo e colegas são válidos apenas para o genótipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ e obtidos em uma população mais velha (média de 68 anos) do que no presente estudo (40,5 anos). Nenhuma associação de gravidade ou mortalidade de COVID-19 foi observada em portadores de $\epsilon 3/\epsilon 4$ no estudo de Kuo. No presente estudo, apenas 10 indivíduos (3,5%), sendo apenas 3 no grupo COVID-19 (2,2%), foram genotipados como $\epsilon 4/\epsilon 4$, uma distribuição percentual semelhante ao UKB. No entanto, devido ao menor tamanho da amostra no presente estudo, não foi possível explorar adequadamente o efeito do $\epsilon 4$ como homocigoto na gravidade da COVID-19. No entanto, encontramos mais $\epsilon 4$ homocigotos no grupo negativo para COVID-19 (4,8%) do que no positivo (2,2%). Os resultados do UKB sugerem que não há efeitos de dosagem genética e enfatizam que herdar duas cópias $\epsilon 4$ é necessário para adquirir esse risco genético (144). Como mais de 90% dos portadores de $\epsilon 4$ no presente estudo eram heterocigotos, podemos assumir que os achados deste estudo estão de acordo com os de Kuo e colaboradores, apoiando a ideia de que o genótipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ não é um fator relevante para a gravidade da COVID-19.

Como a isoforma Apo E não estava relacionada à COVID-19 no presente estudo, outros possíveis fatores que influenciam a gravidade foram avaliados. Em relação a outros fatores de risco, foi observado que a duração da doença estava relacionada à idade, número de comorbidades e marcadores inflamatórios. A análise multivariável revelou que as chances de desenvolver formas mais graves de COVID-19 não estavam associadas à isoforma Apo E, mas aumentaram em indivíduos do sexo masculino mais velhos com IMC mais alto e maior número de comorbidades. Essa análise de regressão encontrou uma razão de chances OR = 5,56 apontando que homens têm mais chances de desenvolver doença moderada ou grave. Essa descoberta está alinhada com estudos anteriores que destacam uma associação mais forte entre a gravidade da COVID-19 e a mortalidade em homens (145, 146), atribuída a um perfil mais pró-inflamatório no sexo masculino. No entanto, a intensidade dessa diferença varia de acordo com a idade (147). O gene da ECA2, alvo para o *SARS-CoV-2*, está localizado no cromossomo X, sugerindo que o sexo pode influenciar a suscetibilidade e a gravidade da doença (148). Variações na metilação do cromossomo X podem levar à inativação do gene ECA2, com

estudos indicando que o sexo pode afetar a metilação aberrante do promotor ECA2, potencialmente explicando por que os homens correm maior risco de COVID-19 (149). Os padrões de metilação também podem diferir entre cromossomos sexuais e cromossomos autossômicos à medida que os indivíduos envelhecem(150). Os idosos enfrentam maiores riscos de gravidade e morbidade da COVID-19, e os homens, independentemente da idade, têm maior risco de mortalidade (151). Historicamente, diferenças de sexo foram observadas em relação à gravidade para várias infecções por vírus (150), sugerindo potenciais fatores biológicos em jogo. Além disso, diferenças na resposta imunológica entre homens e mulheres podem contribuir para essas disparidades. Apoiando essa noção, um modelo murino de COVID-19 mostrou que os do sexo masculino eram mais suscetíveis à infecção pelo Coronavírus, exibindo maior carga viral e aumento das respostas inflamatórias pulmonares (152).

Mais de 50% da população neste estudo estava com sobrepeso ou obesidade, e no grupo COVID-19 o IMC mais alto foi associado a maiores chances de resultados graves da doença. A obesidade contribui para manifestações mais graves da COVID-19, e além disso, maiores taxas de mortalidade são observadas em indivíduos com obesidade, particularmente aqueles em terapia intensiva (126) e pacientes jovens (128). Estudos anteriores que avaliaram a associação entre IMC e COVID-19 indicam que pacientes com $IMC > 40 \text{ kg/m}^2$ apresentam maior morbidade (129-131), e aqueles com $IMC > 45 \text{ kg/m}^2$ têm uma razão de chances de 4,18 para casos graves, mesmo após o ajuste para comorbidades(129). Esse risco aumentado está relacionado a fatores como fisiologia pulmonar restritiva, apneia do sono, diabetes e dislipidemia, juntamente com disfunção imunológica e inflamação aumentada(132). Além disso, o tecido adiposo excessivo tem alta expressão do receptor ECA 2, facilitando a entrada do *SARS-CoV-2* e potencialmente servindo como um reservatório viral, o que pode prolongar a disseminação da infecção(133).

Comorbidades foram observadas em 45% da população total e 53% do grupo COVID-19. O número de comorbidades aumentou as chances de COVID-19 moderada/grave (OR: 4,1). Este é um fator de risco bem conhecido observado em vários estudos anteriores (153-155). Como visto no presente estudo, hipertensão, doenças respiratórias, diabetes e doenças cardiovasculares são as comorbidades mais frequentemente associadas relacionadas à hospitalização e mortalidade (156).

A análise de regressão multivariada também identificou a IL-4 como o único fator ligado à redução da chance de desenvolver manifestações mais graves da doença OR: 0,34. O papel preciso da IL-4 na progressão da COVID-19 permanece obscuro. Embora alguns estudos não

tenham encontrado uma correlação entre IL-4 e o curso desta doença (60, 157-159), outros concordam com este resultado(53, 160-162), sugerindo que a IL-4 poderia ser reduzida por meio da resposta Th2 em pacientes em recuperação da infecção por COVID-19. A IL-4 pode estar envolvida na resolução da infecção por COVID-19, atuando no mecanismo de reparação induzido pela ativação de macrófagos M2 desencadeados pela resposta Th2 e linfócitos TCD4+. A IL-4 também pode influenciar a diferenciação de células T em respostas do tipo Th1 e Th2 (estimulando Th2 e inibindo a Th1), modulando a proliferação e produção de citocinas em linfócitos CD8+, atuando no processo de resolução da COVID-19 (161). A IL-4 inibe a produção do interferon Th1 e Th-17, reduzindo a hiperinflamação na COVID-19 grave e ajudando no processo de resolução da doença. Os autores também encontraram uma diferença nos níveis de IL-4 relacionados à gravidade da COVID (53, 161) e duração ao longo de dez dias da doença (162).

O resultado da análise de correlação confirmou que o aumento de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ) e a citocina anti-inflamatória IL-10 estão associadas a um risco maior de doença mais grave no presente estudo. Citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF são secretadas principalmente por células Th1, macrófagos ativados e células dendríticas, desempenhando papéis na ativação de células imunes. Células T reguladoras (Tregs), células Th2, macrófagos ativados e monócitos são as principais fontes de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 examinadas neste estudo. Outros estudos encontraram a associação entre IFN- γ (162), TNF(64, 163, 164) e das citocinas IL-6(60) e IL-10 com a gravidade e maior mortalidade da COVID-19(56). Sabe-se que a IL-6 é um mediador inflamatório com natureza pleiotrópica, altamente produzido durante o estágio inicial da inflamação e ativa múltiplos reagentes inflamatórios de fases agudas. Em pacientes com COVID-19, a IL-6 é produzida em resposta a antígenos de vários tipos de células imunes, e uma série de estudos clínicos mostraram que o nível sérico de IL-6 circulante foi significativamente mais alto entre os pacientes com COVID-19 do estágio grave ao crítico(165-167). A IL-10 exerce efeitos anti-inflamatórios que controlam respostas imunes graves do hospedeiro em relação aos antígenos, reduzindo múltiplas funções de células T e células NK. No entanto, a desregulação na concentração de IL-10 pode influenciar a resposta imune e a gravidade de pacientes infectados por *SARS-CoV-2*(168). Níveis aumentados de IL-10 estão associados a aumento de expressão de marcadores de exaustão de células T, como o PD-1 e Tim-3, em pacientes com COVID-19 podendo desencadear conseqüentemente uma capacidade prejudicada de eliminar infecções virais, especialmente em indivíduos gravemente afetados(169). Vários estudos mostraram evidências de que tanto a IL-6 quanto a IL-10 estão

positivamente relacionadas à gravidade e mortalidade da COVID-19(168, 170, 171). Uma metanálise encontrou associação de aumento de TNF e gravidade da COVID-19 em 6 estudos envolvendo 956 pacientes(170). O TNF em conjunto com a IL-6 e Il-10 pode provocar a linfopenia encontrada em casos graves de COVID-19 devido a sua efeitos inibitórios(172). Sabe-se ainda que a resposta tardia do interferon tipo I (IFN) em infecções por *SARSCoV-2* foi associada a formas graves da doença (65, 173), resultando em rápida multiplicação do vírus e hiperinflamação com ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e “natural killers” nos pulmões que podem então desencadear a tempestade de citocinas. A linfocitopenia e a tempestade de citocinas pró-inflamatórias podem ser consideradas os contribuintes mais críticos para os resultados clínicos adversos em pacientes com COVID-19 (170). A Il-12 também pode exercer um papel pro-inflamatório na COVID-19. Produzida por células apresentadoras de antígenos (como células dendríticas e macrófagos), ela estimula a produção de IFN- γ por células NK e linfócitos Th1, promove a diferenciação de células T virgens em células T do tipo Th1 e contribui para a ativação de células T citotóxicas (CD8+) e NK, reforçando a imunidade antiviral(174). No contexto da COVID-19 grave, especialmente nos pacientes que desenvolvem a tempestade de citocinas, pode haver produção excessiva ou desregulada de várias citocinas, incluindo a IL-12, IL-6, TNF- α , e IL-1 β . Estudos demonstraram níveis elevados de IL-12 em pacientes com COVID-19 grave contribuindo para o circuito de amplificação inflamatória(170, 175). Apesar disso, no presente estudo, nas análises univariada e multivariada a IL-4 foi a única citocina associada a menores chances de desenvolver COVID-19 grave. É importante ressaltar que as citocinas apresentam uma grande variabilidade interindividual e suas funções e liberação dependem de múltiplos sinais, diferentes alvos celulares, fatores fisiológicos e de estilo de vida. Assim, é particularmente desafiador avaliar a capacidade diagnóstica das citocinas devido à dificuldade de estabelecer níveis de corte de citocinas (176).

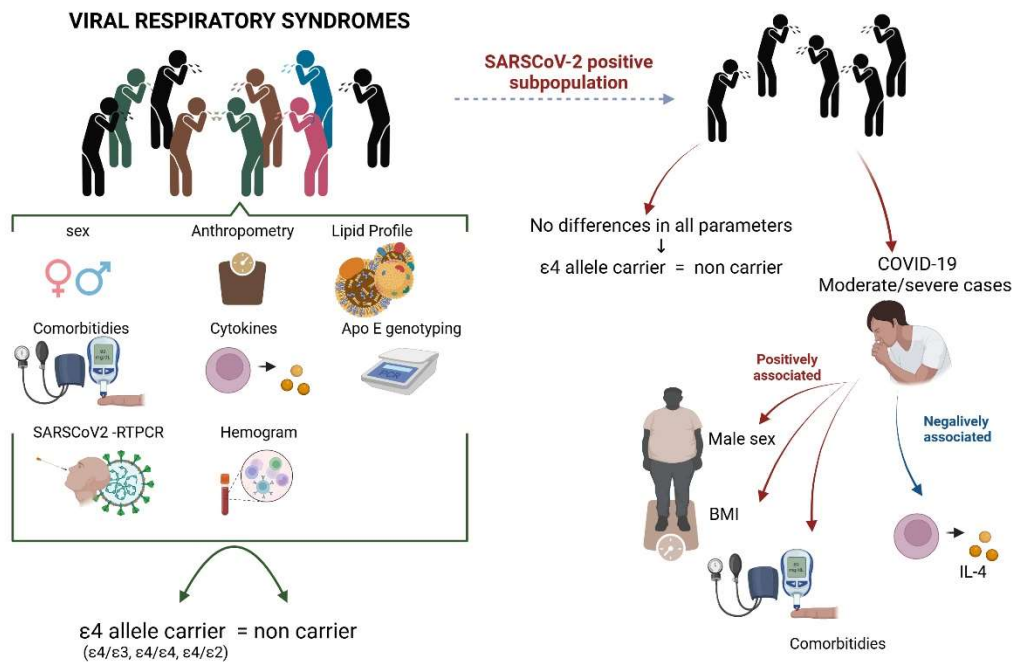
Uma correlação fraca, mas significativa, foi observada entre a gravidade da COVID-19 e a idade. Além da prevalência de comorbidades como diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares e renais em idosos, o declínio na depuração de partículas inaladas das pequenas vias aéreas com a idade (177) pode contribuir para a maior prevalência de doenças respiratórias em idosos. A função ciliar alterada pode dificultar a remoção eficaz do *SARS-CoV-2* (178). Além disso, o tamanho das vias aéreas superiores diminui com a idade. Essa mudança é mais pronunciada em homens e indivíduos com obesidade (179), e o aumento do volume da cavidade nasal bem como a diminuição da resistência nasal em adultos mais velhos (180) podem explicar a maior prevalência de COVID-19 nessa população. A COVID-19 também interrompe

e resregula o sistema renina-angiotensina-aldosterona ao ligar sua proteína spike ao receptor ECA2, prejudicando sua função original de produção da angiotensina 1-7 com efeitos antiinflamatórios e vasodilatadores, em contraregulação da angiotensina II que tem, portanto seus efeitos exacerbados como inflamação, trombose e vasoconstrição, mecanismos que levam a um quadro clínico mais grave na COVID-19. Níveis mais baixos de ECA2 em pacientes idosos estão associados a gravidade da COVID-19 (181) pois com menos ECA2 disponível, e ainda ocupada pelo vírus, ocorre a hiperinflamação provocada pelos efeitos exacerbados da angiotensina II. Consequentemente, pacientes idosos frequentemente apresentam sintomas mais agressivos de COVID-19 e correm maior risco de desenvolver síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (182, 183). Do ponto de vista imunológico há uma tendência a redução e disfunção dos linfócitos T reguladores com o envelhecimento(184) e essa alteração também pode ser encontrada nos indivíduos portadores de obesidade(185). Estudos apontam que os pacientes idosos com COVID-19 grave tem mais disfunção de linfócitos(186). E isso poderia explicar a correlação da idade avançada com a gravidade da doença.

7. CONCLUSÃO

Nossos achados indicam que o alelo $\epsilon 4$ não afeta as características clínicas das síndromes semelhantes à gripe e não é crucial na progressão clínica da COVID-19. Analisando outros fatores envolvidos especificamente na gravidade da COVID-19, descobrimos que o índice de massa corporal, o sexo masculino e o número de comorbidades associadas foram os fatores que aumentaram a chance de desenvolver uma forma mais grave de COVID-19. Ao mesmo tempo, a IL4 foi o único fator que reduziu as chances das formas mais graves. Os principais achados foram ilustrados na figura 6.

Figura 6. Principais conclusões do estudo



8. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Este estudo tem algumas limitações: não exploramos variantes do *SARS-CoV-2* e a possível influência dos alelos Apo E em cada uma delas. Além disso, os indivíduos no grupo de síndromes semelhante à gripe não foram submetidos a nenhum teste para avaliar sua etiologia. Ademais, o pequeno número de indivíduos $\epsilon 4/\epsilon 4$ impediu quaisquer conclusões sobre a gravidade da COVID-19 ou outras síndromes semelhantes à gripe para indivíduos homocigotos $\epsilon 4$. É importante ressaltar que este estudo não incluiu um acompanhamento mais longo de pacientes para avaliar a COVID longo (envolvendo várias complicações neurológicas que o alelo $\epsilon 4$ poderia influenciar). Também é sabido que há muitos outros polimorfismos associados à COVID-19 (187-189) e síndromes gripais(190) que não foram explorados no presente estudo. Há também a possibilidade de agrupamento de genes e pleiotropias de Apo E4 que podem mediar múltiplas morbidades que podem influenciar sintomas de síndromes gripais (4). Portanto, estudos futuros são necessários para determinar se esses aspectos genéticos podem interferir no perfil de alelos de Apo E e aumentar a gravidade da COVID-19. Apesar das limitações, este estudo é inovador ao considerar a inclusão de síndromes semelhantes à gripe no contexto de nossa análise. Geralmente, os estudos de influência da Apo E focam na COVID-19 ou outras síndromes gripais, comparando-as com a população total não afetada ou

restringindo o estudo a apenas um vírus. Além disso, a maioria dos estudos publicados foi retrospectiva, enquanto este é um estudo prospectivo que acompanhou os pacientes durante o curso da infecção e no pico da pandemia de COVID-19. Há dados limitados não apenas sobre a isoforma Apo E, mas também sobre outros fatores que influenciam a COVID-19 e citocinas inflamatórias durante a pandemia no Brasil, apesar de sua importância e gravidade significativas neste país, que ocupa o quinto lugar em casos notificados e o segundo em termos de mortes por COVID-19 no mundo. Isso torna esse trabalho relevante para o levantamento de dados com populações brasileiras.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Finch CE, Sapolsky RM. The evolution of Alzheimer disease, the reproductive schedule, and apoE isoforms. *Neurobiol Aging*. 1999;20(4):407-28.
2. Kockx M, Traini M, Kritharides L. Cell-specific production, secretion, and function of apolipoprotein E. *J Mol Med (Berl)*. 2018;96(5):361-71.
3. Hasty AH, Linton MF, Brandt SJ, Babaev VR, Gleaves LA, Fazio S. Retroviral gene therapy in ApoE-deficient mice: ApoE expression in the artery wall reduces early foam cell lesion formation. *Circulation*. 1999;99(19):2571-6.
4. Finch CE, Kulminski AM. The ApoE Locus and COVID-19: Are We Going Where We Have Been? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2021;76(2):e1-e3.
5. Huebbe P, Rimbach G. Evolution of human apolipoprotein E (APOE) isoforms: Gene structure, protein function and interaction with dietary factors. *Ageing Res Rev*. 2017;37:146-61.
6. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S183-8.
7. Charlesworth B. Evolution of senescence: Alzheimer's disease and evolution. *Curr Biol*. 1996;6(1):20-2.
8. Fullerton SM, Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, Taylor SL, Stengård JH, et al. Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism. *Am J Hum Genet*. 2000;67(4):881-900.
9. Huang Y. Mechanisms linking apolipoprotein E isoforms with cardiovascular and neurological diseases. *Curr Opin Lipidol*. 2010;21(4):337-45.
10. Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science*. 1991;252(5014):1817-22.
11. Dong LM, Parkin S, Trakhanov SD, Rupp B, Simmons T, Arnold KS, et al. Novel mechanism for defective receptor binding of apolipoprotein E2 in type III hyperlipoproteinemia. *Nat Struct Biol*. 1996;3(8):718-22.
12. Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann Hum Genet*. 1999;63(Pt 4):301-10.
13. Souza DR, Nakachima L, Biagioni RB, Nakazone MA, Pinhel MA, Trindade DM, et al. Relevance of apolipoprotein E4 for the lipid profile of Brazilian patients with coronary artery disease. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40(2):189-97.

14. Demarchi DA, Salzano FM, Altuna ME, Fiegenbaum M, Hill K, Hurtado AM, et al. APOE polymorphism distribution among Native Americans and related populations. *Ann Hum Biol.* 2005;32(3):351-65.
15. Arrifano GPF, Alvarez-Leite JI, Souza-Monteiro JR, Augusto-Oliveira M, Paraense R, Macchi BM, et al. In the Heart of the Amazon: Noncommunicable Diseases and Apolipoprotein E4 Genotype in the Riverine Population. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(9).
16. Sing CF, Davignon J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *Am J Hum Genet.* 1985;37(2):268-85.
17. Granér M, Kahri J, Varpula M, Salonen RM, Nyssönen K, Jauhiainen M, et al. Apolipoprotein E polymorphism is associated with both carotid and coronary atherosclerosis in patients with coronary artery disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008;18(4):271-7.
18. Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(2):106-18.
19. Walter JM. Other Respiratory Viruses as a Cause of Community-Acquired Pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med.* 2020;41(4):579-91.
20. Javanian M, Barary M, Ghebrehewet S, Koppolu V, Vasigala V, Ebrahimpour S. A brief review of influenza virus infection. *J Med Virol.* 2021;93(8):4638-46.
21. Maines TR, Szretter KJ, Perrone L, Belser JA, Bright RA, Zeng H, et al. Pathogenesis of emerging avian influenza viruses in mammals and the host innate immune response. *Immunol Rev.* 2008;225:68-84.
22. Louie JK, Acosta M, Samuel MC, Schechter R, Vugia DJ, Harriman K, et al. A novel risk factor for a novel virus: obesity and 2009 pandemic influenza A (H1N1). *Clin Infect Dis.* 2011;52(3):301-12.
23. Neidich SD, Green WD, Rebeles J, Karlsson EA, Schultz-Cherry S, Noah TL, et al. Increased risk of influenza among vaccinated adults who are obese. *Int J Obes (Lond).* 2017;41(9):1324-30.
24. Smith AG, Sheridan PA, Harp JB, Beck MA. Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. *J Nutr.* 2007;137(5):1236-43.
25. Cun W, Jiang J, Luo G. The C-terminal alpha-helix domain of apolipoprotein E is required for interaction with nonstructural protein 5A and assembly of hepatitis C virus. *J Virol.* 2010;84(21):11532-41.
26. Gao P, Ji M, Liu X, Chen X, Liu H, Li S, et al. Apolipoprotein E mediates cell resistance to influenza virus infection. *Sci Adv.* 2022;8(38):eabm6668.
27. Ellinghaus D, Degenhardt F, Bujanda L, Buti M, Albillos A, Invernizzi P, et al. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *N Engl J Med.* 2020;383(16):1522-34.
28. Kurki SN, Kantonen J, Kaivola K, Hokkanen L, Mäyränpää MI, Puttonen H, et al. APOE ϵ 4 associates with increased risk of severe COVID-19, cerebral microhaemorrhages and post-COVID mental fatigue: a Finnish biobank, autopsy and clinical study. *Acta Neuropathol Commun.* 2021;9(1):199.
29. (worldometers.info) CL-CS-W. COVID Live - Coronavirus Statistics 2022 [Available from: COVID Live - Coronavirus Statistics - Worldometer (worldometers.info)].
30. Teuwen LA, Geldhof V, Pasut A, Carmeliet P. COVID-19: the vasculature unleashed. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(7):389-91.
31. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020;181(2):271-80.e8.
32. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020;367(6483):1260-3.

33. Song R, Preston G, Yosypiv IV. Ontogeny of angiotensin-converting enzyme 2. *Pediatr Res.* 2012;71(1):13-9.
34. Cevik M, Kuppalli K, Kindrachuk J, Peiris M. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ.* 2020;371:m3862.
35. Wang K, Chen W, Zhang Z, Deng Y, Lian JQ, Du P, et al. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):283.
36. Ibrahim IM, Abdelmalek DH, Elshahat ME, Elfiky AA. COVID-19 spike-host cell receptor GRP78 binding site prediction. *J Infect.* 2020;80(5):554-62.
37. Davies J, Randeve HS, Chatha K, Hall M, Spandidos DA, Karteris E, et al. Neuropilin-1 as a new potential SARS-CoV-2 infection mediator implicated in the neurologic features and central nervous system involvement of COVID-19. *Mol Med Rep.* 2020;22(5):4221-6.
38. Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med.* 2020;46(4):586-90.
39. Li H, Liu L, Zhang D, Xu J, Dai H, Tang N, et al. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. *Lancet.* 2020;395(10235):1517-20.
40. 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. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):727-32.
41. Miners S, Kehoe PG, Love S. Cognitive impact of COVID-19: looking beyond the short term. *Alzheimers Res Ther.* 2020;12(1):170.
42. Teuwen LA, Geldhof V, Pasut A, Carmeliet P. Author Correction: COVID-19: the vasculature unleashed. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(7):448.
43. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(10):803-15.
44. Park SH. An Impaired Inflammatory and Innate Immune Response in COVID-19. *Mol Cells.* 2021;44(6):384-91.
45. Varga Z. [Endotheliitis in COVID-19]. *Pathologe.* 2020;41(Suppl 2):99-102.
46. Galani IE, Rovina N, Lampropoulou V, Triantafyllia V, Manioudaki M, Pavlos E, et al. Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison. *Nat Immunol.* 2021;22(1):32-40.
47. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):363-74.
48. Brodin P. Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity. *Nat Med.* 2021;27(1):28-33.
49. Shimabukuro-Vornhagen A, Gödel P, Subklewe M, Stemmler HJ, SchlöBer HA, Schlaak M, et al. Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):56.
50. Zhang X, Tan Y, Ling Y, Lu G, Liu F, Yi Z, et al. Viral and host factors related to the clinical outcome of COVID-19. *Nature.* 2020;583(7816):437-40.
51. Han H, Ma Q, Li C, Liu R, Zhao L, Wang W, et al. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):1123-30.
52. Luo Y, Mao L, Yuan X, Xue Y, Lin Q, Tang G, et al. Prediction Model Based on the Combination of Cytokines and Lymphocyte Subsets for Prognosis of SARS-CoV-2 Infection. *J Clin Immunol.* 2020;40(7):960-9.
53. Cabaro S, D'Esposito V, Di Matola T, Sale S, Cennamo M, Terracciano D, et al. Cytokine signature and COVID-19 prediction models in the two waves of pandemics. *Sci Rep.* 2021;11(1):20793.
54. Aziz M, Fatima R, Assaly R. Elevated interleukin-6 and severe COVID-19: A meta-analysis. *J Med Virol.* 2020;92(11):2283-5.
55. Chen X, Zhao B, Qu Y, Chen Y, Xiong J, Feng Y, et al. Detectable Serum Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load (RNAemia) Is Closely Correlated With Drastically

- Elevated Interleukin 6 Level in Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2020;71(8):1937-42.
56. Jafrin S, Aziz MA, Islam MS. Elevated Levels of Pleiotropic Interleukin-6 (IL-6) and Interleukin-10 (IL-10) are Critically Involved With the Severity and Mortality of COVID-19: An Updated Longitudinal Meta-Analysis and Systematic Review on 147 Studies. *Biomark Insights.* 2022;17:11772719221106600.
57. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med.* 2020;26(10):1636-43.
58. Zhang J, Walters EH, Tang MLK, Lowe AJ, Lodge CJ, Bui D, et al. Serum cytokine concentrations and asthma persistence to middle age. *Allergy.* 2020;75(11):2985-8.
59. Rodrigues TS, de Sá KSG, Ishimoto AY, Becerra A, Oliveira S, Almeida L, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J Exp Med.* 2021;218(3).
60. Merza MY, Hwaiz RA, Hamad BK, Mohammad KA, Hama HA, Karim AY. Analysis of cytokines in SARS-CoV-2 or COVID-19 patients in Erbil city, Kurdistan Region of Iraq. *PLoS One.* 2021;16(4):e0250330.
61. Robinson CM, O'Dee D, Hamilton T, Nau GJ. Cytokines involved in interferon-gamma production by human macrophages. *J Innate Immun.* 2010;2(1):56-65.
62. Levy DE, García-Sastre A. The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12(2-3):143-56.
63. Yin K, Gribbin E, Wang H. Interferon-gamma inhibition attenuates lethality after cecal ligation and puncture in rats: implication of high mobility group box-1. *Shock.* 2005;24(4):396-401.
64. Karki R, Sharma BR, Tuladhar S, Williams EP, Zalduondo L, Samir P, et al. Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. *Cell.* 2021;184(1):149-68.e17.
65. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R, et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell.* 2020;181(5):1036-45.e9.
66. Combes AJ, Courau T, Kuhn NF, Hu KH, Ray A, Chen WS, et al. Global absence and targeting of protective immune states in severe COVID-19. *Nature.* 2021;591(7848):124-30.
67. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science.* 2020;369(6504):718-24.
68. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(23).
69. Zhao Y, Qin L, Zhang P, Li K, Liang L, Sun J, et al. Longitudinal COVID-19 profiling associates IL-1RA and IL-10 with disease severity and RANTES with mild disease. *JCI Insight.* 2020;5(13).
70. Azmy V, Kaman K, Tang D, Zhao H, Dela Cruz C, Topal JE, et al. Cytokine Profiles Before and After Immune Modulation in Hospitalized Patients with COVID-19. *J Clin Immunol.* 2021;41(4):738-47.
71. Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, Kustiyah AR, Wirastuti K, Sadyah NAC, et al. The Role of TNF- α induced MSCs on Suppressive Inflammation by Increasing TGF- β and IL-10. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018;6(10):1779-83.
72. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature.* 2020;584(7821):463-9.
73. Wurtz O, Bajénoff M, Guerder S. IL-4-mediated inhibition of IFN-gamma production by CD4⁺ T cells proceeds by several developmentally regulated mechanisms. *Int Immunol.* 2004;16(3):501-8.
74. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med.* 2020;180(7):934-43.

75. Laing AG, Lorenc A, Del Molino Del Barrio I, Das A, Fish M, Monin L, et al. Author Correction: A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat Med*. 2020;26(10):1663.
76. Laing AG, Lorenc A, Del Molino Del Barrio I, Das A, Fish M, Monin L, et al. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat Med*. 2020;26(10):1623-35.
77. Living guidance for clinical management of COVID-19 [Internet]. WHO. 2021. Available from: Living guidance for clinical management of COVID-19 (who.int).
78. Public health surveillance for COVID-19: interim guidance, 7 August [Internet]. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2020 [cited 02 January 2023]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/333752>.
79. Kuo CL, Pilling LC, Atkins JL, Masoli JAH, Delgado J, Kuchel GA, et al. APOE e4 Genotype Predicts Severe COVID-19 in the UK Biobank Community Cohort. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020;75(11):2231-2.
80. Atkins JL, Masoli JAH, Delgado J, Pilling LC, Kuo CL, Kuchel GA, et al. Preexisting Comorbidities Predicting COVID-19 and Mortality in the UK Biobank Community Cohort. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020;75(11):2224-30.
81. Kuo CL, Pilling LC, Atkins JL, Masoli JAH, Delgado J, Kuchel GA, et al. ApoE e4e4 Genotype and Mortality With COVID-19 in UK Biobank. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020;75(9):1801-3.
82. Hubacek JA, Dlouha L, Dusek L, Majek O, Adamkova V. Apolipoprotein E4 Allele in Subjects with COVID-19. *Gerontology*. 2021;67(3):320-2.
83. Del Ser T, Fernández-Blázquez MA, Valentí M, Zea-Sevilla MA, Frades B, Alfayate E, et al. Residence, Clinical Features, and Genetic Risk Factors Associated with Symptoms of COVID-19 in a Cohort of Older People in Madrid. *Gerontology*. 2021;67(3):281-9.
84. Kass DA, Duggal P, Cingolani O. Obesity could shift severe COVID-19 disease to younger ages. *Lancet*. 2020;395(10236):1544-5.
85. Guzik TJ, Mohiddin SA, Dimarco A, Patel V, Savvatis K, Marelli-Berg FM, et al. COVID-19 and the cardiovascular system: implications for risk assessment, diagnosis, and treatment options. *Cardiovasc Res*. 2020;116(10):1666-87.
86. Pairo-Castineira E, Rawlik K, Bretherick AD, Qi T, Wu Y, Nassiri I, et al. GWAS and meta-analysis identifies 49 genetic variants underlying critical COVID-19. *Nature*. 2023;617(7962):764-8.
87. Fallerini C, Picchiotti N, Baldassarri M, Zguro K, Daga S, Fava F, et al. Common, low-frequency, rare, and ultra-rare coding variants contribute to COVID-19 severity. *Hum Genet*. 2022;141(1):147-73.
88. Pairo-Castineira E, Clohisey S, Klaric L, Bretherick AD, Rawlik K, Pasko D, et al. Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. *Nature*. 2021;591(7848):92-8.
89. Li Y, Ke Y, Xia X, Wang Y, Cheng F, Liu X, et al. Genome-wide association study of COVID-19 severity among the Chinese population. *Cell Discov*. 2021;7(1):76.
90. Goldstein MR, Poland GA, Graeber ACW. Does apolipoprotein E genotype predict COVID-19 severity? *QJM*. 2020;113(8):529-30.
91. Zhao Y, Zhao Z, Wang Y, Zhou Y, Ma Y, Zuo W. Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;202(5):756-9.
92. Massaro D, Massaro GD. Apoetm1Unc mice have impaired alveologenesis, low lung function, and rapid loss of lung function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(5):L991-7.
93. Gordon EM, Yao X, Xu H, Karkowsky W, Kaler M, Kalchier-Dekel O, et al. Apolipoprotein E is a concentration-dependent pulmonary danger signal that activates the NLRP3 inflammasome and IL-1 β secretion by bronchoalveolar fluid macrophages from asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144(2):426-41.e3.
94. Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. *J Lipid Res*. 1992;33(4):447-54.

95. Wang G, Zhang Q, Zhao X, Dong H, Wu C, Wu F, et al. Low high-density lipoprotein level is correlated with the severity of COVID-19 patients: an observational study. *Lipids Health Dis.* 2020;19(1):204.
96. Hu X, Chen D, Wu L, He G, Ye W. Declined serum high density lipoprotein cholesterol is associated with the severity of COVID-19 infection. *Clin Chim Acta.* 2020;510:105-10.
97. Angelidis I, Simon LM, Fernandez IE, Strunz M, Mayr CH, Greiffo FR, et al. An atlas of the aging lung mapped by single cell transcriptomics and deep tissue proteomics. *Nat Commun.* 2019;10(1):963.
98. Wang H, Yuan Z, Pavel MA, Jablonski SM, Jablonski J, Hobson R, et al. The role of high cholesterol in age-related COVID19 lethality. *bioRxiv.* 2021.
99. Jofre-Monseny L, Loboda A, Wagner AE, Huebbe P, Boesch-Saadatmandi C, Jozkowicz A, et al. Effects of apoE genotype on macrophage inflammation and heme oxygenase-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;357(1):319-24.
100. Rieker C, Migliavacca E, Vaucher A, Baud G, Marquis J, Charpagne A, et al. Apolipoprotein E4 Expression Causes Gain of Toxic Function in Isogenic Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(9):e195-e207.
101. Cudaback E, Yang Y, Montine TJ, Keene CD. APOE genotype-dependent modulation of astrocyte chemokine CCL3 production. *Glia.* 2015;63(1):51-65.
102. Tall AR, Westerterp M. Inflammasomes, neutrophil extracellular traps, and cholesterol. *J Lipid Res.* 2019;60(4):721-7.
103. Anand PK. Lipids, inflammasomes, metabolism, and disease. *Immunol Rev.* 2020;297(1):108-22.
104. Karasawa T, Kawashima A, Usui-Kawanishi F, Watanabe S, Kimura H, Kamata R, et al. Saturated Fatty Acids Undergo Intracellular Crystallization and Activate the NLRP3 Inflammasome in Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(4):744-56.
105. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science.* 2015;349(6245):316-20.
106. Kalyanaraman B. Do free radical NETWORK and oxidative stress disparities in African Americans enhance their vulnerability to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 severity? *Redox Biol.* 2020;37:101721.
107. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med.* 2011;17(2):179-88.
108. Rheinheimer J, de Souza BM, Cardoso NS, Bauer AC, Crispim D. Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: A systematic review. *Metabolism.* 2017;74:1-9.
109. Latz E, Duewell P. NLRP3 inflammasome activation in inflammaging. *Semin Immunol.* 2018;40:61-73.
110. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2017;120(4):713-35.
111. Miller YI, Shyy JY. Context-Dependent Role of Oxidized Lipids and Lipoproteins in Inflammation. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28(2):143-52.
112. Que X, Hung MY, Yeang C, Gonen A, Prohaska TA, Sun X, et al. Oxidized phospholipids are proinflammatory and proatherogenic in hypercholesterolaemic mice. *Nature.* 2018;558(7709):301-6.
113. Shen Y, Yang T, Guo S, Li X, Chen L, Wang T, et al. Increased serum ox-LDL levels correlated with lung function, inflammation, and oxidative stress in COPD. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:972347.
114. Weinbrenner T, Schröder H, Escurriol V, Fito M, Elosua R, Vila J, et al. Circulating oxidized LDL is associated with increased waist circumference independent of body mass index in men and women. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(1):30-5; quiz 181-2.

115. Holvoet P, Lee DH, Steffes M, Gross M, Jacobs DR. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome. *JAMA*. 2008;299(19):2287-93.
116. Imai Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubian-Malhami R, Perkmann T, van Loo G, et al. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell*. 2008;133(2):235-49.
117. Gkogkou E, Barnasas G, Vougas K, Trougakos IP. Expression profiling meta-analysis of ACE2 and TMPRSS2, the putative anti-inflammatory receptor and priming protease of SARS-CoV-2 in human cells, and identification of putative modulators. *Redox Biol*. 2020;36:101615.
118. Sviridov D, Miller YI, Ballout RA, Remaley AT, Bukrinsky M. Targeting Lipid Rafts-A Potential Therapy for COVID-19. *Front Immunol*. 2020;11:574508.
119. Figueroa DM, Gordon EM, Yao X, Levine SJ. Chapter 13 - Apolipoproteins as context-dependent regulators of lung inflammation. In: Richard A. Johnston BTS, editor. *Mechanisms and Manifestations of Obesity in Lung Disease*. 1. online: Academic Press; 2019. p. Pages 301-26,.
120. Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, Sandholzer C, Menzel HJ, Császár A, et al. The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Hum Genet*. 1991;49(2):338-49.
121. Talmud PJ, Stephens JW, Hawe E, Demissie S, Cupples LA, Hurel SJ, et al. The significant increase in cardiovascular disease risk in APOEepsilon4 carriers is evident only in men who smoke: potential relationship between reduced antioxidant status and ApoE4. *Ann Hum Genet*. 2005;69(Pt 6):613-22.
122. Sweeney MD, Kisler K, Montagne A, Toga AW, Zlokovic BV. The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. *Nat Neurosci*. 2018;21(10):1318-31.
123. Fu J, Zhou B, Zhang L, Balaji KS, Wei C, Liu X, et al. Expressions and significances of the angiotensin-converting enzyme 2 gene, the receptor of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Mol Biol Rep*. 2020;47(6):4383-92.
124. Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, Lely AT, Navis G, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol*. 2004;203(2):631-7.
125. Xie J, Tong Z, Guan X, Du B, Qiu H. Clinical Characteristics of Patients Who Died of Coronavirus Disease 2019 in China. *JAMA Netw Open*. 2020;3(4):e205619.
126. Caussy C, Pattou F, Wallet F, Simon C, Chalopin S, Telliam C, et al. Prevalence of obesity among adult inpatients with COVID-19 in France. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020;8(7):562-4.
127. Lighter J, Phillips M, Hochman S, Sterling S, Johnson D, Francois F, et al. Obesity in Patients Younger Than 60 Years Is a Risk Factor for COVID-19 Hospital Admission. *Clin Infect Dis*. 2020;71(15):896-7.
128. Klang E, Kassim G, Soffer S, Freeman R, Levin MA, Reich DL. Severe Obesity as an Independent Risk Factor for COVID-19 Mortality in Hospitalized Patients Younger than 50. *Obesity (Silver Spring)*. 2020;28(9):1595-9.
129. Tartof SY, Qian L, Hong V, Wei R, Nadjafi RF, Fischer H, et al. Obesity and Mortality Among Patients Diagnosed With COVID-19: Results From an Integrated Health Care Organization. *Ann Intern Med*. 2020;173(10):773-81.
130. Goyal P, Ringel JB, Rajan M, Choi JJ, Pinheiro LC, Li HA, et al. Obesity and COVID-19 in New York City: A Retrospective Cohort Study. *Ann Intern Med*. 2020;173(10):855-8.
131. Anderson MR, Geleris J, Anderson DR, Zucker J, Nobel YR, Freedberg D, et al. Body Mass Index and Risk for Intubation or Death in SARS-CoV-2 Infection : A Retrospective Cohort Study. *Ann Intern Med*. 2020;173(10):782-90.
132. Kass DA. COVID-19 and Severe Obesity: A Big Problem? *Ann Intern Med*. 2020;173(10):840-1.
133. Kruglikov IL, Scherer PE. The Role of Adipocytes and Adipocyte-Like Cells in the Severity of COVID-19 Infections. *Obesity (Silver Spring)*. 2020;28(7):1187-90.

134. Zhu Z, Zhang F, Hu H, Bakshi A, Robinson MR, Powell JE, et al. Integration of summary data from GWAS and eQTL studies predicts complex trait gene targets. *Nat Genet.* 2016;48(5):481-7.
135. Organization WH. Blueprint WRD covid -19 Therapeutical trial synopsis 2020 [12:[Available from: <https://www.who.int/docs/default-source/blue-print/covid-19-therapeutic-trial-synopsis.pdf>].
136. CentersforDiseaseControlandPrevention. About BMI for adults http://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/adult_bmi/index.html: Division of Nutrition, Physical Activity, and Obesity; 2016 [
137. WHO. BMI classification http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html: World Health Organization; 2004 [
138. Scuteri A, Najjar SS, Muller D, Andres R, Morrell CH, Zonderman AB, et al. apoE4 allele and the natural history of cardiovascular risk factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;289(2):E322-7.
139. Khalil YA, Rabès JP, Boileau C, Varret M. APOE gene variants in primary dyslipidemia. *Atherosclerosis.* 2021;328:11-22.
140. Chen F, Chen Y, Ke Q, Wang Y, Gong Z, Chen X, et al. ApoE4 associated with severe COVID-19 outcomes via downregulation of ACE2 and imbalanced RAS pathway. *J Transl Med.* 2023;21(1):103.
141. Fuzikawa AK, Peixoto SV, Taufer M, Moriguchi EH, Lima-Costa MF. Apolipoprotein E polymorphism distribution in an elderly Brazilian population: the Bambuí Health and Aging Study. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40(11):1429-34.
142. Lumsden AL, Mulugeta A, Zhou A, Hyppönen E. Apolipoprotein E (APOE) genotype-associated disease risks: a phenome-wide, registry-based, case-control study utilising the UK Biobank. *EBioMedicine.* 2020;59:102954.
143. Tavares-Júnior JWL, Oliveira DN, da Silva JBS, Feitosa WLQ, Sousa AVM, Cunha LCV, et al. Long-covid cognitive impairment: Cognitive assessment and apolipoprotein E (APOE) genotyping correlation in a Brazilian cohort. *Front Psychiatry.* 2022;13:947583.
144. Kasparian K, Graykowski D, Cudaback E. Commentary: APOE e4 Genotype Predicts Severe COVID-19 in the UK Biobank Community Cohort. *Front Immunol.* 2020;11:1939.
145. Conti P, Younes A. Coronavirus COV-19/SARS-CoV-2 affects women less than men: clinical response to viral infection. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2020;34(2):339-43.
146. Takahashi T, Ellingson MK, Wong P, Israelow B, Lucas C, Klein J, et al. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature.* 2020;588(7837):315-20.
147. Behrouzi B, Sivaswamy A, Chu A, Ferreira-Legere LE, Abdel-Qadir H, Atzema CL, et al. Sex-Based Differences in Severe Outcomes, Including Cardiovascular Hospitalization, in Adults With COVID-19 in Ontario, Canada. *JACC Adv.* 2023;2(3):100307.
148. Jin JM, Bai P, He W, Wu F, Liu XF, Han DM, et al. Gender Differences in Patients With COVID-19: Focus on Severity and Mortality. *Front Public Health.* 2020;8:152.
149. Fan R, Mao SQ, Gu TL, Zhong FD, Gong ML, Hao LM, et al. Preliminary analysis of the association between methylation of the ACE2 promoter and essential hypertension. *Mol Med Rep.* 2017;15(6):3905-11.
150. Li S, Lund JB, Christensen K, Baumbach J, Mengel-From J, Kruse T, et al. Exploratory analysis of age and sex dependent DNA methylation patterns on the X-chromosome in whole blood samples. *Genome Med.* 2020;12(1):39.
151. Pal S, Tyler JK. Epigenetics and aging. *Sci Adv.* 2016;2(7):e1600584.
152. Klein SL, Morgan R. The impact of sex and gender on immunotherapy outcomes. *Biol Sex Differ.* 2020;11(1):24.
153. Gallo Marin B, Aghagoli G, Lavine K, Yang L, Siff EJ, Chiang SS, et al. Predictors of COVID-19 severity: A literature review. *Rev Med Virol.* 2021;31(1):1-10.
154. Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, Bacon S, Bates C, Morton CE, et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature.* 2020;584(7821):430-6.

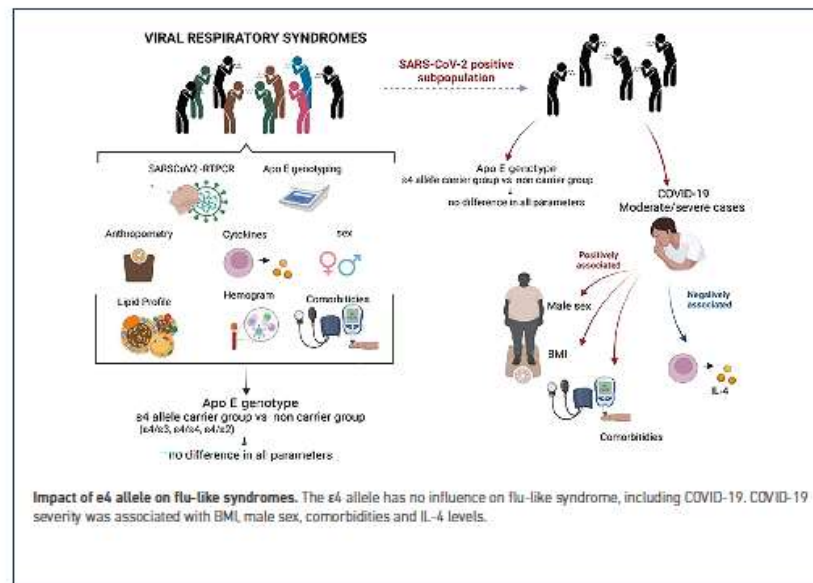
155. Chatterjee S, Nalla LV, Sharma M, Sharma N, Singh AA, Malim FM, et al. Association of COVID-19 with Comorbidities: An Update. *ACS Pharmacol Transl Sci.* 2023;6(3):334-54.
156. Russell CD, Lone NI, Baillie JK. Comorbidities, multimorbidity and COVID-19. *Nat Med.* 2023;29(2):334-43.
157. Ozsurekci Y, Aykac K, Er AG, Halaccli B, Arasli M, Oygur PD, et al. Predictive value of cytokine/chemokine responses for the disease severity and management in children and adult cases with COVID-19. *J Med Virol.* 2021;93(5):2828-37.
158. Liu Y, Chen D, Hou J, Li H, Cao D, Guo M, et al. An inter-correlated cytokine network identified at the center of cytokine storm predicted COVID-19 prognosis. *Cytokine.* 2021;138:155365.
159. Chang Y, Bai M, You Q. Associations between Serum Interleukins (IL-1. *Biomed Res Int.* 2022;2022:2755246.
160. Bourhis M, Idir A, Machraoui S, Hachimi A, Elouardi Y, Jamil O, et al. Cytokine and chemokine profiles in the sera of COVID-19 patients with different stages of severity. *Cytokine.* 2024;180:156653.
161. Vaz de Paula CB, de Azevedo MLV, Nagashima S, Martins APC, Malaquias MAS, Miggiolaro AFRD, et al. IL-4/IL-13 remodeling pathway of COVID-19 lung injury. *Sci Rep.* 2020;10(1):18689.
162. Gadotti AC, de Castro Deus M, Telles JP, Wind R, Goes M, Garcia Charello Ossoski R, et al. IFN- γ is an independent risk factor associated with mortality in patients with moderate and severe COVID-19 infection. *Virus Res.* 2020;289:198171.
163. Colzani M, Bargehr J, Mescia F, Williams EC, Knight-Schrijver V, Lee J, et al. Proinflammatory cytokines driving cardiotoxicity in COVID-19. *Cardiovasc Res.* 2024;120(2):174-87.
164. Deng X, Tang K, Wang Z, He S, Luo Z. Impacts of Inflammatory Cytokines Variants on Systemic Inflammatory Profile and COVID-19 Severity. *J Epidemiol Glob Health.* 2024;14(2):363-78.
165. Chen X, Zhou J, Chen C, Hou B, Ali A, Li F, et al. Consecutive Monitoring of Interleukin-6 Is Needed for COVID-19 Patients. *Virol Sin.* 2021;36(5):1093-6.
166. Yessenbayeva A, Apsalikov B, Massabayeva M, Kazymov M, Shakhanova A, Mussazhanova Z, et al. Biomarkers of immunothrombosis and polymorphisms of IL2, IL6, and IL10 genes as predictors of the severity of COVID-19 in a Kazakh population. *PLoS One.* 2023;18(6):e0288139.
167. Guirao JJ, Cabrera CM, Jiménez N, Rincón L, Urrea JM. High serum IL-6 values increase the risk of mortality and the severity of pneumonia in patients diagnosed with COVID-19. *Mol Immunol.* 2020;128:64-8.
168. Henry BM, de Oliveira MHS, Benoit S, Plebani M, Lippi G. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med.* 2020;58(7):1021-8.
169. Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol.* 2020;11:827.
170. Mulchandani R, Lyngdoh T, Kakkar AK. Deciphering the COVID-19 cytokine storm: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest.* 2021;51(1):e13429.
171. Leisman DE, Ronner L, Pinotti R, Taylor MD, Sinha P, Calfee CS, et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir Med.* 2020;8(12):1233-44.
172. Sarzi-Puttini P, Giorgi V, Sirotti S, Marotto D, Ardizzone S, Rizzardini G, et al. COVID-19, cytokines and immunosuppression: what can we learn from severe acute respiratory syndrome? *Clin Exp Rheumatol.* 2020;38(2):337-42.
173. Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, Mack M, Zhao J, Meyerholz DK, et al. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. *Cell Host Microbe.* 2016;19(2):181-93.

174. Komastu T, Ireland DD, Reiss CS. IL-12 and viral infections. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998;9(3-4):277-85.
175. Karki R, Kanneganti TD. Innate immunity, cytokine storm, and inflammatory cell death in COVID-19. *J Transl Med.* 2022;20(1):542.
176. Monastero RN, Pentyala S. Cytokines as Biomarkers and Their Respective Clinical Cutoff Levels. *Int J Inflam.* 2017;2017:4309485.
177. Svartengren M, Philipson K, Linnman L, Camner P. Airway resistance and deposition of particles in the lung. *Exp Lung Res.* 1984;7(3-4):257-69.
178. Ho JC, Chan KN, Hu WH, Lam WK, Zheng L, Tipoe GL, et al. The effect of aging on nasal mucociliary clearance, beat frequency, and ultrastructure of respiratory cilia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(4):983-8.
179. Martin SE, Mathur R, Marshall I, Douglas NJ. The effect of age, sex, obesity and posture on upper airway size. *Eur Respir J.* 1997;10(9):2087-90.
180. Xu J, Kang YA, Park SK, Yoon YH, Bai SJ, Jin Y, et al. Nasality Changes With Age in Normal Korean-Speaking Adults. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2019;12(1):95-9.
181. AlGhatrif M, Cingolani O, Lakatta EG. The Dilemma of Coronavirus Disease 2019, Aging, and Cardiovascular Disease: Insights From Cardiovascular Aging Science. *JAMA Cardiol.* 2020;5(7):747-8.
182. Ferguson ND, Pham T, Gong MN. How severe COVID-19 infection is changing ARDS management. *Intensive Care Med.* 2020;46(12):2184-6.
183. Liu K, Chen Y, Lin R, Han K. Clinical features of COVID-19 in elderly patients: A comparison with young and middle-aged patients. *J Infect.* 2020;80(6):e14-e8.
184. Thomas R, Wang W, Su DM. Contributions of Age-Related Thymic Involution to Immunosenescence and Inflammaging. *Immun Ageing.* 2020;17:2.
185. Zhen Y, Shu W, Hou X, Wang Y. Innate Immune System Orchestrates Metabolic Homeostasis and Dysfunction in Visceral Adipose Tissue During Obesity. *Front Immunol.* 2021;12:702835.
186. Hasanvand A. COVID-19 and the role of cytokines in this disease. *Inflammopharmacology.* 2022;30(3):789-98.
187. Kozak K, Pavlyshyn H, Kamyshnyi O, Shevchuk O, Korda M, Vari SG. The Relationship between COVID-19 Severity in Children and Immunoregulatory Gene Polymorphism. *Viruses.* 2023;15(10).
188. Deb P, Zannat KE, Talukder S, Bhuiyan AH, Jilani MSA, Saif-Ur-Rahman KM. Association of HLA gene polymorphism with susceptibility, severity, and mortality of COVID-19: A systematic review. *HLA.* 2022;99(4):281-312.
189. Bakaros E, Voulgaridi I, Paliatsa V, Gatselis N, Germanidis G, Asvestopoulou E, et al. Innate Immune Gene Polymorphisms and COVID-19 Prognosis. *Viruses.* 2023;15(9).
190. Li Y, Chen XY, Gu WM, Qian HM, Tian Y, Tang J, et al. A meta-analysis of tumor necrosis factor (TNF) gene polymorphism and susceptibility to influenza A (H1N1). *Comput Biol Chem.* 2020;89:107385.

ANEXO 1- Artigo publicado

The Apoprotein E4 isotype does not affect the severity of COVID-19 infection and other flu-like syndromes

Marina Carvalho-Rassbach¹, Lucas Haniel Araujo Ventura¹, Larissa Oliveira Assis³, Sabrina Fabrin¹, Manuelle Maria Pereira Natividade², Janayne Luihan Silva¹, Karina Braga Gomes², Ana Maria Caetano Faria¹ and Jacqueline I. Alvarez-Leite^{1*}

**Abstract**

Introduction. Apolipoprotein E (ApoE), especially the ApoE4 isotype, is suggested to influence the severity of respiratory viral infections; however, this association is still unclear.

Hypothesis. The presence of allele ε4 impacts the development of flu-like syndromes.

Aim. This study aimed to evaluate the impact of the Apo E4 isoform on the severity and duration of flu-like syndromes, including the coronavirus disease COVID-19.

Methodology. This study comprised 280 individuals presenting flu-like symptoms, all genotyped for ApoE isoforms. Data were collected on clinical course, comorbidities, nutritional status, biochemical and inflammatory markers, SARS-CoV-2 reverse

transcription PCR results and disease severity (mild, moderate or severe) according to the World Health Organization criteria. The individuals were analysed as a whole and within subgroups based on the SARS-CoV-2-positive (COVID-19 group) or SARS-CoV-2-negative (flu-like syndrome group) test.

Results. The frequency of the $\epsilon 4$ allele was similar across the whole population and in both the COVID-19 and flu-like syndrome subgroups (17 and 18%, respectively). No differences were seen in sex, age range, self-reported skin colour, body mass index (BMI), number of comorbidities, vaccination status, biochemical, cytokine and lipid profiles (except for total cholesterol) in the flu-like group when $\epsilon 4$ allele carriers and non-carriers were compared. In the COVID-19 group, the $\epsilon 4$ allele did not correlate with disease severity or duration, number of comorbidities or inflammatory biomarkers. While gender distribution was equal in the overall COVID-19 population, male gender strongly correlated with COVID-19 severity. Multivariate analysis showed that older individuals, male gender, higher BMI and the presence of comorbidities were linked to increased chances of developing moderate and severe disease. IL-4 was the only factor found to reduce the risk of severe COVID-19.

Conclusion. The presence of one $\epsilon 4$ allele showed no association with the duration and severity of flu-like syndromes, including COVID-19. Nonetheless, SARS-CoV-2-positive individuals tend to be older men with a higher BMI and a tendency to be overweight or with obesity. Regarding COVID-19 severity, BMI, male sex and the number of associated comorbidities were the factors that increased the chance of developing a more severe form of COVID-19.

INTRODUCTION

Apolipoprotein E (ApoE) is a protein produced in various human tissues such as hepatocytes, adipocytes, astrocytes and macrophages of the arterial wall, as well as glial cells, neurons and some types of epithelial cells. It is associated with lipoprotein metabolism and transport, as well as vascular, brain and immune system functions [1]. ApoE is well recognized for its participation in the transport and efflux of hepatic and non-hepatic lipids and the clearance of lipoprotein remnants. Nonetheless, it is capable of non-specifically binding to inflammatory lipophilic components with high affinity, such as beta-amyloid protein, lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and beta-glucans that lead to the elimination of pathogens, which contribute to the innate immune response [2].

Humans can express 3 isoforms of ApoE ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$). The allelic frequency varies according to the population ($\epsilon 2$, 5–10%; $\epsilon 3$, 65–70%; $\epsilon 4$, 15–20%) [3]. Individuals carrying the $\epsilon 4\epsilon 4$ genotype have elevated total cholesterol, LDL cholesterol and ApoB and are consequently at greater risk of atherosclerosis and cardiovascular disease. They also have about a tenfold increase in the risk of Alzheimer's disease [4] and greater susceptibility to viral, bacterial and parasitic infections [3].

In recent years, some studies have highlighted the influence of ApoE, especially ApoE4, on the pathogenesis of respiratory viral infections, influencing the severity and risk of complications and hospitalizations in diseases such as the coronavirus disease COVID-19 [5–9]. In addition, ApoE interaction with the innate immune system, particularly in modulating macrophage activity and inflammation, suggests that it may be a crucial factor in determining the outcome of viral diseases. ApoE4 is linked to an increased susceptibility to infection with herpes simplex virus type-1 and human immunodeficiency virus HIV [10, 11]. However, it protects against hepatitis C and B virus infection [12].

Regarding viral respiratory diseases, Gao *et al.* demonstrated that the deficiency of ApoE substantially increased susceptibility to human influenza virus H1N1 and the highly pathogenic avian influenza viruses (AIV) H5N1 and H7N9 *in vitro* and *in vivo* [13]. ApoE-deficient mice exhibited more severe lung pathology, increased viral load and decreased survival rates. It was seen that the lack of cell-produced ApoE results in impaired cellular cholesterol homeostasis, enhancing influenza virus binding.

Furthermore, supplementary data also demonstrated that SARS-CoV-2 infection significantly increased in ApoE KO Huh7 cells and that the effect of ApoE on SARS-CoV-2 infection was more pronounced than that of AIV infection [13].

Received 05 September 2024; Accepted 09 December 2024

Author affiliations: ¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; ²Faculdade de Farmácia - Departamento de Farmácia Social Universidade Federal de Minas Gerais; ³Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

*Correspondence: Jacqueline I. Alvarez-Leite, jalvarezleite@gmail.com; jalvarez@ufmg.br

Keywords: apolipoprotein E; COVID-19; cytokines; inflammation; obesity; viral infection.

Abbreviations: ACE2, angiotensin-converting enzyme 2; AIV, avian influenza viruses; ApoE, apolipoprotein E; BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; iAstrocytes, induced astrocytes; iBECs, induced brain endothelial-like cells; OR, odds ratio; SNPs, single nucleotide polymorphisms; UKB, UK Biobank.

This study is registered in the Brazilian Registry of Clinical Trials (ReBEC) - REBEC (ensaiosclinicos.gov.br/) number: RBR-2sm4gmy.

Two supplementary tables are available with the online version of this article.

In addition, ApoE interaction with the innate immune system, particularly in modulating macrophage activity and inflammation, suggests that it may be a crucial factor in determining the outcome of viral diseases.

About 20–40% of ApoE production comes from cells such as pneumocytes I and II, which also function as a gateway for respiratory viruses, including SARS-CoV-2 (RRID:NCBITaxon_2819197), as these cells express the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor to which the virus binds [14]. ApoE plays an important role in maintaining lung and immune function against pathogens. However, an excessive concentration of ApoE can promote inflammasome formation, leading to the development of severe acute respiratory syndrome and eventual death in COVID-19. ApoE appears to interact with the spike protein of SARS-CoV-2 and ACE2 without isoform-dependent binding effects, and ApoE4 can down-regulate ACE2 protein expression in animal models. Consequently, the decrease of Ang II to Ang 1–7 conversion could be a potential mechanism by which ApoE4 is associated with increased severity of COVID-19 [15]. A study of SARS-CoV-2 spike proteins S1 and S2 on the inflammatory response in APOE3- and APOE4- induced brain endothelial-like cells (iBECs) and astrocytes (iAstrocytes) showed that while IL-6 increase was higher in APOE4 iBECs, IL-6 and IL-8 in APOE4 iAstrocytes were lower compared to APOE3 iAstrocytes [16]. Moreover, other studies found that ApoE4 did not predispose to long COVID-19 [17]. Regarding the Brazilian population, Oliveira *et al.* found that the ApoE4 allele was associated with protection against olfactory dysfunction in long-COVID-19 patients [18]. These studies highlight the lack of consensus on the role of ApoE4 in the progression and severity of COVID-19 and other flu-like syndromes.

AIM AND GAP STATEMENT

The relationship between different ApoE isotypes and flu-like syndromes, particularly in the context of COVID-19, continues to be an active area of research. Studies that deepen the understanding of host–pathogen interactions and the role of ApoE in disease severity are critical. Understanding the effects of ApoE genotypes during ongoing outbreaks of respiratory viruses may reveal new treatment strategies that could improve patient outcomes and reduce the overall disease burden.

This study aims to assess the possible interference of the ε4 allele on the severity and progression of flu-like syndromes and COVID-19. By including only patients who exhibited flu-like symptoms rather than a general population, this study seeks to mitigate potential biases in the analysis by excluding those less exposed to environmental contaminations. All participants in this study experienced flu-like symptoms that led them to seek medical services, allowing an in-depth investigation of disease severity and progression in individuals carrying the ε4 allele compared to non-carrier ones.

METHODS

CHARACTERISTICS OF THE POPULATION

The present study was conducted in southeastern Brazil, in the capital of Minas Gerais state, Belo Horizonte. Volunteers interested in participating in the study had initial contact for blood collection, anthropometric data, nasal swabs for reverse transcription PCR testing to detect SARS-CoV-2 and health and symptomatology questionnaires. Biological samples were collected only in this first contact. Thus, men and women over 18 who presented symptoms related to influenza syndrome between November 2020 and June 2021 before and at the beginning of the Brazilian government's provision of the SARS-CoV-2 vaccine were included. During the collection period, the SARS-CoV-2 strains in circulation in Brazil were the original strain and P1.

At the time of the present study, a cohort of 738 individuals presenting symptoms similar to those of influenza and who sought care at the associated Health Center in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, was obtained. Volunteers who tested positive for COVID-19 in the reverse transcription PCR had their symptoms monitored remotely for 14 days, during which a symptom questionnaire was applied to help classify the severity of these individuals. After the end of the collection, all the information was combined with the medical records of volunteers who were hospitalized or hospitalized at the time of the collection. Based on all this information, a classification of patients with COVID-19 was performed into mild, moderate and severe clinical forms, following the parameters of the Severity Score recommended by the World Health Organization [19].

In this study, individuals with flu-like symptoms and negative COVID-19 tests had their data collected only at the initial visit, during which blood samples, buccal swabs and questionnaires were collected, characterizing a cross-sectional study. Nonetheless, the COVID-19-positive individuals were further monitored for 14 days or during hospitalization, characterizing a longitudinal study in this subgroup. There was no collection beyond the initial contact with the individual. Individuals were excluded if they reported more than seven days of flu-like symptoms before the first examination; had no records of body weight or height; had an inadequate blood clot (denatured) for ApoE genotyping; reported a positive HIV test with a low lymphocyte count, or had chronic use of immunosuppressants. After meeting the exclusion criteria, 280 patients were included in the study.

The collected blood was used to quantify inflammatory markers from heparinized plasma and biochemical determinations from serum. The blood clot was used for cellular DNA extraction and ApoE genotyping.

All patients were volunteers who signed the informed consent form. This work was conducted under the principles of the Declaration of Helsinki and approved by the National Committee for Research Ethics in Brazil (CONEP) by Ethics Committee No. 5.498.897 and by the research ethics committees of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) (CAAE 40208.320.3.2001.0061).

BIOCHEMICAL DETERMINATIONS

Peripheral blood was collected and processed at the René Rachou Institute, FIOCRUZ, in Belo Horizonte, Brazil. After centrifugation, serum and plasma aliquots and blood clots were frozen at -80°C . Blood samples were processed at 3000 r.p.m. Sorvall ST16R refrigerated centrifuge (ST16R, Thermo Scientific). Serum aliquots were frozen in a freezer at -80°C for determination of cholesterol profile, hemogram, C-reactive protein and 25(OH)Vitamin D in a biochemistry analysis laboratory (Hermes Pardini, Belo Horizonte, Brazil). Plasma was used for cytokine determination.

Nasopharyngeal swab samples were collected to perform the real-time reverse transcription PCR test (reverse transcription–polymerase chain) to diagnose individuals with COVID-19, which was analysed at the Laboratory of the Vaccine Technology Center (UFMG/FIOCRUZ/BH, TEC Research Center) in Belo Horizonte. To carry out the reverse transcription PCR, the CHARITÉ protocol from the Berlin hospital, which targets the viral envelope protein (E) gene, and the protocol from the Centers for Disease Control and Prevention in the USA (which targets two regions in the nucleocapsid gene) were applied [20]. Although the SARS-CoV-2 variants were not explored during the collection period, the circulating variants in Brazil were the original and P1.

APOE GENOTYPING

DNA extraction for ApoE genotyping was performed from total blood clots using the Purelink Invitrogen K182002 Thermo Fisher extraction kit protocol. ApoE genotyping was performed by real-time PCR with TaqMan® assays, Thermo (C_904973_10 for SNP *rs7412* and C_3084793_20 for SNP *rs429358*). Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *ApoE* gene were analysed, *rs429358* and *rs7412*, corresponding to positions 112 and 158 of the protein, respectively. Reactions were performed in duplicate for each SNP in 96-well microtiter plates following the manufacturer's instructions. QuantStudio 5 System Invitrogen Thermo Fisher equipment was used.

CYTOKINE PANEL

The interleukins IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12(p70) and TNF were measured using heparinized plasma through magnetic immunoassay technique carried out with the Luminesx equipment (Bio-Plex® 200, Bio-Rad) and Bio-Rad Laboratories kit (Bio-Plex® Pro Human Cytokine #M500KCAF0Y), following processing protocols standardized by the Group Integrated Research with Biomarkers (IRR-FIOCRUZ/MG). BioPlex® xPONENT version 3.1 software (Bio-Rad) was used to analyse the panel. The panel of mediators and their standard settings are presented in Table S1 (available in the online Supplementary Material).

STATISTICAL ANALYSIS

The sample size was calculated using a prevalence of 20% (an average of results from various Brazilian studies) and considering a margin of error of 5%, a confidence level of 95% and an unknown population size. The minimum sample size required was 246 individuals. For this study, we included 280 patients. Hardy-Weinberg equilibrium was tested to verify polymorphisms in the ApoE gene. Continuous variables were assessed for normality using the Kolmogorov-Smirnov test, all classified as non-parametric and expressed as median (minimum and maximum). For comparison between groups, the Mann-Whitney *U* test was used. The categorical variables were expressed as *n* (%) and compared using the chi-square or Fisher's exact test (when the minimum expected frequencies were less than five). Spearman's test was used to evaluate the correlation coefficient between all variables. In univariate and multivariate models, binomial logistic regression was used to identify variables associated with the clinical classification of COVID-19 (mild, moderate or severe). For all analyses, statistical significance was considered when $P < 0.05$. The interpretation of Spearman's correlation coefficients was based on the Dancey and Reddy definition [21]: < 0.300 = weak; > 0.700 strong and moderate between 0.300 and 0.700. The software used was SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Armonk, NY), version 22.0. To create the graphs, the software used was GraphPad Prism (GraphPad Prism for Windows, Boston, MA), version 8.0.2.

RESULTS

Two hundred eighty patients were included in the study. Table S2 presents the general data of the total sample. Female patients represented 50.4% of the sample, and the median age was 41. The median body mass index (BMI) was 26.6 kg m^{-2} , and 48.2% of the sample was positive for SARS-CoV-2 and consequently diagnosed with COVID-19. It was observed that the median of triacylglycerol, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) was 113.0 mg dL^{-1} , 172.0 mg dL^{-1} , 44.0 mg dL^{-1} and 100.0 mg dL^{-1} , respectively. Comorbidities were reported in 43.57% of the total

Table 1. ApoE genotyping of the 280 individuals analyzed in the study: those presenting flu-like syndrome and COVID-19 infection

	Total population (N=280)		Flu-like syndrome group (N=145)		COVID-19 group (N=135)		P-value*
	%	(N)	%	(N)	%	(N)	
ApoE allele distribution							
e3	78.0	(437)	81.7	(237)	77.8	(210)	0.381
e4	17.5	(94)	16.9	(49)	18.1	(49)	
e2	4.5	(25)	1.4	(4)	4.1	(11)	
ApoE genotype distribution							
e3/e3	60.6	(170)	62.7	(91)	58.5	(79)	0.771
e3/e2	0.4	(1)	0	(0)	0.7	(1)	
e3/e4	7.5	(21)	8.3	(12)	6.7	(9)	
e3/e4	27.2	(76)	22.8	(33)	31.9	(43)	
e4/e4	3.6	(10)	4.8	(7)	2.2	(3)	
e2/e4	0.7	(2)	1.4	(2)	0	(0)	

*Student's t-test comparing flu-like and COVID-19 groups.

population, 41.4% of the flu-like syndrome group and 45.1% of the COVID-19 group. The main comorbidities reported were hypertension (20.7% of the total population); respiratory diseases such as bronchitis, asthma and chronic pulmonary obstructive disease (12.1%); diabetes mellitus (6.4%); and cardiovascular diseases (3.9%). There was no difference between groups besides the median total cholesterol, which was higher in the $\epsilon 4$ carriers.

Regarding ApoE isoforms, most patients were homozygous for the $\epsilon 3$ allele, and of the remaining patients, 8.2% have at least one ApoE $\epsilon 2$ allele, and 31.5% have at least one ApoE $\epsilon 4$ allele. This distribution of the $\epsilon 4$ allele was similar in flu-like symptoms (29.7%) and COVID-19 (34.1%) groups (Table 1). It was observed that only ten individuals (3.6%) presented homozygotes for the $\epsilon 4$ alleles, seven in flu-like syndrome and three in COVID-19 groups. Nonetheless, data from the total population, flu-like syndrome group and COVID-19 were in Hardy-Weinberg equilibrium: Total population: $\chi^2=0.7449$, $P=0.9804$; flu-like symptom group: $\chi^2=6.2401$, $P=0.2835$; and COVID-19 group: $\chi^2=6.8938$, $P=0.5648$.

When individuals were grouped in $\epsilon 4$ allele carrier ($\epsilon 4\epsilon 4$, $\epsilon 4\epsilon 3$ and $\epsilon 4\epsilon 2$ genotypes) or non-carrier ($\epsilon 3\epsilon 3$, $\epsilon 2\epsilon 2$ and $\epsilon 3\epsilon 2$ genotypes) groups, there was no difference between any of the analysed parameters, except by the total cholesterol which was higher in $\epsilon 4$ carrier group, as expected (Table 2). Data on C-reactive protein (CRP) and cytokines do not suggest any influence of the presence of the $\epsilon 4$ allele on the inflammatory status of this population.

The next step was to evaluate if the ApoE4 isoform could influence COVID-19 or other flu-like syndromes. Regarding the flu-like syndrome group, no differences were found between $\epsilon 4$ carriers and non-carriers (Table 3). No individual was hospitalized due to symptoms, which were less severe and intense than those with COVID-19 and also due to the hospital overload and the risk of SARS-CoV-2 contamination. Nonetheless, other cytokines and CRP were similar between carriers and non-carriers, supporting the total population results that did not show any differences in the inflammatory pattern dependent on $\epsilon 4$ presence.

Next, the COVID-19-positive group was analysed according to the presence of ApoE isoform (Table 4). As found in the total population and the flu-like syndrome group, there were no differences in the analysed parameters (except total cholesterol), including inflammatory status.

Next, the correlations between the studied variables in the total sample were analysed. The ApoE genotype was not significantly correlated with any of the variables evaluated. Days of disease, in turn, were positively correlated with age, number of comorbidities and levels of almost all cytokines except IL-4 (Table 5).

When COVID-19 patients were analysed separately, the presence of the $\epsilon 4$ allele was not correlated with any clinical variables (COVID-19 classification, clinical outcome, days of illness, number of comorbidities, days of hospitalization and viral load), except with total cholesterol (Table 6). Nonetheless, the severity of COVID-19 was negatively correlated with the Ct value and positively correlated with gender (greater severity in males), age, BMI and CRP, IL-6, IL-10 and IL-12 levels (Table 6).

In the univariate or multivariate analyses, the chances of developing more severe forms of COVID-19 were not significantly altered by the presence of the $\epsilon 4$ allele (Table 7). However, it revealed that men with higher BMI have a greater chance of developing moderate/severe COVID-19 (odds ratio [OR]: 3.32 and 1.16, respectively). Nonetheless, higher levels of IL-4 decrease the chance (OR: 0.49) of being in the most severe group. In the multivariate analysis, including in the model sex, age, BMI, number of comorbidities and IL-4 level, the chance of men with higher BMI to develop moderate or severe disease was even more significant (OR: 5.53 and 1.17, respectively). In addition, it was also found that the higher the number of comorbidities, the higher the chance of moderate/severe COVID-19 (OR: 2.94). Once again, the IL-4 level was the only protective factor that reduced the chances of more severe forms of COVID-19 (OR: 0.34).

DISCUSSION

Although there are studies to observe the repercussions of the ApoE genotype in some viral infections such as HIV, herpes simplex and viral hepatitis [10–12], those focused on respiratory viral infections are poorly explored. The present study investigated the frequency of $\epsilon 4$ allele in a population with flu-like syndrome during the COVID-19 pandemic. Moreover, it was also examined whether the presence of the $\epsilon 4$ allele is associated with an increased inflammatory response of flu-like syndromes and, particularly, with COVID-19 severity. The results did not show any differences in the frequency of the $\epsilon 4$ allele across the overall populations nor among the group of patients who tested negative (flu-like syndrome). Multivariable analysis revealed that the chances of developing more severe forms of COVID-19 were not associated with the ApoE isoform but were increased in older male individuals with a higher BMI and a greater number of comorbidities. IL-4 was the only factor linked to a reduced chance of developing more severe disease manifestations.

The frequency of the $\epsilon 4$ allele was not different in those positive or negative for the RT-PCR test (17 and 18%, respectively). The frequency of the $\epsilon 4$ allele varies according to the world region [22]. In Brazil, the prevalence of the $\epsilon 4$ allele varies between 9 and 32%, depending on the region of the country [23–26], comparable to the British population included in the UK Biobank (UKB)

Table 2. Comparison of 260 individuals with flu-like syndrome, including COVID-19, according to the presence of the e4 allele

	Presence of e4 allele		P-value
	Not a carrier	e4 carrier	
Gender			0.5213
Male	51.00% (98)	46.59% (41)	
Female	48.96% (94)	53.41% (47)	
Age (years)	40.5 (7.4-90.0)	42.5 (19.0-80.0)	0.6610
Age range			
Adult (18-59)	85.43% (129)	87.50% (56)	0.8637
Elderly (≥ 60)	14.57% (22)	12.5% (8)	
Self-reported skin colour (according to the Brazilian classification)*			
Brown	16.14% (31)	22.72% (20)	0.3211
Black	42.18% (81)	34.10% (30)	
White	19.27% (37)	22.72% (20)	
Other	2.08% (4)	4.50% (4)	
Not reported	20.31% (39)	15.91% (14)	
BMI (kg m⁻²)	26.6 (16.0-51.5)	26.7 (14.6-45.6)	0.6742
BMI classification†			
Low weight	1.04% (2)	2.38% (2)	0.8150
Eutrophy	35.41% (68)	33.33% (28)	
Overweight	36.97% (71)	36.09% (32)	
Obesity	26.56% (51)	26.19% (22)	
Number of comorbidities			
0	56.54% (108)	52.27% (46)	0.1762
1	25.65% (49)	22.72% (20)	
2	7.30% (14)	15.90% (14)	
>2	10.47% (20)	9.09% (8)	
Lipid profile (mg dl⁻¹)			
Total cholesterol	163.0 (104.0-235.0)	179.0 (128.0-288.0)	0.0235
VLDL-c	20.0 (15.0-51.0)	24.5 (13.0-44.0)	0.0960

Continued

Table 2. Continued.

	Presence of e4 allele		P-value
	No e4 carrier	e4 carrier	
LDL-<	93.0 (49.0–135.0)	80.5 (52.0–203.0)	0.3009
HDL-<	42.0 (24.0–65.0)	49.5 (30.0–85.0)	0.0717
Triglycerol	101.0 (49.0–354.0)	156.5 (44.0–369.0)	0.0867
Biochemical analysis			
AS(OH)/HD (ng ml ⁻¹)	27.9 (11.0–54.2)	26.2 (11.2–52.9)	0.3889
Leukocytes (x10 ⁹ /mm ³)	6.9 (1.8–18.3)	7.6 (2.2–19.0)	0.2839
Haemoglobin (g dl ⁻¹)	16.2 (8.7–22.8)	16.1 (12.0–21.3)	0.7744
Platelets (mm ³)	167.5 (66.0–288.0)	180.0 (29.0–340.0)	0.5306
CRP (mg dl ⁻¹)	8.0 (4.0–153.6)	5.1 (4.0–77.0)	0.3040
Blood cytokines (pg ml⁻¹)			
IL-1β	0.62 (0.01–203.70)	0.44 (0.01–22630)	0.4039
IL-6	0.85 (0.02–1149.0)	0.79 (0.09–911.0)	0.7173
TNF	13.33 (0.34–932.70)	7.49 (0.17–46380)	0.2275
IL-12 (p70)	0.75 (0.05–109.00)	0.52 (0.09–30.38)	0.2930
IFN-γ	5.82 (0.07–109.00)	4.04 (0.44–64.88)	0.9485
IL-4	0.66 (0.03–109.00)	0.76 (0.05–3.69)	0.8113
IL-10	1.68 (0.04–154.20)	1.35 (0.04–81.91)	0.8950
Reverse transcription PCR result for SARS-CoV-2			
Positive	46.55% (89)	52.27% (49)	0.3701
Negative	53.45% (103)	47.73% (42)	
Vaccinated against COVID-19			
Yes	15.6% (26)	7.95% (7)	0.2014
No	84.39% (165)	92.05% (81)	

* according to the Brazilian Institute of Geography and Statistics (<https://www.ibge.gov.br>)* low weight (BMI <18.5 kg m⁻²), eutrophic (BMI: 18.5–24.9 kg m⁻²), overweight (BMI: 25–29.9 kg m⁻²), obesity (BMI: ≥30 kg m⁻²)

* LDL-c, very low density lipoprotein cholesterol.

Table 3. Comparison of 145 individuals with flu-like symptoms according to the presence of the allele.

	Flu-like syndrome group		P-value
	No e4 carrier (N=108)	e4 carrier (N=42)	
Gender			
Male	42.7% (46)	47.6% (20)	0.385
Female	57.3% (59)	52.4% (22)	
Age (years)	38 (17–86)	45 (13–73)	
Age range			
Adult (18–59)	85.4% (88)	85.7% (36)	0.999
Elderly (>60)	14.6% (15)	14.3% (6)	
Self-reported skin colour (according to the Brazilian classification)*			
Brown	45.6% (47)	35.7% (15)	0.463
Black	21.4% (22)	26.9% (12)	
White	21.4% (22)	36.2% (11)	
Other	2.0% (2)	4.8% (2)	
Not reported	9.6% (10)	4.8% (2)	
BMI (kg m ⁻²)	25.36 (18.3–51.52)	26.71 (14.6–41.1)	
BMI classification†			
Low weight	1.0% (1)	4.8% (2)	0.435
Eutrophic	41.7% (43)	31.3% (14)	
Oversight	35.9% (37)	36.7% (16)	
Obesity	21.4% (22)	23.8% (10)	
Number of comorbidities‡			
0	58.2% (60)	52.4% (22)	0.276
1	21.4% (22)	23.8% (10)	
2	9.7% (10)	11.9% (5)	
>2	10.7% (11)	11.9% (5)	
Lipid profile (mg dl⁻¹)			
Total Cholesterol	175 (130–217)	233.5 (107–189)	0.190
VLDL-c	22.5 (14–51)	23.5 (20–24)	0.857

Continued

Table 3. Continued.

	No. of carrier (N=108)	Hu-like syndrome group of carrier (N=42)	P-value
LDL-c	107 (92-132)	152 (101-203)	0.381
HDL-c	45 (35-65)	58 (54-62)	0.571
Triglycerid	126 (82-354)	138 (97-139)	0.471
Biochemical analysis			
AS (O1HVED) (ng ml ⁻¹)	32.95 (15.8-44.2)	28.8 (22.1-35.5)	0.696
Leucocyte (x 10 ⁹ /mm ³)	8.5 (3.8-18.3)	9.6 (8.8-19)	0.262
Hemoglobin (g dl ⁻¹)	16 (9.9-18.2)	15.6 (12-21.2)	0.714
Platelet (x1000/mm ³)	185 (71-268)	187 (50-340)	0.485
CRP (mg dl ⁻¹)	19 (4-153.6)	4 (4-6)	0.151
Blood cytokines (pg ml⁻¹)			
IL-1b	0.46 (0.01-3.40)	0.28 (0.05-1.3)	0.104
IL-6	0.51 (0.02-209.4)	0.45 (0.04-363.4)	0.066
TNF	8.96 (0.34-381.2)	4.31 (1.2-533.5)	0.091
IL-12 (p70)	0.55 (0.03-35.13)	0.46 (0.09-5.17)	0.485
IFN-γ	3.50 (0.18-35.25)	2.92 (0.57-15.14)	0.246
IL-4	0.61 (0.16-2.99)	0.46 (0.14-1.75)	0.060
IL-10	1.09 (0.04-154.2)	0.89 (0.04-175)	0.464
Vaccinal against COVID-19s			
Yes	10.7% (11)	4.8% (2)	0.276
No	89.3% (92)	95.2% (40)	

Data are presented in median (min-max) or percentage and (n). *According to the Brazilian Institute of Geography and Statistics (<https://www.ibge.gov.br>), low weight (BMI < 18.5 kg m⁻²), eutrophic (BMI: 18.5-24.9 kg m⁻²), overweight (BMI: 25-29.9 kg m⁻²), obese (BMI > 30 kg m⁻²), Mann-Whitney U test, P-value in bold, statistical significance (P<0.05). Main comorbidities in A/non-carriers and B/carriers, respectively, were hypertension (23.6 and 19.4%), respiratory diseases (10.7 and 14.3%), diabetes (7.8 and 2.38%), and cardiovascular diseases (6.8 and 9.5%). Five patients received two doses, five received only one, and three were unsure. From these, four patients were vaccinated with AstraZenca, four with CoronaVac, four with CoronaVac from Fkcrun, Brazil, two received Pfizer, and three were unsure.

Table 4. Sociodemographic, clinical and laboratory characteristics of patients with COVID-19 according to the presence of the p4 allele

	The presence of p4 carrier		P-value
	No allele p4 (n=89)	Allele4 carrier (n=16)	
Gender*			
Female	35 (39.3)	25 (53.7)	0.1040
Male	54 (60.6)	21 (46.7)	
Age (years)**	44 (18-90)	39 (23-80)	0.2018
Self-reported skin color***			
White	15 (16.9)	9 (19.6)	0.329
Brown	34 (38.2)	15 (32.6)	
Black	9 (10.1)	8 (17.4)	
Other	2 (2.2)	2 (4.3)	
Not reported	29 (32.6)	12 (26.1)	
BMI (kg.m⁻²)†	25.5 (16.0-41.2)	26.9 (18.7-45.6)	0.763
BMI classification**			
Low weight	1 (1.1)	0 (0.0)	0.880
Eutrophic	25 (27.8)	14 (30.4)	
Overweight	35 (38.9)	20 (43.5)	
Obesity	29 (32.2)	12 (26.1)	
Number of comorbidities‡			
0	49 (55.1)	24 (52.2)	0.377
1	27 (30.3)	10 (21.7)	
2	4 (4.5)	9 (19.6)	
≥2	9 (10.1)	3 (6.5)	
Viral load (Ct)	22 (13-25)	22 (15-26)	0.437
COVID-19 severity*			
Mild	55 (61.8)	34 (74.0)	0.483
Moderate	16 (18.0)	6 (13.0)	
Severe	18 (20.2)	6 (13.0)	
Days of disease*			

Continued

Table 4. Continued.

	The presence of e6 carrier		P-value
	No alleles (n=89)	Alleles 4 carrier (n=46)	
<7 days	52 (58.4)	29 (64.4)	0.765
8-14 days	29 (32.6)	12 (26.7)	
> 14 days	8 (9.0)	4 (8.9)	
Hospital stay*			
No	63 (70.8)	37 (80.4)	0.011
Yes	26 (29.2)	9 (19.6)	
Days of hospitalization†	3 (3.3)	5 (2-7)	0.643
Clinical outcome*			
Death	1 (1.1)	0 (0.0)	0.531
Discharge	85 (95.5)	43 (93.5)	
Unknown	3 (3.4)	3 (6.5)	
Blood analysis (mg/dl)†			
Platelets	149 (66-292)	168 (29-287)	0.285
CRP	6 (4-12)	4 (4-77)	0.488
Tracy/cholesterol	80 (49-274)	163.5 (44-349)	0.060
Total cholesterol	162 (104-238)	176 (128-288)	0.029
HDL-c	42 (24-61)	46.5 (30-85)	0.102
LDL-c	92.0 (40.0-155.0)	104.5 (52.0-183.0)	0.123
Blood cytokines (pg/ml)†			
IL-β	0.7 (0.01-202.7)	0.7 (0.01-226.2)	0.947
IL-4	0.4 (0.03-109.0)	0.8 (0.05-3.7)	0.300
IL-5	2.4 (0.03-1448.6)	2.9 (0.2-91.1)	0.910
IL-10	2.6 (0.04-109.0)	3.2 (0.2-60.9)	0.508
IL-12p70	0.8 (0.03-109.0)	0.7 (0.09-10.4)	0.950
IFN-γ	8.0 (0.107-109.0)	7.2 (0.4-64.9)	0.972
TNF-α	15.9 (0.4-952.7)	8.9 (1.2-406.7)	0.678

Continued.

Table 5. Main correlations between sociodemographic, clinical and laboratory characteristics of 280 patients presenting flu-like syndromes, including COVID-19

	ApoE genotype		Days of disease	
	Coefficient	P-value	Coefficient	P-value
Gender	0.057	0.346	0.022	0.719
Age	0.042	0.486	0.242	<0.0001
Self-reported skin colour	-0.017	0.778	-0.006	0.926
BMI	0.047	0.440	0.099	0.100
ApoE genotype	-	-	0.043	0.591
Days of disease	-0.015	0.805	-	-
Number of comorbidities	-0.015	0.802	0.178	0.003
CRP	-0.029	0.844	0.082	0.569
IL-1 β	-0.006	0.942	0.227	0.004
IL-4	-0.086	0.283	0.088	0.268
IL-6	0.016	0.839	0.338	<0.0001
IL-10	0.043	0.591	0.388	<0.0001
IL-12 (p70)	0.108	0.175	0.305	<0.0001
IFN- γ	-0.010	0.898	0.266	0.001
TNF- α	0.084	0.336	0.304	<0.0001

Concentration of IL, IFN- γ , TNF- α and CRP. Spearman's correlation. Bold P-value: statistical significance ($P < 0.05$).

[27]. The genotype distribution in the present study was in the Hardy-Weinberg equilibrium, suggesting the frequencies of alleles and genotypes were not influenced by mutation, genetic drift or gene flow.

Different from previous studies which addressed the association between the $\epsilon 4$ allele and the incidence of COVID-19 [8, 15, 28], the present study was directed to the severity of the disease rather than incidence. A meta-analysis by Chen *et al.* [15] concluded that ApoE4 was linked to COVID-19 severity based on five published studies. One was performed in the Brazilian population and comprised individuals with neurologic manifestations of long COVID-19 [29]. The meta-analysis result did not show differences regarding genotypes or specific alleles. Kuo *et al.* published studies on the association between ApoE isoform and COVID-19 based on the UK Biobank register [8, 9]. They found a twofold increased risk of severe COVID-19 in those carrying the $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotype versus $\epsilon 3/\epsilon 3$ [8] and a fourfold increase in mortality after testing positive for COVID-19 [9]. The results are valid only for the $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotype, since no association between COVID-19 severity or mortality and $\epsilon 3/\epsilon 4$ carriers was observed, indicating that $\epsilon 4$ homozygosity is necessary for this genetic risk [30]. In the present study, only ten individuals (3.5%) were genotyped as $\epsilon 4/\epsilon 4$, a percentual distribution similar to the UKB. Due to the small number of our study compared to UKB, it was not possible to properly explore the effect of $\epsilon 4$ homozygous on COVID-19 severity in the present study. However, as seen in Table 1, there are more $\epsilon 4/\epsilon 4$ carriers in the COVID-19-negative group (4.8%) than in the positive one (2.2%), suggesting that the frequency of homozygous is not higher in the infected group. Since more than 90% of $\epsilon 4$ carriers in the present study were heterozygous, we can assume that the findings of this study are in agreement with those of Kuo *et al.*, supporting the idea that the $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotype is not a relevant factor for COVID-19 severity.

As ApoE isoform was unrelated to COVID-19 severity in this study, other influencing factors were assessed. Regression analysis indicated that males are more likely to develop moderate or severe disease (OR=5.56), consistent with previous research linking COVID-19 severity and mortality in males due to a more pro-inflammatory profile [31, 32].

Obesity and overweight are present in more than 50% of the overall population analysed. In the COVID-19 group, a higher BMI was associated with increased chances of severe disease outcomes. Obesity contributes to more severe COVID-19 manifestations, particularly those in intensive care [33] and young patients [34]. Previous studies indicate that patients with a BMI $> 40 \text{ kg m}^{-2}$ experience greater morbidity [35-37]. Adipose tissue has high expression of the ACE2 receptor, facilitating SARS-CoV-2 entry and potentially serving as a viral reservoir, which could prolong viral spread [38]. Moreover, obesity comorbidities such

Table 6. Correlations between sociodemographic, clinical and laboratory characteristics of patients with COVID-19

	Presence of <i>e4</i> allele		COVID-19 Severity	
	Correlation coefficient	P-value	Correlation coefficient	P-value
Gender	0.126	0.144	0.273	0.001
Age	0.109	0.209	0.196	0.023
BMI	0.026	0.765	0.319	<0.0001
Presence of <i>e4</i> allele			0.111	0.200
COVID-19 severity	0.111	0.200		
CI value	0.167	0.426	-0.410	0.042
Days of disease	0.045	0.608	0.502	<0.0001
Number of comorbidities	0.027	0.758	0.071	0.413
CRP	0.117	0.444	0.449	0.002
IL-1 β	0.007	0.947	0.123	0.236
IL-4	0.107	0.303	-0.152	0.141
IL-6	0.012	0.910	0.257	0.011
IL-10	0.068	0.511	0.357	<0.0001
IL-12 (p70)	0.006	0.951	0.423	<0.0001
IFN- γ	0.004	0.973	0.146	0.154
TNF- α	0.046	0.680	0.197	0.076
Triglycerol	0.280	0.060	-0.051	0.718
Total cholesterol	0.303	0.027	-0.051	0.718
HDL-cholesterol	0.227	0.102	0.115	0.412
LDL-cholesterol	0.214	0.124	-0.088	0.530

IL-1 β , interleukin-1 beta; IL-4, interleukin-4; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; IL-12, interleukin-12; IFN- γ , interferon-gamma. Spearman's correlation. Bold P-values: statistical significance ($P < 0.05$).

as restrictive lung physiology, sleep apnoea, diabetes and dyslipidaemia, alongside immunological dysfunction and heightened inflammation, are linked to COVID-19 severity [39].

The number of comorbidities increased the chances of moderate/severe COVID-19 (OR: 2.94). Comorbidities are a well-known risk factor observed in several previous studies [40–42]. As seen in the present study, the association of several comorbidities, such as hypertension, respiratory diseases, diabetes and cardiovascular diseases, is associated with hospitalization and mortality [43].

In the present study, correlation analysis confirmed that increased inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-12 and IFN- γ) and the anti-inflammatory cytokine IL-10 are associated with a higher risk of more severe disease. However, in univariate and multivariate analyses, IL-4 was the only cytokine linked to lower chances of developing severe COVID-19. The precise role of IL-4 in COVID-19 progression stays unclear. Although some studies did not find a correlation between IL-4 and COVID-19 [44–47], others suggest that IL-4 could be lowered through Th2 response in recovering patients [48–51]. IL-4 could be involved in the resolution of COVID-19 infection, acting in the repair mechanism induced by the activation of M2 macrophages triggered by Th2 response and TCD4+ lymphocytes. IL-4 can also influence the differentiation of T cells in Th1 and Th2 type responses, modulating the proliferation and production of cytokine in CD8+ lymphocytes, acting in the resolution process of COVID-19 disease [49]. Other authors also found a difference in IL-4 levels related to COVID severity [49, 50] and duration over 10 days of illness [51].

This study has several limitations. It did not examine SARS-CoV-2 variants or the influence of ApoE alleles on them, and individuals in the flu-like syndrome groups were not tested for aetiology. The small number of *e4/e4* individuals restricted conclusions regarding their risk for COVID-19 or other flu-like syndromes. Furthermore, there was no extended follow-up to

Table 7. Odds ratios of raw and adjusted data for clinical severity of COVID-19 applying binomial logistic regression

	Mild (reference)	Moderate/severe		Moderate/severe	
		Raw data		Adjusted*	
		OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
e4 allele carrier	1	0.59 (0.27–1.31)	0.201		
Male sex	1	3.32 (1.52–7.23)	0.003	5.53 (1.45–21.04)	0.012
Age	1	1.02 (0.99–1.05)	0.076		
BMI	1	1.16 (1.07–1.25)	<0.001	1.17 (1.05–1.32)	0.006
Comorbidities	1	1.83 (0.89–3.75)	0.101	4.10 (1.13–14.91)	0.032
CRP	1	1.14 (0.94–1.39)	0.179		
Total cholesterol	1	0.99 (0.96–1.02)	0.591		
LDL-c	1	0.98 (0.94–1.03)	0.468		
IL-1 β	1	0.99 (0.97–1.00)	0.064		
IL-4	1	0.40 (0.20–0.86)	0.013	0.34 (0.16–0.69)	0.003
IL-6	1	1.00 (0.99–1.00)	0.725		
IL-10	1	1.00 (0.97–1.03)	0.948		
IL-12	1	0.99 (0.94–1.04)	0.619		
IFN- γ	1	0.99 (0.97–1.02)	0.698		
TNF- α	1	0.99 (0.99–1.00)	0.612		

*Adjusted model: sex, age, BMI, number of comorbidities and IL-4. 95% CI, 95% confidence interval; IL-1 β , interleukin-1 beta; IL-4, interleukin-4; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; IL-12, interleukin-12; IFN- γ , interferon-gamma; TNF- α , tumour necrosis factor-alpha. P-value in bold: statistical significance (P<0.05).

assess the impact of ApoE isotype on long COVID-19. Additionally, many other polymorphisms associated with COVID-19 [52–54] and flu-like syndromes [55] remain unexplored in this study.

This study is innovative in including flu-like syndromes in its analysis of ApoE influence, which typically focuses only on COVID-19 or specific viruses. Unlike most retrospective studies, we followed COVID-19 patients throughout their infection for 15 days or during hospitalization. There is limited data on the ApoE isoform and other factors affecting COVID-19 in Brazil, despite the country's high incidence and death rates, ranking fifth in cases and second in deaths globally.

CONCLUSION

Those findings indicate that the e4 allele does not impact the clinical characteristics of flu-like syndromes and is not crucial in the clinical progression of COVID-19. Although not including the unaffected population, this study showed that ApoE allele distribution presents a similar distribution to other Brazilian populations, suggesting no influence of ApoE isoforms on the incidence of these flu-like syndromes. Nonetheless, analysing other factors involved specifically in COVID-19 severity, we found that BMI, male sex and a number of associated comorbidities were the factors that increased the chance of developing a more severe form of COVID-19. At the same time, IL4 was the only factor reducing the chances of the more severe forms.

Funding information

This work was financially supported by grants from Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Merck Sharp and Dohme.

Conflicts of interest

All authors declare no conflict of interest.

Ethical statement

This work was approved by Ethics Committee n° 5.498.897, by the National Research Ethics Committee in Brazil (CONEP) and by the research ethics committees of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (CAAE 40208320.1.2001.0061).

Consent to publish

All patients sign an informed consent term as volunteers.

References

1. Finch CE, Sapolsky RM. The evolution of Alzheimer disease, the reproductive schedule, and apoE isoforms. *Neurobiol Aging* 1999;20:407–428.
2. Huebbe P, Rimbach G. Evolution of human apolipoprotein E (APOE) isoforms: gene structure, protein function and interaction with dietary factors. *Ageing Res Rev* 2017;37:146–161.
3. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res* 2009;50:5183–5188.
4. Vance JM, Farrer LA, Huang Y, Cruchaga C, Hyman BT, et al. Report of the APOE4 National Institute on Aging/Alzheimer Disease Sequencing Project Consortium Working Group: reducing APOE4 in carriers is a Therapeutic Goal for Alzheimer's Disease. *Ann Neurol* 2024;95:625–634.
5. Liu YC, Kuo RL, Shih SR. COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. *Biomed J* 2020;43:328–333.
6. Severe Covid-19 GWAS Group, Ellinghaus D, Degenhardt F, Bujanda L, Buti M, et al. Genomewide association study of severe Covid-19 with respiratory failure. *N Engl J Med* 2020;383:1522–1534.
7. Kurki SN, Kantonen J, Kaivola K, Hokkanen L, Mäyränpää MI, et al. APOE ε4 associates with increased risk of severe COVID-19, cerebral microhaemorrhages and post-COVID mental fatigue: a Finnish biobank, autopsy and clinical study. *Acta Neuropathol Commun* 2021;9:199.
8. Kuo C-L, Pilling LC, Atkins JL, Masoli JAH, Delgado J, et al. APOE ε4 genotype predicts severe COVID-19 in the UK Biobank Community Cohort. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2020;75:2231–2232.
9. Kuo C-L, Pilling LC, Atkins JL, Masoli JAH, Delgado J, et al. ApoE ε4ε4 genotype and mortality with COVID-19 in UK Biobank. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2020;75:1801–1803.
10. Zhang LN, Li MJ, Shang YH, Zhao FF, Huang HC, et al. Independent and correlated role of apolipoprotein E ε4 genotype and herpes simplex virus type 1 in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2020;77:15–31.
11. Burt TD, Agan BK, Marconi VC, He W, Kulkarni H, et al. Apolipoprotein (apo) E4 enhances HIV-1 cell entry *in vitro*, and the APOE ε4 genotype accelerates HIV disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:8718–8723.
12. Chen F, Ke Q, Wei W, Cui L, Wang Y. Apolipoprotein E and viral infection: risks and mechanisms. *Mol Ther Nucleic Acids* 2023;33:529–542.
13. Gao P, Ji M, Liu X, Chen X, Liu H, et al. Apolipoprotein E mediates cell resistance to influenza virus infection. *Sci Adv* 2022;8:eabm6668.
14. Zhao Y, Zhao Z, Wang Y, Zhou Y, Ma Y, et al. Single-cell RNA expression profiling of ACE2, the receptor of SARS-CoV-2. *Am J Respir Crit Care Med* 2020;202:756–759.
15. Chen F, Chen Y, Ke Q, Wang Y, Gong Z, et al. ApoE4 associated with severe COVID-19 outcomes via downregulation of ACE2 and imbalanced RAS pathway. *J Transl Med* 2023;21:103.
16. Chaves JCS, Milton LA, Stewart R, Sonapati T, Rantanen LM, et al. Differential cytokine responses of APOE3 and APOE4 blood-brain barrier cell types to SARS-CoV-2 spike proteins. *J Neuroimmune Pharmacol* 2024;19:22.
17. Fernández-de-Las-Peñas C, Arendt-Nielsen L, Díaz-Gil G, Gómez-Esquer F, Gil-Crujeira A, et al. Apolipoprotein E (ApoE) ε4 genotype (ApoE rs429358-ApoE rs7412 polymorphisms) is not associated with long COVID symptoms in previously hospitalized COVID-19 survivors. *Genes* 2023;14:1420.
18. Oliveira DN, Tavares-Júnior JW, Feitosa WLQ, Cunha LCV, Gomes CMP, et al. Long-COVID olfactory dysfunction: alloloe E4 of apolipoprotein E as a possible protective factor. *Arq Neuropsiquiatr* 2024;82:1–7.
19. Organization. WH. Novel coronavirus COVID-19 therapeutic trial synopsis. Geneva, Switzerland; 2020.
20. Lu X, Wang L, Sakthivel SK, Whitaker B, Murray J, et al. US CDC real-time reverse transcription PCR panel for detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Emerg Infect Dis* 2020;26:1654–1665.
21. Dancov C, Reidy J. *Statistics without Maths for Psychology*. Pearson Education, 2020.
22. Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a "thrifty" allele? *Ann Hum Genet* 1999;63:301–310.
23. Souza DRS, Nakachima L, Biagioni RB, Nakazono MA, Pinhal MAS, et al. Relevance of apolipoprotein E4 for the lipid profile of Brazilian patients with coronary artery disease. *Braz J Med Biol Res* 2007;40:189–197.
24. Demarchi DA, Salzano FM, Altuna ME, Fiegenbaum M, Hill K, et al. APOE polymorphism distribution among Native Americans and related populations. *Ann Hum Biol* 2005;32:351–365.
25. Arrifano G, Alvarez-Leike J, Souza-Monteiro J, Augusto-Oliveira M, Paraense R, et al. In the Heart of the Amazon: noncommunicable diseases and apolipoprotein E4 genotype in the riverine population. *LJERPH* 2018;15:1957.
26. Fuzikawa AK, Peixoto SV, Taufer M, Moriguchi EH, Lima-Costa MF. Apolipoprotein E polymorphism distribution in an elderly Brazilian population: the Bambuí Health and Aging Study. *Braz J Med Biol Res* 2007;40:1429–1434.
27. Lumsden AL, Mulugeta A, Zhou A, Hyppönen E. Apolipoprotein E (APOE) genotype-associated disease risks: a phenotype-wide, registry-based, case-control study utilising the UK Biobank. *EBioMedicine* 2020;59:102954.
28. Goldstein MR, Poland GA, Graeber ACW. Does apolipoprotein E genotype predict COVID-19 severity? *QJM* 2020;113:529–530.
29. Tavares-Júnior JW, Oliveira DN, da Silva JBS, Feitosa WLQ, Sousa AVM, et al. Long-covid cognitive impairment: cognitive assessment and apolipoprotein E (APOE) genotyping correlation in a Brazilian cohort. *Front Psychiatry* 2022;13:947583.
30. Kasparian K, Graykowski D, Cudaback E. Commentary: APOE ε4 genotype predicts severe COVID-19 in the UK Biobank Community Cohort. *Front Immunol* 2020;11:1939.
31. Conti P, Younes A. Coronavirus COVID-19/SARS-CoV-2 affects women less than men: clinical response to viral infection. *J Biol Regul Homeost Agents* 2020;34:339–343.
32. Takahashi T, Ellingson MK, Wong P, Israelow B, Lucas C, et al. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature* 2020;588:315–320.
33. Caussy C, Pattou F, Wallat F, Simon C, Chalopin S, et al. Prevalence of obesity among adult inpatients with COVID-19 in France. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2020;8:562–564.
34. Klang E, Kassim G, Soffer S, Freeman R, Levin MA, et al. Severe obesity as an independent risk factor for COVID-19 mortality in hospitalized patients younger than 50. *Obesity* 2020;28:1595–1599.
35. Anderson MR, Galaris J, Anderson DR, Zuckerman J, Nobel YR, et al. Body mass index and risk for intubation or death in SARS-CoV-2 infection: a retrospective cohort study. *Ann Intern Med* 2020;173:782–790.

36. Goyal P, Ringel JB, Rajan M, Choi JJ, Pinheiro LC, et al. Obesity and COVID-19 in New York City: a retrospective cohort study. *Ann Intern Med* 2020;173:855–858.
37. Tartof SY, Qian L, Hong V, Wei R, Nadjafi RF, et al. Obesity and mortality among patients diagnosed with COVID-19: results from an integrated health care organization. *Ann Intern Med* 2020;173:773–781.
38. Kruglikov IL, Scharer PE. The role of adipocytes and adipocyte-like cells in the severity of COVID-19 infections. *Obesity* 2020;28:1187–1190.
39. Kass DA. COVID-19 and severe obesity: a big problem? *Ann Intern Med* 2020;173:840–841.
40. Gallo Marin B, Aghagholi G, Lavine K, Yang L, Siff EJ, et al. Predictors of COVID-19 severity: a literature review. *Rev Med Virol* 2021;31:1–10.
41. Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, Bacon S, Bates C, et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature* 2020;584:430–436.
42. Chatterjee S, Nalla LV, Sharma M, Sharma N, Singh AA, et al. Association of COVID-19 with comorbidities: an update. *ACS Pharmacol Transl Sci* 2023;6:334–354.
43. Russell CD, Lone NI, Baillie JK. Comorbidities, multimorbidity and COVID-19. *Nat Med* 2023;29:334–343.
44. Dzsurrekci Y, Aykac K, Er AG, Halacli B, Arasli M, et al. Predictive value of cytokines/chemokine responses for the disease severity and management in children and adult cases with COVID-19. *J Med Virol* 2021;93:2828–2837.
45. Liu Y, Chen D, Hou J, Li H, Cao D, et al. An inter-correlated cytokine network identified at the center of cytokine storm predicted COVID-19 prognosis. *Cytokine* 2021;138:155365.
46. Chang Y, Bai M, You Q. Associations between serum interleukins (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-22, IL-27, IL-33, IL-35, IL-36, IL-37, IL-38, IL-39, IL-40, IL-41, IL-42, IL-43, IL-44, IL-45, IL-46, IL-47, IL-48, IL-49, IL-50, IL-51, IL-52, IL-53, IL-54, IL-55, IL-56, IL-57, IL-58, IL-59, IL-60, IL-61, IL-62, IL-63, IL-64, IL-65, IL-66, IL-67, IL-68, IL-69, IL-70, IL-71, IL-72, IL-73, IL-74, IL-75, IL-76, IL-77, IL-78, IL-79, IL-80, IL-81, IL-82, IL-83, IL-84, IL-85, IL-86, IL-87, IL-88, IL-89, IL-90, IL-91, IL-92, IL-93, IL-94, IL-95, IL-96, IL-97, IL-98, IL-99, IL-100) and COVID-19. *Biomol Res Int* 2022;2755246.
47. Murza MY, Hwaiz RA, Hamad BK, Mohammad KA, Hama HA, et al. Analysis of cytokines in SARS-CoV-2 or COVID-19 patients in Erbil city, Kurdistan Region of Iraq. *FLoS One* 2021;16:e0250330.
48. Bourhis M, Idir A, Machraoui S, Hachimi A, Elouardi Y, et al. Cytokine and chemokine profiles in the sera of COVID-19 patients with different stages of severity. *Cytokine* 2024;180:156653.
49. Vaz de Paula CB, de Azevedo MLV, Nagashima S, Martins APC, Malaquias MAS, et al. IL-4/IL-13 remodeling pathway of COVID-19 lung injury. *Sci Rep* 2020;10:18689.
50. Cabaro S, D'Esposito V, Di Matola T, Sale S, Cennamo M, et al. Cytokine signature and COVID-19 prediction models in the two waves of pandemics. *Sci Rep* 2021;11:20793.
51. Gadotti AC, de Castro Deus M, Telles JP, Wind R, Goes M, et al. IFN- γ is an independent risk factor associated with mortality in patients with moderate and severe COVID-19 infection. *Virus Res* 2020;289:198171.
52. Kozak K, Pavlyshyn H, Kamysnyy O, Shevchuk O, Korda M, et al. The relationship between COVID-19 severity in children and immunoregulatory gene polymorphism. *Viruses* 2023;15:2093.
53. Deb P, Zannat KE, Talukder S, Bhuiyan AH, Jilani MSA, et al. Association of HLA gene polymorphism with susceptibility, severity, and mortality of COVID-19: a systematic review. *HLA* 2022;99:281–312.
54. Bakaros E, Voulgaridi I, Paliatsa V, Gatselis N, Germanidis G, et al. Innate immune gene polymorphisms and COVID-19 prognosis. *Viruses* 2023;15:1784.
55. Li Y, Chen X-Y, Gu W-M, Qian H-M, Tian Y, et al. A meta-analysis of tumor necrosis factor (TNF) gene polymorphism and susceptibility to influenza A (H1N1). *Comput Biol Chem* 2020;89:107385.

The Microbiology Society is a membership charity and not-for-profit publisher.

Your submissions to our titles support the community – ensuring that we continue to provide events, grants and professional development for microbiologists at all career stages.

Find out more and submit your article at microbiologyresearch.org