



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Lucas Haniel de Araújo Ventura

**BIOMARCADORES SANGUÍNEOS DA COVID-19 EM
POPULAÇÕES BRASILEIRAS**

Belo Horizonte-MG

2023



Lucas Haniel de Araújo Ventura

**BIOMARCADORES SANGUÍNEOS DA COVID-19 EM
POPULAÇÕES BRASILEIRAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Caetano de Faria

Coorientadora: Dra. Andréa Teixeira de Carvalho

Belo Horizonte-MG

2023

043

Ventura, Lucas Haniel de Araújo.

Biomarcadores sanguíneos da COVID-19 em populações brasileiras [manuscrito] / Lucas Haniel de Araújo Ventura. – 2023.

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Caetano de Faria. Coorientadora: Dra. Andréa Teixeira de Carvalho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Covid-19. 3. Vírus da SARS. 4. Envelhecimento. 5. Inflamação. I. Faria, Ana Maria Caetano de. II. Carvalho, Andréa Teixeira de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LUCAS HANIEL DE ARAÚJO VENTURA. Aos dezesseis dias do mês de fevereiro de 2023 às 14:00 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 dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Biomarcadores sanguíneos da COVID-19 em populações brasileiras”, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Ana Maria Caetano de Faria, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Fabiana Simão Machado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Moisés Evandro Bauer (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul), aprovado; Dra. Andréa Teixeira de Carvalho - Coorientadora (Centro de Pesquisa Rene Rachou-FIOCRUZ-MG), aprovado; Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

APROVADO
 REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato 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, 16 de fevereiro de 2023.

Dra. Fabiana Simão Machado (UFMG)

Dr. Moisés Evandro Bauer (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul)

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho - Coorientadora (Centro de Pesquisa Rene Rachou-FIOCRUZ-MG)

Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (UFMG)

EXECUÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho é vinculado ao Grupo de Pesquisa em Imunobiologia do Envelhecimento (GIBE), do Laboratório de Imunobiologia (LIB), do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em colaboração com o Grupo Integrado de Pesquisa com Biomarcadores (GIPB), do Instituto René Rachou (IRR - FIOCRUZ/MG)

COLABORADORES

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Dra. Ana Caetano de Faria

Dra. Tatiani Uceli Maioli

Dr. Unai Tupinambás

Doutoranda Giovanna Caliman Camatta

Doutorando Felipe Caixeta Moreira

Doutorando Murilo Soares Costa

Mestranda Cecília Horta Ramalho Pinto

Mestranda Larissa Oliveira de Assis

Mestrando Leandro Nascimento de Souza

Todos os membros que integram o Grupo de Pesquisa em Imunobiologia do Envelhecimento (GIBE) e o Laboratório de Imunobiologia (LIB).

INSTITUTO DE PESQUISA RENÉ RACHOU, FIOCRUZ-MG

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho

Dra. Elaine Speziali de Faria

Dra. Ana Carolina Campi Azevedo

Dra. Dayane Andriotti Otta

Todos os pesquisadores, estudantes e membros do apoio técnico que compõem o Grupo Integrado de Pesquisa de Biomarcadores (GIPB)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)

Dra. Denise Morais Fonseca

Dr. Jofer Zamame Ramirez

Doutoranda Marina Caçador Ayupe

INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS

Rafael Pereira de Souza

Dra. Ana Paula Veiga

Dra. Najara Ataide

Dra. Gabriela Prandi Caetano

UNIDADE DE PRONTO ATENDIMENTO – REGIÃO CENTRO SUL

Dra. Chirley Madureira Rodrigues

Dr. Enderson Correa Bahia

HOSPITAL RISOLETA TOLENTINO NEVES

Dr. Rafael Barbuto

Dr. Henrique Guimarães Cerqueira

CT VACINAS BH-TEC

Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira

Mestrando Hugo Itaru Sato

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA, CAMPUS GOVERNADOR VALADARES-MG

Dra. Gabriela Silveira Nunes Abreu

Dra. Pauline Martins Leite Borges

Todos os alunos de iniciação científica que integram o GIBE em Governador Valadares-MG.

ÓRGÃOS FINANCIADORES

Merck Life (MSD Health)

Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

AGRADECIMENTOS

A realização dessa dissertação de mestrado contou com importantes apoios e incentivos que tornaram este trabalho realidade, sendo eu eternamente grato.

Em primeiro lugar, ao meu DEUS, pois tudo o que eu faço é para exaltar o Teu nome. Este trabalho não seria possível sem a Sua intervenção, portanto que toda honra e toda glória sejam dadas ao meu Senhor JESUS CRISTO.

Aos meus pais, Luiz Ventura da Silva e Renata Imaculada de Araújo Ventura. Só nós três sabemos o que vivemos nestes últimos anos. Quando penso em tudo o que viveram para que conquistas como esta, antes sendo sonhos distantes e hoje, realidade, me emociono e agradeço a Deus, que por amor, escolheu ouvir as nossas orações e permitiu que tudo fosse possível. Agradeço por, em muitos momentos, terem anulado suas vidas para estarem inteiramente concentrados na minha criação, formação, estarem presentes em meus momentos importantes e me concederem uma imensurável atenção. Me esforço todos os dias para que este sacrifício, possa ter excelentes resultados e sempre tento ser um homem melhor, um cristão mais dedicado e comprometido, um excelente profissional, um eterno e esforçado estudioso e tantas outras coisas que me ensinaram. Muito obrigado! Esta conquista não é minha, é nossa!

À minha orientadora Dra. Ana Maria Caetano de Faria, um dos meus maiores exemplos profissionais, com sua genialidade, simpatia, paciência, empatia e simplicidade que me impressionam a cada dia mais. Sou muito grato por ter me aceitado como seu aluno de iniciação científica no dia 3 de setembro de 2018, me abrindo as portas da ciência e, alguns anos depois, me aceitando como seu aluno de mestrado e confiar a mim este grande projeto, um dos maiores desafios da minha vida, que, com o seu apoio, orientação, confiança no meu trabalho e nas decisões tomadas, pude ter segurança para continuar e concluir este desafio. Serei eternamente grato. Mais uma vez muito obrigado por mais uma grande oportunidade!

À minha coorientadora Dra. Andréa Teixeira de Carvalho, que me abriu as portas do seu laboratório e da FIOCRUZ-MG, e assim como a Ana, me aceitou como seu aluno e me ensinou grande parte de tudo que aplico no cotidiano. Gostaria de dizer o quanto te admiro e em sinto privilegiado em estar sob a sua orientação, e o quão grato sou por todo cuidado, carinho e preocupação que eu estivesse incluído em seu grupo de pesquisa e tivesse acesso a tudo que a FIOCRUZ disponibiliza e me sentisse “em casa” e confortável para trabalhar. Para sempre lhe serei grato. Muito Obrigado!

À minha família, ficam os meus agradecimentos para todos aqueles que me apoiaram e se alegraram das minhas conquistas ao longo destes anos. Destaco a minha querida avó Geralda Lina de Aguiar Araújo, hoje perto de completar 91 anos, desde a minha infância tem um grande carinho por mim e se tornou para mim uma grande inspiração, sobretudo ao fato de se trabalhar com envelhecimento saudável, onde a pergunta que eu sempre fazia a ela (Qual o segredo de viver tão bem por tanto tempo?), é também a que busco responder como imunologista todos os dias. Destaco minhas tias Ione Delourdes de Araújo, Maria Salete de Araújo Dias, Ivone de Fátima Araújo e Ivanita Paulina de Araújo e meus tios Jean Carlo de Araújo e Edson Dias Corrêa Filho (*in memoriam*), que também sempre me incentivaram ao longo destes anos e da minha vida. Por fim, não poderia esquecer da minha querida prima/irmã Dryelle Carolina Araújo Barbosa, que é muitíssimo especial para mim e que tenho muito carinho e amor, e meu primo e grande amigo Douglas Santiago, cuja amizade tem sido maravilhosa.

Aos meus amigos, a quem considero uma segunda família. Meu amigo Guilherme, com mais de 5 anos de uma verdadeira irmandade. À minha família da Central Luxemburgo no qual faz parte também minha célula, com meus queridos João Pedro e Deza, Lipe e Sarinha, Luisinho, Jonathan Gomes (Diógenes), Gustavo e Bela, Raphinha e Jéssica, Hellen e Matt e todos os outros que ainda não tive a oportunidade de conviver, mas que em breve terei. Aos meus amigos do futebol, juntos já por quase 1 década, Marcos Paiva, Diego Marinho, Edward Jr. e Gustavo Monteiro. Aos meus amigos da SGC Eldorado, que seguem em lugar muito especial no meu coração, Elias Shettner, Ramon e Thiago. Por fim, agradeço a todos os meus pastores que estiveram comigo e me ajudaram a aproximar mais de Deus todos estes anos, ficam meus agradecimentos ao pr. Antônio José (*in memoriam*), pra. Rita Faria, pr. Antônio Cirilo, pr. Márcio, pr. Paulo Mazoni e pr. Osvaldo Kentura.

Às minhas queridas amigas que amo muito, Giovanna Caliman Camatta e Cecília Horta, que entraram na minha vida em meio a pandemia da COVID-19, mas que do trabalho se tornaram grandes amigas. Muito obrigado pelo carinho, por essa amizade e pela parceria no mestrado, digo em todas as oportunidades que o sucesso deste trabalho deve ser dividido com vocês, sem vocês nada seria possível. Também a todo o grupo “Experts” que assim como Gio e Ceci, amo demais! Juliana Sampaio, Clara Fernandes, Camila Costa e Marcos Felipe. À professora Dra. Gabriela Silveira Nunes Abreu, que considero uma grande amiga e eterna coorientadora, pelo constante suporte e apoio. Muito obrigado!. A todo o grupo que denominamos “Oráculo”, Vinícius Dantas, Lícia Torres e Mariana Almeida, são pessoas muito especiais para mim e que se tornaram grandes amigos após seguidas noites de experimento. Finalmente, não poderia deixar de agradecer aos irmãos que a FIOCRUZ me deu nesta pandemia da COVID-19, meus grandes amigos Ladson Lúcio e Hassan Martins, além da minha querida amiga Marina Silvestrini, sou muito grato pelo suporte no trabalho, pelo apoio na vida e por essa amizade e parceria.

À Dra. Juliana Lima e Dra. Ana Carolinas de Las Ballonas Campolina, que são muito especiais para mim. Minha carreira acadêmica começou com uma oportunidade de trabalhar com a Dra. Ana Carolina em seu doutorado, onde não só aprendi muito como me apaixonei pela ciência e ganhei uma grande amiga. À Dra. Juliana Lima, sou grato por confiar tanto em meu trabalho todos esses anos e por tudo que me ensinou, muita da minha experiência com laboratório veio de seus ensinamentos, além disso, eu sempre serei grato por me convidar para sua igreja e célula, onde você e o João Gabriel exerceram um papel muito importante como meus primeiros líderes e me ajudaram a estreitar meu relacionamento com Deus. Muito obrigado!

Agradeço as professoras Tatiani Maioli (UFMG) e Denise Fonseca (USP) por todas as orientações, discussões e apoio durante a realização deste trabalho.

Agradeço a todos os colaboradores do GIPB que de maneira diferente me ajudaram muito, orientando, ensinando e apoiando ao longo deste trabalho. Destaco a Elaine Speziali que ajudou nos experimentos Luminex, a Dra. Dayane Otto e a Dra. Ana Carolina Campi que

além de muito me ensinarem, realizaram a aquisição de todos meus experimentos na plataforma de citometria da FIOCRUZ-MG. Agradeço também o apoio técnico do GIPB, além de todos os estudantes que estão presentes diariamente no laboratório.

A todos os estudantes e colaboradores do LIB, que desde 2018 estão sempre disponíveis a ensinar e ajudar com o que for preciso, além de estabelecermos importantes amizades. Destaco meus amigos(as) Fernanda Calvo, Felipe Caixeta, Leandro Nascimento pelo suporte nestes últimos anos. Agradeço também a todos os integrantes do Grupo de Pesquisa em Imunobiologia do Envelhecimento que sempre apoiaram e ajudaram ao longo destes últimos anos (GIBE).

Agradeço todos de Governador Valadares, na UFJF, em especial a Dra. Pauline e as alunas Maria Eduarda Passos e Ana Clara. Agradeço também, a todos de São Paulo, na USP com destaque para o Dr. Jofer Zamame e os doutorandos Caio e Marina e no Instituto Emílio Ribas, com destaque para o Rafael Souza e a Dra. Ana Paula Veiga. Todos tiveram um papel crucial na realização deste trabalho.

Agradeço todos da UPA-CS, Chirley, Lays, Bruna, Débora, Dr. Enderson, Dra. Ana Paula, Samuel, Murilo, e todos do Hospital Risoleta Tolentino Neves, ao Dr. Henrique Cerqueira, Dr. Rafael Barbuto e a enfermeira chefe Tatiana, todos fundamentais para realização deste trabalho e sempre disponíveis para ajudar.

Por fim, gostaria de agradecer a todos os professores e instituições que ajudaram na minha instrução desde a infância, todos vocês exerceram um papel importante na formação de quem eu sou hoje e compartilho com vocês esta realização. Em especial, destaco a Escola Cristã de Contagem, onde cursei o ensino Fundamental I e parte do Fundamental II, com destaque para Alcione, Quênia e as professoras Miriã (minha primeira professora) e Adriana (que me ensinou a ler), além de muitos outros professores. Destaco também, o Instituto Elizabeth Kalil, onde concluí o ensino Fundamental II e o Ensino Médio, destacando a diretora Suraya Kalil, as coordenadoras Andréa e Rosana, além de todos os professores, com destaque especial para Mervina (Língua Portuguesa e Literatura), José Maria (História), Patrícia

(Física) e Luiz Carlos Santini (Filosofia e Sociologia). Finalmente, meu querido Centro Universitário UNA, em que sou imensamente grato por todos os ensinamentos e direcionamento profissional, que sempre trataram com muito respeito e profissionalismo, destaco em especial a coordenadora dos cursos da saúde no campus barreiro Rozilene Lima e os professores Sérgio Luis (eterno Serjão de Fisiologia e Perfusão Extracorpórea), Jorgino Julio César (Bioquímica Clínica), Paula Suzana (Embriologia), Fábio Lima (Bioquímica I e Urinálise), **Ariane Baratta (Imunologia)**, Fabrício (Biologia Molecular) e Cristina (Genética), sou imensamente grato a tudo que me ensinaram e auxiliaram na minha formação, todos vocês fazem parte desta história.

*“Um pouco de ciência nos afasta de Deus,
mas muita, nos aproxima”*

Louis Pasteur

*“Você comerá do fruto do seu trabalho e
será feliz e próspero”.*

Salmos 128:2

*“E tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo
coração, e não aos homens, sabendo que
recebereis do Senhor o galardão da
herança, porque Cristo, o Senhor, servis”.*

Colossenses 3:23-24

RESUMO

O SARS-CoV-2 é um β -coronavírus capaz de causar a COVID-19 e responsável pela mais recente grande pandemia de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG). Desde os primeiros casos relatados da doença, notou-se que os idosos eram mais suscetíveis a quadros mais graves da doença e ao óbito, mesmo quando comparados a outros grupos com comorbidades inflamatórias como doenças cardiovasculares e obesidade. O envelhecimento é acompanhado de uma inflamação crônica, sistêmica e de baixo grau que foi denominada como *inflammaging*. Esse estado inflamatório está relacionado a várias doenças inflamatórias e degenerativas em idosos frágeis. Algumas regiões do Brasil ainda se caracterizam como zona endêmica para muitas doenças infecciosas. Nosso grupo tem mostrado que, nessas áreas, a exposição elevada e contínua a estímulos infecciosos acelera o envelhecimento dos indivíduos que ali residem, levando a consequências inexploradas em termos imunológicos. Sendo assim, a hipótese deste estudo é que o *inflammaging* nos idosos assim como o perfil inflamatório que indivíduos não idosos apresentam, podem ser um fator determinante no desfecho clínico grave da COVID-19. Nosso objetivo foi avaliar o perfil clínico, laboratorial e inflamatório de adultos (18 a 59 anos) e idosos (acima de 60 anos) com COVID-19 em Belo Horizonte, MG, Governador Valadares, MG (região endêmica para várias doenças infecciosas) e São Paulo, SP. Para isso, 309 indivíduos com sintomas iniciados entre 1 a 7 dias foram recrutados, testados para infecção por SARS-CoV-2, por meio da técnica de RT-PCR, e divididos em diferentes grupos clínicos, sendo: um grupo com sintomas gripais (negativo para SARS-CoV-2) e grupos com COVID-19 classificados nas formas clínicas leve, moderado ou grave. Todos os indivíduos tiveram seu plasma sanguíneo analisado por ensaio Luminex (usando o kit Bio-Plex® Pro Human Cytokine Standard, da BioRad) para 27 citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias. Os resultados confirmaram nossa hipótese. Nossos dados mostram que mediadores como CXCL8, CXCL10, CCL2, IFN- γ , IL-12p70, IL-6, IL-10 e IL-1Ra, que se destacam na inflamação da COVID-19 e sendo alguns também presentes no *inflammaging*, se encontravam aumentados nos indivíduos mais graves quando comparados com os indivíduos com COVID-19 leve ou negativos. Observamos ainda um perfil ainda mais singular nos idosos. Os resultados mostraram diferenças significativas no plasma de indivíduos adultos quando comparados com os idosos e entre diferentes grupos clínicos. Nossa conclusão é que a inflamação na fase inicial da doença parece estar associada ao agravamento da COVID-19. No entanto, mais análises são necessárias para completar o painel inflamatório e confirmar esses dados.

Palavras-Chave: COVID-19, SARS-CoV-2, Envelhecimento, *Inflammaging*.

ABSTRACT

SARS-CoV-2 is a β -coronavirus capable of causing COVID-19 and responsible for the most recent major pandemic of severe acute respiratory syndrome (SARS). Since the first reported cases of the disease, it was noted that the elderly was more susceptible to more severe cases of the disease and death, even when compared to other groups with inflammatory comorbidities such as cardiovascular disease and obesity. Aging is accompanied by a chronic, systemic, and low-grade inflammation that is called inflammaging. This inflammatory state is related to several inflammatory and degenerative diseases in frail elderly people. Some regions of Brazil are still characterized as an endemic zone for many infectious diseases. Our group has shown that, in these areas, high and continuous exposure to infectious stimuli accelerates the aging of individuals who live there, leading to unexplored consequences in terms of senescence. Therefore, the hypothesis of this study is that the inflammaging in the elderly, as well as the inflammatory profile of adult individuals may be a determining factor in the severe clinical outcome of COVID-19. Our objective was to evaluate the clinical, laboratory and inflammatory profile of adults (18 to 59 years old) and elderly people (over 60 years old) with COVID-19 in Belo Horizonte, MG, Governador Valadares, MG (endemic region for several diseases) and São Paulo, Paul, SP. For this, 309 individuals with symptoms between 1 and 7 days were recruited, tested for SARS-CoV-2 infection using the RT-PCR technique and divided into different clinical groups: a group with flu symptoms who were negative for SARS-CoV-2, groups with COVID-19 and classified as mild, moderate or severe. All subjects had their blood plasma analyzed by Luminex assay (using BioRad's Bio-Plex® Pro Human Cytokine Standard Kit) for 27 pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines. The results confirm our hypothesis. Mediators such as CXCL8, CXCL10, CCL2, IFN- γ , IL-12p70 IL-6, IL-10 and IL-1Ra, which are heightened in the inflammation of COVID-19, and some also present in the inflammaging, were increased in individuals with severe COVID-19 when compared to individuals with mild disease or negative controls. A unique profile of inflammation was also found in the elderly. Significant differences were observed in the plasma of adult individuals when compared with the elderly and when different clinical groups were compared. Our conclusion is that the inflammatory profile at the initial stage of COVID-19 appears to be associated with worsening the disease. However, further analyzes are needed to complete the inflammatory panel and confirm these data.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, Aging, Inflammaging.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2: *Angiotensin-Converting Enzyme-2* (Enzima Conversora de Angiotensina 2)

ACE2r: *Angiotensin-Converting Enzyme-2 Receptor* (Receptor da Enzima Conversora de Angiotensina 2).

AT: Atrofia Tímica.

CBA: *Cytometric Bead Array*.

CDK: *Cyclin-Dependent Kinases* (Quinases Dependentes de Ciclina).

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa.

CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

COVID-19: *Coronavirus disease 2019*.

CS: *Cytokine Storm* (Tempestade de Citocinas).

DIS: Dia de Início de Sintomas.

EVO: Evoluíram (refere-se aos pacientes que evoluíram clinicamente da forma leve para grave de COVID-19, durante o estudo).

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

FGF-basic: *Fibroblast Growth Factor-Basic* (Fator de Crescimento de Fibroblasto-Básico).

G-CSF: *Granulocyte Colony-Stimulating Factor* (Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos).

GIPB: Grupo Integrado de Pesquisas com Biomarcadores.

GM-CSF: *Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor* (Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos/Macrófagos).

HIF1: *Hipoxia-Inducible Factor 1* (Fator Induzível por Hipóxia 1).

HIV: *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana).

ICB: Instituto de Ciências Biológicas.

ICTV: *International Commite on Taxonomy of Viruses* (Comité Internacional de Taxonomia dos Vírus).

IEL: *Intraepithelial Lymphocytes* (Linfócitos Intraepiteliais).

IFN- γ : *Interferon- γ* .

IIER: Instituto de Infectologia Emílio Ribas.

IL: *Interleucin* (Interleucina).

IRR: Instituto de Pesquisa René Rachou, FIOCRUZ/MG

IMC: Índice de Massa Corporal.

IRR: Instituto de Pesquisa René Rachou.

LHP: Laboratório Hermes Pardini®.

LIM: Laboratório de Imunologia de Mucosas.

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinases* (Proteína Quinase Ativada por Mitógeno).

N: Nucleopasídeo.

NAP-1: *Neutrophil Activating Protein-1* (Proteína Ativadora de Neutrófilos 1).

NF-κB: *Nuclear Factor Kappa B*.

NK: (Células) *Natural Killers*.

PCR: Proteína C-Reativa.

PDGF-BB: *Platelet Derived Growth Factor-BB* (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas-BB).

RAS: *Renin-angiotensin System* (Sistema Renina Angiotensina).

RBD: *Receptor-Binding Domain* (Domínio de Ligação ao Receptor).

RT-PCR: *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia Polimerase em Tempo Real).

S: Spike.

SASP: *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (Fenótipo Secretório Associado a Senescência).

SARS: *Severe Acute Respiratory Syndrome* (Síndrome Respiratória Aguda Grave).

SCF: *Stem Cell Factor* (Fator de Célula Tronco).

SG: Síndrome Gripal.

SRA: Síndrome Respiratória Aguda.

STAT: *Signal Transducers and Activators of Transcription* (Tradutores de Sinal e Ativadores de Transcrição).

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TGF-β: *Transformation Growth Factor β* (Fator de Crescimento de Transformação β).

Th: *T helper* (T Auxiliar).

Tfh: *T Follicular Helper* (Auxiliar Folicular).

TNF-α: *Tumoral Necrose Factor α* (Fator de Necrose Tumoral α).

TR: Trato Respiratório.

TREG: (Células) T Reguladoras.

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais.

UNIVALE: Universidade Vale do Rio Doce.

UPA-CS: Unidade de Pronto Atendimento - Centro Sul.

USP: Universidade de São Paulo.

VEGF: *Vascular Endotelial Growth Factor* (Fator de Crescimento Vascular Endotelial).

WHO: *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cronologia das Pandemias Respiratórias Até o Ano de 2019	25
Figura 2: Rede Filogenética de Distribuição da COVID-19 Pelos Países Até 2020	27
Figura 3: Origem do Vírus SARS-CoV-2 e Sua Transmissão Para os Humanos	29
Figura 4: Estrutura da Spike, RBD e ACE2	34
Figura 5: Replicação do SARS-CoV-2 na Célula do Hospedeiro	35
Figura 6: Infecção Viral e Resposta Imune Durante a COVID-19.....	37
Figura 7: Visão Geral do Processo de Envelhecimento Fisiológico	42
Figura 8: Sobreposição de Citocinas e Quimiocinas do Perfil do <i>Inflammaging</i> e do Processo Inflamatório Desencadeado pela Infecção do SARS-COV-2.....	47
Figura 9: Desenho do Estudo.....	51
Figura 10: Fluxograma de Seleção dos Voluntários.....	53
Figura 11: Ensaio Luminex Sorológico Para SARS-CoV-2	62
Figura 12: Influência do Sexo dos Voluntários no Seu Perfil Inflamatório	68
Figura 13: Influência da Raça/Etnia dos Voluntários no Seu Perfil Inflamatório	72
Figura 14: Influência dos Biomarcadores Bioquímicos nas Formas Clínicas da COVID-19.....	74
Figura 15: Influência do Perfil Inflamatório dos Voluntários nos Diferentes Dias Após o Início dos Sintomas na Formas Clínicas da COVID-19	76
Figura 16: Análise Global do Perfil Inflamatório dos Voluntários com COVID-19 e SG nos Primeiros 7 Dias Após o Início dos Sintomas	78
Figura 17: Influência da Carga Viral de Indivíduos Infectados no Desenvolvimento das Diferentes Formas Clínicas da COVID-19.....	79
Figura 18: Comparação do Perfil Inflamatório dos Voluntários das 3 Cidades do Brasil.	81
Figura 19: Comparação dos Indivíduos com COVID-19 de Área Endêmica (Governador Valadares) e Não Endêmica (Belo Horizonte) Por Faixa Etária (Adultos e Idosos).....	85
Figura 20: Relação do <i>Inflammaging</i> em Populações de Cidades Não Endêmicas (Belo Horizonte e São Paulo) no Desfecho da COVID-19	87
Figura 21: Análise Longitudinal da Produção de Mediadores Plasmáticos em Indivíduos com COVID-19 Hospitalizados em Belo Horizonte	91
Figura 22: Análise do Perfil Inflamatório de Voluntários com COVID-19 (Leve) que Evoluíram para a Forma Grave da Doença.....	94
Figura 23: Comparação do Perfil Inflamatório de Indivíduos com COVID-19 e SG Vacinados Com COVID-19 Reinfectedos.....	96

Figura 24: Comparação do Perfil Inflamatório de Indivíduos com COVID-19 e SG
Vacinação Com COVID-19 Reinfectedos98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios de Inclusão e Exclusão do Estudo.....	52
Tabela 2: Número e Características dos Participantes do Estudo	54
Tabela 3: Classificação dos Pacientes com as Diferentes Formas Clínicas da COVID-19.....	56
Tabela 4: Painel de Mediadores Sanguíneos Medidos pelo Kit Bio-Plex® Pro Human Cytokine Standard.....	59
Tabela 5: Painel de Mediadores Sanguíneos Medidos pela Técnica do CBA (BD)...	61
Tabela 6: Painel de Exames Bioquímicos.....	61
Tabela 7: Tabela Populacional de Indivíduos Utilizados na Análise	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Pandemias Respiratórias	23
1.2. História da COVID-19	25
1.3. A Origem e Início da Transmissão Horizontal do SARS-CoV-2	27
1.4. O Processo de Envelhecimento Fisiológico e a COVID-19	29
1.5. Epidemiologia do COVID-19 no Brasil e no Mundo	32
2 REVISÃO DE LITERATURA	32
2.1. Fisiopatologia e Infecção do SARS-CoV-2	32
2.2. A Imunossenescência e o <i>Inflammaging</i>	38
2.3. Mediadores Sanguíneos Associados ao <i>Inflammaging</i> e à COVID-19	42
3. JUSTIFICATIVA	49
4. OBJETIVOS	50
4.1. Objetivo Geral	50
4.2. Objetivos Específicos	50
5. MÉTODOLOGIA	50
5.1. Desenho do Estudo e Coleta dos Dados	50
5.2. Critérios Clínicos para Classificação Pacientes com COVID-19	55
5.3. Coleta de Material Biológico	57
5.4. Medida de Mediadores Plasmáticos pela Técnica de Luminex	58
5.5. Exames Complementares para Medida de Mediadores no Plasma	60
5.6. Medida de Marcadores Bioquímicos	61
5.7. Medida de Anticorpos Séricos Anti-Sars-CoV-2	62
5.8. Análise Estatística	63
5.8.1. Teste de Normalidade	63
5.8.2. Teste de Mann Whitney	63
5.8.3. Teste de Kruskal Wallis e Pós Teste de Dunn's	63
5.8.4. Teste ROUT	63

5.9. Gráficos.....	64
5.9.1. Radar	64
5.9.2. Violino	64
5.9.3. Correlograma de Correlação de Spearman	64
5.9.4. <i>Heatmap</i>	64
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
6.1. Análise das Características da População do Estudo	65
6.2. Análises dos Mediadores Plasmáticos para Caracterização da Ppopulação do Estudo	67
7. CONCLUSÕES	100
LIMITAÇÕES	101
PERSPECTIVAS.....	102
REFERÊNCIAS.....	103
ANEXOS.....	117
Anexo 01. Fotografias Históricas da “Gripe Espanhola”	117
Anexo 02. Projeto Aprovado no Comité de Ética e Pesquisa.....	120
Anexo 03. Protocolo de Coleta de <i>Swab</i> para Detecção do SARS-CoV-2.....	130
Anexo 04. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	131
Anexo 05. Questionário Clínico e Sociodemográfico	135
Anexo 06. Questionário Clínico e Sociodemográfico (versão resumida).....	137
Anexo 07. Questionário de Telemonitoramento Clínico	140
Anexo 08. Protocolo de Coleta de Sangue.....	143
Anexo 09. Protocolo para Obtenção de Soro/Plasma	145
Anexo 10. Artigo Submetido com Dados Presentes Neste Trabalho	147

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pandemias Respiratórias

O contexto de pandemias respiratórias, apesar do surgimento da última pandemia de forma inesperada em 2020, não é uma novidade quando olhamos para a história. No último século, o mundo testemunhou 4 pandemias cujos sintomas foram decorrentes de uma *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS).

Em 1918, o vírus da *influenza* A (chamado na época de “*Swine*” e hoje de H1N1), foi responsável pela morte de cerca de 3% da população mundial (JOHNSON & MUELLER, 2002). A pandemia ficou conhecida por “gripe espanhola”, pelo fato da Espanha, que não participava das batalhas da 1ª guerra mundial, ser a primeira a divulgar em sua imprensa a nova doença. Naquela época, foi noticiado que os maiores índices de mortalidade em 1918 foram em indivíduos de 20 a 39 anos. As gestantes e os jovens que estabeleciam o primeiro contato com a doença dominavam o número total de vítimas. Na cidade da Philadelphia, Pensilvânia-USA, foram registrados 140 mortos a cada 1.000 habitantes, exemplificando a intensidade das infecções causadas por esse vírus (JORDAN, 1927; STARR, 2006). Com o aparecimento de novos casos a cada dia, os governos se depararam com um problema paralelo à doença: o colapso do sistema de saúde, que apresentava número limitado de profissionais, opções e locais para tratamento. Assim, muitas mortes ocorreram por complicações bacterianas e manejo inadequado de pacientes, e não apenas pela evolução das infecções por H1N1 (MORENS & FAUCI, 2007). Algumas das fotografias que marcaram o período da gripe espanhola estão disponíveis no Anexo 1.

Em 1957, quase 40 anos após a pandemia causada pelo vírus H1N1, uma nova cepa do vírus da *influenza* A surge na China com mutações em diferentes segmentos genéticos e partindo da incubação e circulação do vírus em aves. A nova gripe causada pelo vírus H2N2 ficou conhecida como “*Asian Influenza*”. (SCHOLTISSEK *et al*, 1978; KAWAOKA *et al*, 1989). A infecção por esse vírus resultava em uma alta taxa de mortalidade em crianças abaixo de 5 anos e idosos acima de 60 anos, diferentemente da infecção pelo vírus da H1N1 (CHIN *et al*, 1960).

Em julho de 1968, foi registrado um novo surto causado por uma mutação do vírus H2N2 em Hong Kong, na China, sendo esse novo vírus classificado como H3N2 (COCKBURN *et al*, 1969). Chegou-se à conclusão que, como esse vírus não teria mais como infectar aves ou humanos, a mutação teria ocorrido em porcos e estes seriam os responsáveis pela incubação e circulação da nova cepa viral. A infecção pelo vírus H3N2

apresentou parâmetros semelhantes à “*Asian Influenza*” de 1957 (SCHOLTISSEK, 1990). Mais tarde, a pandemia causada pelo vírus H3N2 ficou conhecida como “gripe suína”.

Em 1997, foi criado o nome de “gripe aviária” para a infecção causada pelo vírus H5N1 resultante de uma nova mutação do vírus *influenza A*. O novo vírus começou a ser transmitido novamente de aves para humanos em Hong Kong, na China, tendo sido registrados, na época, 18 casos com 6 mortes (SUBBARAO *et al*, 1998; BRIDGES *et al*, 2002). Em 2003, novos casos de infecção pelo vírus H5N1 foram detectados no sudeste da Ásia, mas, felizmente, a infecção não se espalhou (PEIRIS *et al*, 2004; LI *et al*, 2004), definindo-se apenas como uma epidemia.

Em 2005, a *World Health Organization* (WHO) determinou regulamentos internacionais de saúde frente a doenças consideradas emergentes, incluindo a *influenza A* entre estas. A iniciativa teve a intenção de reduzir os riscos de transmissão e contágio de tais doenças (OMS, 2005; ANVISA, 2005).

Em 2009, de forma inesperada, foram registrados novos casos de uma provável gripe suína no México proveniente de uma nova mutação do vírus H1N1. (DOMINGUEZ-CHERIT *et al*, 2009). Em função principalmente das viagens aéreas, o vírus se espalhou pela América do Norte e por diferentes partes do mundo, registrando a quarta pandemia em 91 anos (DOMINGUEZ-CHERIT *et al*, 2009). Assim como na H1N1 “*swine*”, as mulheres grávidas estavam mais susceptíveis ao vírus, junto a indivíduos com obesidade grau III que não eram comuns no início do século XX. A obesidade apresenta um crescimento exponencial no século XXI à medida que a tecnologia, a globalização e a urbanização evoluem (VAN KERKHOVE *et al*, 2011; MORENS *et al*, 2009).

As coronavíroses, por sua vez, já foram responsáveis por epidemias com sintomas gripais graves causadas pelos vírus SARS-CoV-1 e MERS-CoV; esse último predominante em camelos dromedários (REUSKEN *et al*, 2013). Esses dois vírus se originaram do morcego, entretanto, a transmissão e infecção para animais reservatórios foi a responsável por aumentar a sua amplitude de disseminação. O SARS-CoV-1 (FOUCHIER *et al*, 2003; ROTA *et al*, 2003), que ficou conhecido pela epidemia asiática da SARS, foi responsável por uma forte gripe que afetou, principalmente, as cidades de Guangzhou, na província de Guangdong e Shenzhen na região oeste da China. No entanto, outros casos também foram registrados por todo o país (HE *et al*, 2004). Naquela ocasião, os animais identificados como principais reservatórios da doença foram os

macacos, mais especificamente a espécie *Macaca fascicularis* (FOUCHIER *et al*, 2003). Uma segunda onda da SARS afetou significativamente a cidade de Hong Kong, em função do grande número de transferências de pacientes infectados para as grandes cidades e, obviamente, da facilidade de transmissão do vírus (HE *et al*, 2004; ROTA *et al*, 2003).

Em 2019, tem início a quinta pandemia respiratória em pouco mais de 100 anos (Figura 1). Causada pelo SARS-CoV-2, contaremos sua história em detalhes adiante.

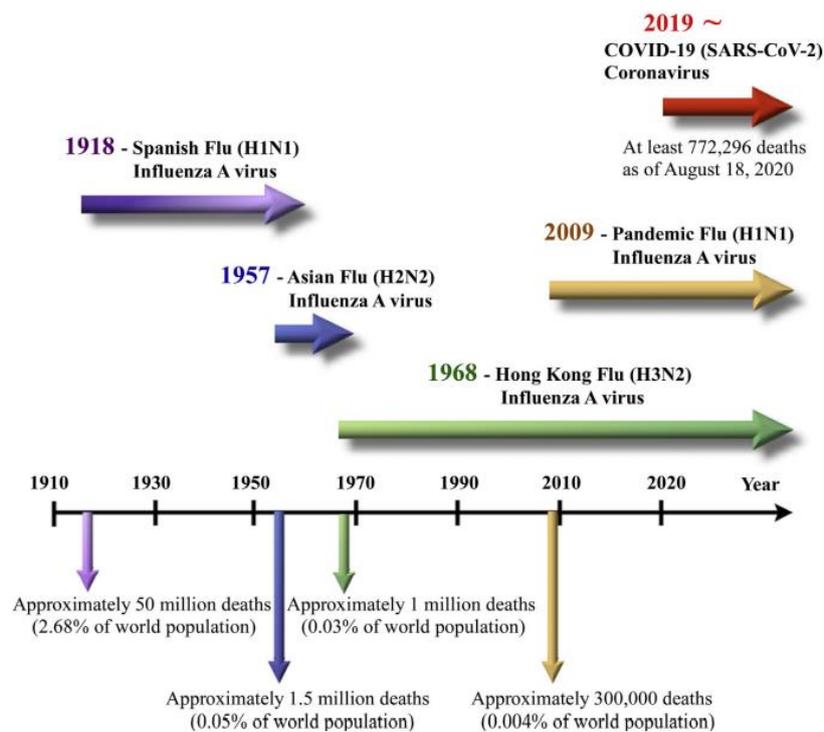


Figura 1: Cronologia das Pandemias Respiratórias Até o Ano de 2019 com a Chegada do SARS-CoV-2. Cada pandemia sendo representada por uma seta com cor específica. É possível observar também o número aproximado de vítimas para cada pandemia e a proporção destas em relação a população mundial. LIU *et al*, 2020

1.2 História da COVID-19

O grande avanço tecnológico do último século permitiu à humanidade uma maior integração social, econômica e cultural de várias regiões do mundo, tornando-o cada vez mais globalizado. Um aspecto positivo da globalização é a oportunidade de registrar, quase que simultaneamente, todos os acontecimentos e descobertas de forma detalhada.

Sendo assim, foi possível traçar uma linha do tempo completa dos eventos relacionados à pandemia do novo coronavírus.

Em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, na China, foram observados casos consecutivos de pneumonia. Entretanto, como havia um aumento considerável do número de casos em um curto período de tempo, notou-se que se tratava de uma doença infectocontagiosa e que já havia infectado 2.761 pessoas levando 80 delas à morte (LAM, *et al*, 2020). Em geral, os indivíduos idosos eram mais susceptíveis à evolução para a forma mais grave da doença (WU *et al*, 2020; GRASSELLI *et al*, 2020). Os pacientes apresentavam, comumente, os seguintes sintomas: febre, “mal-estar”, tosse seca (sem secreção), cefaleia e dispneia, sendo que este último era sempre observado em diagnósticos de pneumonia viral (WU e ZHANG *et al*, 2020; LIU *et al*, 2020; LAM, *et al*, 2020). Foi realizado o sequenciamento do genoma dos indivíduos infectados, o que resultou na descoberta de uma nova cepa de coronavírus capaz de infectar humanos.

No dia 12 de janeiro de 2020, a WHO nomeou provisoriamente o novo vírus como 2019-nCoV e, no dia 12 de fevereiro, o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), baseando-se em estudos da filogenia, taxonomia e morfologia, nomeou oficialmente o 2019-nCoV como SARS-CoV-2 que causa a *Coronavirus disease 2019* (COVID-19) (LIU e KUO *et al*, 2020). Em 26 de janeiro de 2020, o vírus já havia infectado 33 pessoas fora da China em 10 outros países (JOHNSON, 2020; ZHOU, *et al*, 2020; WU e ZHANG *et al*, 2020). Em 25 de fevereiro de 2020, o Brasil relatou seu primeiro caso positivo de COVID-19, uma pessoa que chegou através de um voo direto da Itália.

Um estudo de FOSTER, *et al*, 2020, comparou o genoma viral de diferentes indivíduos infectados pelo mundo, mostrando uma rede filogenética de disseminação da COVID-19 pelos países (Figura 2). No Brasil, constatou-se que se tratava da mutação G26144T, caracterizada por uma troca de aminoácidos, especificamente, Glicina por Valina na proteína Spike, que será discutida adiante (FOSTER, *et al*, 2020; MANUTO, *et al* 2022).

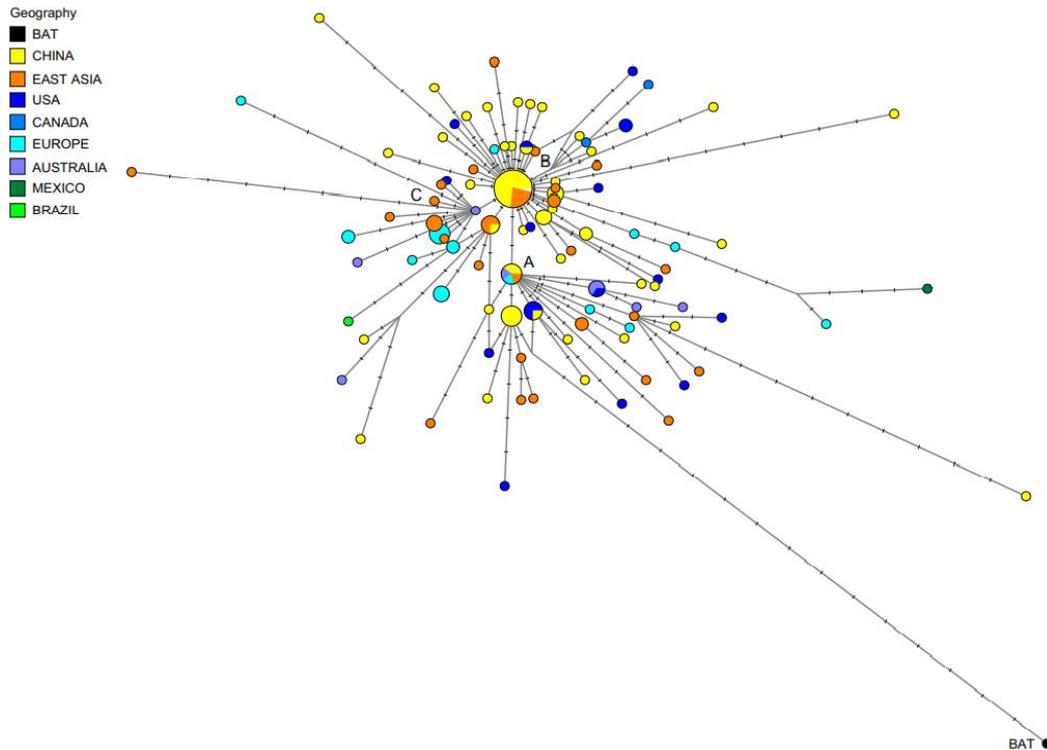


Figura 2: Rede Filogenética de Distribuição da COVID-19 Pelos Países em 2020. FOSTER, *et al*, 2020 examinaram o genoma de 160 indivíduos infectados pelo mundo e o genoma viral de uma espécie de morcego (*Rhinolophus affinis*) também infectado. O tamanho dos círculos de área são proporcionais ao número de infectados e cada entalhe representa a mutação de posição de nucleotídeos (FOSTER, *et al*, 2020).

1.3 A Origem e Início da Transmissão Horizontal do SARS-CoV-2

O início de novos casos da COVID-19 em outras províncias chinesas próximas a cidade de Wuhan gerou especulações sobre uma origem zoonótica da doença (LAM, *et al*, 2020). Sendo assim, logo suspeitou-se dos morcegos, que já possuíam um histórico de mutações que geraram novas cepas de *influenza* e coronavírus sugerindo que eles seriam os responsáveis também pelo SARS-CoV-2. Essa hipótese foi confirmada por um estudo publicado por ZHOU, *et al*, 2020, que mostrou uma semelhança do vírus SARS-CoV-2 com um vírus identificado em morcegos (*Rhinolophus affinis*), que haviam sido capturados em 2013, na cidade de Yunnan, na China. (ZHOU, *et al*, 2020). A forte relação filogenética do RaTG13 (uma linhagem de coronavírus capaz de infectar morcegos) com o SARS-CoV-2 indica que a doença teve origem nesses animais (ZHOU, *et al*, 2020). Os morcegos são hospedeiros naturais de vários coronavírus incluindo: HCoV-229E, SARS-CoV, HCoV-NL63 e

MERS-CoV (LIU e KUO, 2020). O contato direto do morcego com outros animais selvagens, tais como roedores, pangolins e camelos, sugere que esses animais podem ter sido hospedeiros intermediários do vírus.

O grande perigo com os animais reservatórios está relacionado, principalmente, ao fato desses animais terem mais contato com os seres humanos. Os pangolins, por exemplo, são animais silvestres que, culturalmente, são amplamente utilizados na culinária e medicina chinesa. Um estudo publicado por XIAO *et al*, 2020, mostrou o isolamento do SARS-CoV-2 em tecidos de pangolins, identificando que esses animais portavam uma linhagem (nomeada como Pangolin-CoV) capaz de infectá-los e transmitir para os humanos (XIAO *et al*, 2020). Outro estudo de LAM & SHUM *et al*, 2020 também relatou a presença do vírus em pangolins do sudeste da China, realizando não apenas a identificação como também a caracterização do vírus nesses animais. Esse vírus encontrado em pangolins seria *a posteriori* comparado com as linhagens virais que infectam morcegos (RaTG13) e humanos (SARS-CoV-2) mostrando que o vírus presente nos pangolins é altamente similar ao vírus que infecta humanos, tendo 91,02% de semelhança com o SARS-CoV-2 e 90,55% de semelhança com o RaTG13 (ZHOU *et al*, 2020; ZHANG *et al*, 2020; LAM & SHUM *et al*, 2020). Um estudo feito por LAM & SHUM *et al*, 2020 também utilizou tecidos diferentes de pangolins capturados no final de 2017 e início de 2018 para caracterizar o viroma desses animais. Após identificar o novo coronavírus, foi feita uma comparação com a linhagem encontrada em tecidos analisados com SARS-CoV-2 e a similaridade foi de 99,89% (LAM *et al*, 2020).

Assim, a origem mais provável do vírus é o morcego sendo que estes teriam transmitido e infectado outros animais silvestres, como os pangolins, por exemplo, tornando-os hospedeiros intermediários do novo coronavírus e aumentando a amplitude de disseminação viral. Esses animais infectados, agora hospedeiros intermediários, têm maior contato com os humanos, o que facilita a transmissão do vírus que rapidamente se espalhou por todo o mundo (Figura 3).

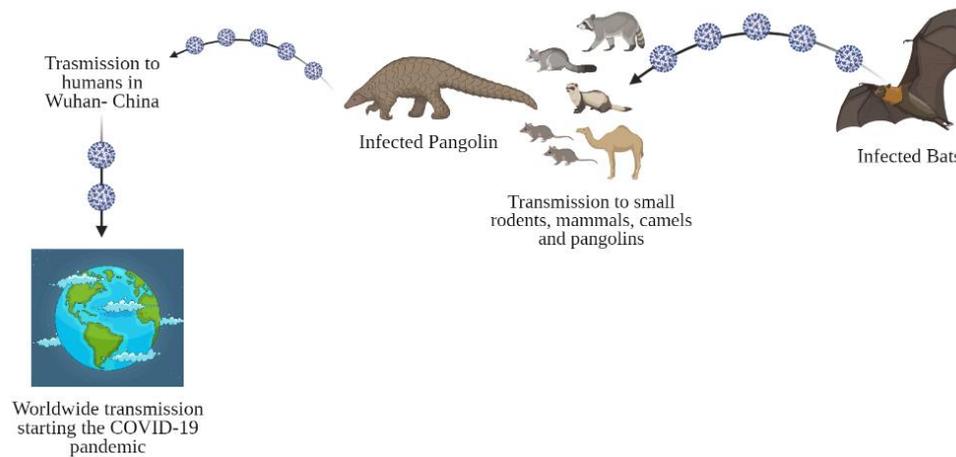


Figura 3: Origem do Vírus SARS-CoV-2 e Sua Transmissão Para Humanos. Morcegos infectados com o SARS-CoV-2 transmitiram o vírus para outros animais, que aumentaram o raio de disseminação viral para os humanos, que posteriormente, espalharam o vírus por todo o mundo dando início a pandemia da COVID-19.

1.4 O Processo de Envelhecimento Fisiológico e a COVID-19

Desde o início dos casos da COVID-19, já era observado na China, uma maior susceptibilidade dos idosos às formas clínicas mais graves da doença. Um estudo realizado com indivíduos infectados na China mostrou uma maior fatalidade da doença conforme a idade aumentava, sendo este percentual de 0,4% em indivíduos com 40 a 49 anos de idade, 1,3% em 50 a 59, 3,6% em 60 a 69, 8,0% em 70 a 79 e alcançando 14,8% em idosos com mais 80 anos (WU *et al*, 2020). O mesmo dado foi confirmado de maneira expressiva na Itália, sendo o percentual da letalidade da doença de 12% entre os indivíduos de 70 a 79 anos e 20% em idosos com mais de 80 anos (GRASSELLI *et al*, 2020).

A senescência celular passou a ser mais estudada com uma descoberta feita por Elizabeth Blackburn e seu grupo de pesquisa, que observaram um encurtamento dos telômeros à medida que as células se replicavam. No ano de 1961, Hayflick e Moorhead observaram, em células de cultura, que a partir da quinquagésima replicação as células exibiam sinais de desgaste e sofriram morte celular por apoptose. Eles mostraram que cada célula tem um limite depois do qual a célula entra em senescência replicativa, ou seja, não prolifera mais (HAYFLICK, 1965). Este fenômeno, foi chamado de limite de Hayflick e, é o resultado do encurtamento dos telômeros que desempenham papel importante na replicação celular (RAO *et al*, 2010). Os telômeros encurtados não são

somente um marcador da senescência replicativa, mas eles podem ser reconhecidos como dano ao DNA e ativar vias de sinalização que regulam negativamente o ciclo celular (como p53 e gene do retinoblastoma). A senescência é caracterizada como um processo natural de alterações fisiológicas, acompanhada de diversos outros fatores resultantes das exposições a estressores e dos cuidados com organismo durante a vida. O envelhecimento possui uma ação sistêmica e crônica, e com o sistema imune não é diferente. Em 1969, Walford descreveu a imunossenescência caracterizando-a como as perdas exponenciais de função das células imunes relacionadas à idade e que resultam em desregulação e aumento na susceptibilidade para determinadas doenças, tais como neoplasias (MANTOVANI *et al*, 2008; CROCE *et al*, 2020), doenças autoimunes (PONS-ESTEL *et al*, 2010; HUNTER *et al* 2017; MADARIAGA *et al*, 2014), alergias (MILGROM & HUANG, 2014; DE MARTINS *et al*, 2016; DE MARTINS *et al*, 2019), dentre outras. Este aumento na susceptibilidade para tais doenças sempre está associado também a um processo inflamatório crônico de baixo grau, sistêmico e subclínico, nomeado por Cláudio Franceschi de *inflammaging* (FRANCESCHI *et al*, 2000). O processo de envelhecimento em conjunto com as alterações que o caracterizam pode ser mais controlado se alguns destes fatores, sobretudo o *inflammaging*, forem bem regulados, o que leva a uma condição mais estável do organismo (Santoro *et al*, 2020).

Na década de 70, alguns trabalhos começaram a surgir conectando aspectos evolutivos com o envelhecimento e a longevidade. Vários fatores endógenos e exógenos contribuem para a senescência celular e o envelhecimento: danos ao DNA que levam à instabilidade genômica, acúmulo de agentes oxidantes oriundos da respiração celular e de estressores, danos resultantes da exposição a agentes físicos como a radiação UV, agentes químicos, produtos químicos e gases nocivos e a agentes biológicos como as infecções virais e, sobretudo, a diminuição da eficácia do sistema imune. Todos estes fatores já foram descritos como responsáveis por induzir a senescência celular e conduzir o organismo a um desequilíbrio fisiológico sistêmico que coopera para a aceleração do processo de senescência. (KIRKWOOD, 1977; KIRKWOOD & HOLLIDAY, 1979; KIRKWOOD & FRANCESCHI, 1992; FRANCESCHI, 1989; FRANCESCHI *et al*, 2000^a).

Em 1989, Cláudio Franceschi propôs a teoria da “rede do envelhecimento” que constitui uma série de modificações em funções fisiológicas capazes de controlar a expressão gênica. Desta forma, a proliferação e a morte celular são dois fenômenos fisiologicamente ativos que estão conectados e são bem regulados e que, com o passar

dos anos, apresentam-se desequilibrados tendo, como resultado, o aumento do processo de senescência (FRANCESCHI, 1989). Este estudo foi muito importante para a compreensão do envelhecimento como um fenômeno sistêmico.

Em 1995, Cláudio Franceschi e colaboradores propuseram o conceito do “remodelamento” do envelhecimento. O estudo que fundamentou esse conceito consistia em avaliar a interferência dos fenômenos patológicos na imunossenescência, sendo necessário, o estudo de uma população mais adequada. Desta forma, foram escolhidos indivíduos com idade acima de 95 anos (centenários) com perfil saudável e com perfil imunossenesciente, seguindo o protocolo de Ligthart *et al* 1984, que examina parâmetros clínicos e laboratoriais para avaliação da condição de saúde. A conclusão foi que a imunossenescência é um processo delicado de perdas e ganhos, em que o organismo precisa estar em constante adaptação às mudanças e deteriorações que acontecem no seu ambiente interno ao longo do tempo. Os centenários saudáveis, por sua vez, possuem uma maior capacidade de se adaptar a todos estes agentes nocivos e estressores imunológicos, permitindo um melhor equilíbrio do processo de envelhecimento. Este remodelamento se expressa pela presença de mecanismos compensatórios resilientes que mantêm a homeostase do corpo na presença das modificações deletérias que acompanham o envelhecimento. Alguns exemplos de remodelamento imunológico são a manutenção da frequência de células T CD4⁺Foxp3⁺ naturais em paralelo ao declínio das células T CD4⁺Foxp3⁺ induzidas, as frequências também preservadas de células NK CD57^{low} com capacidade citotóxica que podem exercer funções semelhantes àquelas exercidas pelos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos que sofrem um declínio em número e função com o envelhecimento (FRANCESCHI *et al*, 1995^a; FRANCESCHI *et al*, 1995^b; FRANCESCHI & COSSARIZZA, 1995; FRANCESCHI, 2000^a; LIGTHART *et al*, 1984).

Sendo assim, são vários os fatores que colaboram para potencializar o processo de envelhecimento. No Brasil, existem ainda muitas áreas endêmicas para diferentes doenças. Desta forma, é importante destacar dois fatores importantes e interligados na imunossenescência: a imunobiografia e a senilidade. A imunobiografia é caracterizada como a identidade imunológica produzida a partir de contatos com antígenos de uma determinada região geográfica (BATISTA *et al*, 2020; FÜLÖP *et al*, 2018; FRANCESCHI *et al*, 2017). A senilidade, por sua vez, se refere ao acúmulo de danos em detrimento de modificações nas células, tecidos e órgão do corpo e que crescem

exponencialmente com a idade e tendem a ser maiores em regiões mais endêmicas (FÜLÖP *et al*, 2018; AIELLO *et al*, 2019; LENG & MARGOLICK, 2020; BELKINA *et al*, 2018; WERTHEIMER *et al*, 2015), sendo possível afirmar que quanto maior o número de infecções que os indivíduos tiveram ao longo da vida, maior será o acúmulo de danos e, conseqüentemente, mais acentuado será o *inflammaging* e a senescência.

1.5 Epidemiologia do COVID-19 no Brasil e no Mundo

Até o presente momento, foram registrados um total de cerca de 672 milhões de casos de COVID-19 em todo o mundo, com um total de 6,85 milhões de mortes.

Segundo dados do Ministério da Saúde, o Brasil registrou cerca de 36,8 milhões de casos confirmados de COVID-19 até dia 31/01/2023, sendo que cerca de 697 mil indivíduos evoluíram para óbito. O estado de São Paulo (SP), lidera os estados brasileiros nas estatísticas de COVID-19, sendo cerca de 6,43 milhões de casos confirmados e 179 mil mortes, Minas Gerais (MG), por sua vez, vem logo em seguida com 4,16 milhões de casos confirmados e 65.005 mortes. O Brasil representa cerca de 5,47% do número global de casos confirmados de COVID-19 e, impressionantes, 10,17% do número de mortes por COVID-19 em todo o mundo (BRASIL, 2023).

A prefeitura de Belo Horizonte/MG, registrou 2.314.619 casos confirmados e notificados de COVID-19, com 8.406 mortes, até dia 08/02/2023. Em Governador Valadares/MG, há 320 km da capital Belo Horizonte/MG, registrou-se 52.546 casos confirmados e notificados, sendo 1.508 óbitos, até dia 24/11/2022. Em São Paulo/SP, a prefeitura registrou 2.439.798 casos confirmados e notificados da doença, sendo 44.614 óbitos, até dia 07/02/2023 (BRASIL, 2022; BRASIL, 2023).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiopatologia e Infecção do SARS-CoV-2

O surgimento do SARS-CoV-2 trouxe muitos questionamentos sobre a sua infecção e replicação. Em geral, o vírus permanece incubado, entre 3 e 5 dias, em média, apresentando uma forma sintomática da doença na maioria dos casos, entretanto alguns indivíduos apresentam uma forma assintomática do vírus, o que contribui para a sua disseminação, tendo em vista que estes indivíduos não sabem que estão infectados

(GUAN *et al*, 2020; PUNG *et al*, 2020; LAUER *et al* 2020). Alguns estudos demonstram um pico da doença cerca de 10 dias após o início dos sintomas, sendo este fenômeno observado também em indivíduos que são hospitalizados e apresentam um quadro mais grave da doença (PAN *et al*, 2020; KIM *et al*, 2020).

Uma grande diversidade de estudos foi publicada para estabelecer a classificação das formas da doença em leve, moderada, grave ou crítica. Os pacientes com as formas leves são aqueles que se recuperam sem suporte hospitalar, moderados e graves são aqueles que se recuperam com suporte hospitalar, sendo que, a submissão a tratamentos invasivos e o volume da suplementação de oxigênio são fatores que diferem os pacientes entre moderados e graves e, por fim, os críticos, que são os pacientes que evoluem para outras disfunções sistêmicas e ao óbito como desfecho (WHO, 2020; YUKE *et al*, 2020). A tabela 1, presente na parte de metodologia, retrata a classificação realizada pela WHO.

O receptor usado pelo SARS-CoV-2 para interagir com a célula do seu hospedeiro é o *angiotensin-converting enzyme-2 receptor* (ACE2r) (ZHOU, *et al*, 2020). A *angiotensin-converting enzyme-2* (ACE2) participa do *renin-angiotensin system* (RAS), que tem como principal função atuar na manutenção da homeostase celular, sendo que a ACE2, é induzida por muitas células em todo o organismo, assim como seu receptor (XU *et al*, 2020; JIA *et al*, 2005). No trato respiratório (TR), por sua vez, o ACE2r é muito expresso pelas células epiteliais das vias aéreas e alveolares, mas também está presente nas células cardíacas, renais, intestinais e nervosas (XU *et al*, 2020; JIA *et al*, 2005).

A proteína Spike (S), é uma proteína presente na cápsula do SARS-CoV-2 e que possui dois domínios: S1 e S2. O domínio S1, é responsável por estabilizar a ligação vírus-hospedeiro, se ligando a ACE2r nas células epiteliais do TR, além disso, a S1 participará da indução da protease TMPRSS2 na membrana do hospedeiro, que fará a clivagem do domínio S1, permitindo então o contato direto do domínio S2 com a membrana do hospedeiro. Desta forma, S2 será ativado e atuará facilitando a fusão da cápsula viral com a membrana do hospedeiro, fazendo com que os componentes presentes no citoplasma viral sejam lançados para dentro da célula do hospedeiro (WANG *et al*, 2020; LIU *et al*, 2020).

No domínio S1 da proteína S está presente o *receptor-binding domain* (RBD) que, no SARS-CoV-2, é composto por um conjunto de 510 resíduos de aminoácidos (ZHOU *et al*, 2020; LIU *et al*, 2020; BADCOCK *et al*, 2004). O RBD é, especificamente, quem se liga ao ACE2r e expõe a TMPRSS2 que vai clivar a S1 na membrana do hospedeiro

(SIMMONS *et al*, 2005; HOFFMANN *et al*, 2020). Vários estudos vêm destacando mutações no RBD que aumentam sua afinidade pelo ACE2r, levando à origem de novas cepas virais em várias localidades do mundo, a exemplo da cepa P1 no Brasil e a Ômicron na África do Sul (CHOI *et al*, 2021; COSAR *et al*, 2021). A figura 4, a seguir, ilustra a estrutura da proteína S e a ligação do RBD ao ACE2r.

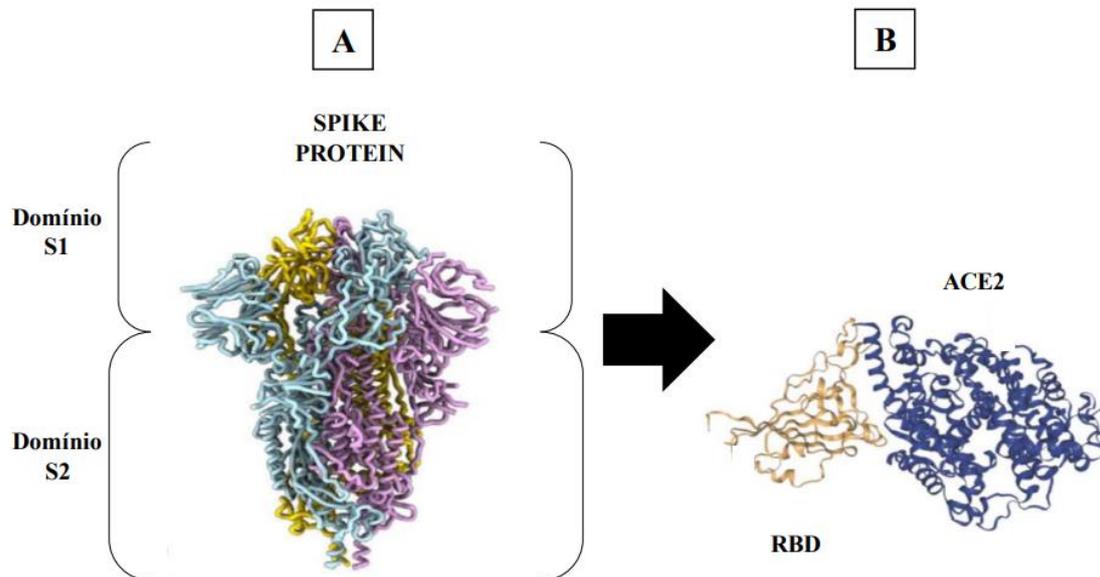


Figura 4: Estrutura da Spike, RBD e ACE2. (A): Estrutura tridimensional da proteína Spike(S) do SARS-CoV-2. A proteína Spike (S) conta com seus domínios S1 e S2. (B): o domínio de ligação (*receptor binding domain* - RBD - em amarelo) da proteína Spike liga-se ao receptor ACE2r (em azul). TAY *et al*, 2020 e STERNBERG & NAUJOKET, 2020.

Uma vez que o vírus já infectou a célula com o seu material genético, os ribossomos farão a síntese das proteínas, que serão reconhecidas por polimerases virais, e, após a replicação do RNA, as proteínas do SARS-CoV-2 (membrana, S, envelope e nucleocapsídeo) serão traduzidas e combinadas, formando novas cepas. As novas cepas virais serão exocitadas pelo complexo de golgi e já estarão aptas para infectar novas células (ALTUKURKI *et al*, 2020). A infecção do SARS-CoV-2 está descrita na figura 5, a seguir.

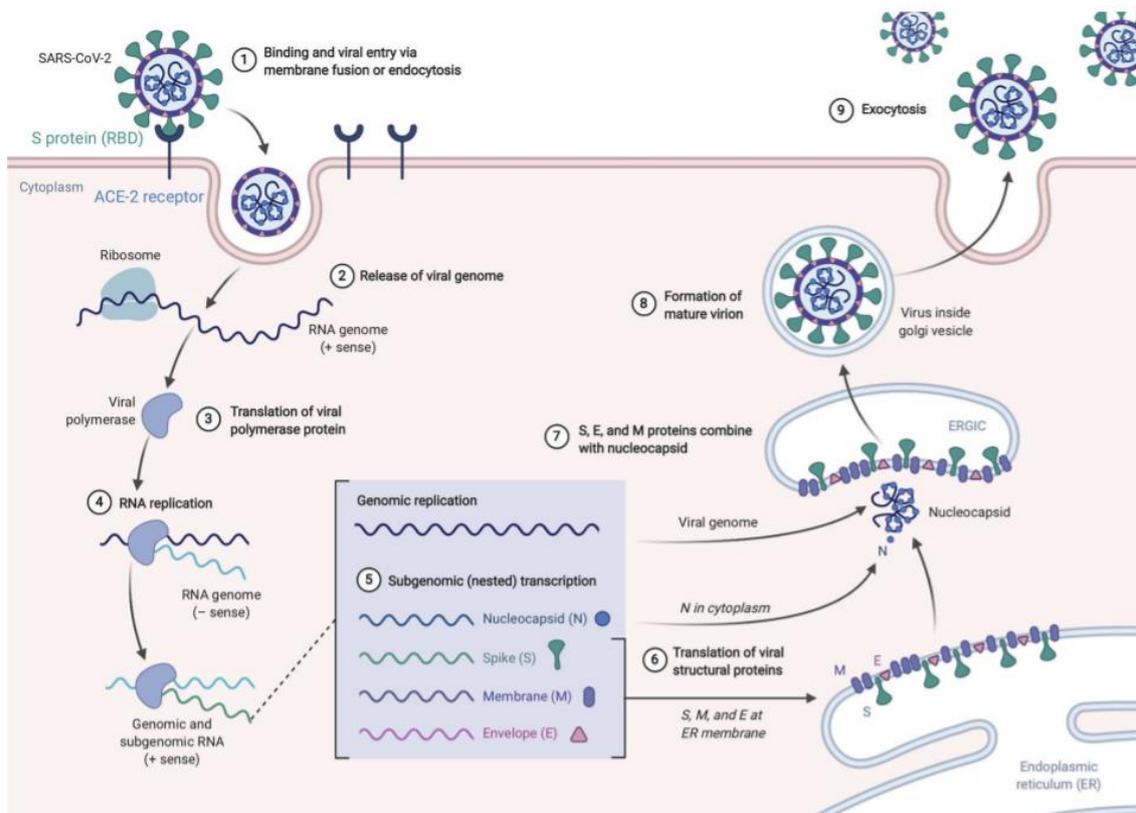


Figura 5: Replicação do SARS-CoV-2 na Célula do Hospedeiro. O processo de infecção pelo SARS-CoV-2 inicia-se pelo contato entre a proteína Spike e o receptor ACE2. Logo após a invasão à célula, as proteínas serão digeridas pelos lisossomos e os ribossomos vão auxiliar na síntese e liberação do RNA viral. Em seguida, a proteína polimerase do SARS-CoV-2 iniciará a replicação que vai gerar as proteínas virais e passará pelo processo de síntese proteica até que um novo vírus seja liberado pelo complexo de golgi. ALTURKI *et al*, 2020

O início da resposta inflamatória na COVID-19 se inicia pela ação das células imunes inatas, com destaque para os neutrófilos e monócitos. Estes serão importantes na secreção de mediadores e proteínas que acentuam o processo inflamatório, como as citocinas e quimiocinas, por exemplo, sendo as principais responsáveis pelo processo inflamatório nos primeiros dias da infecção (PUNG *et al*, 2020; MEDZHITOV & JANEWAY, 2000; MUZIO *et al*, 1998). É sabido que existem diferentes tipos de inflamação, cada uma com características de resposta celulares e mediadores inflamatórios específicos de acordo com o antígeno, sendo possível estabelecer diferenças na intensidade da inflamação pela predominância das células imunes e das citocinas, quimiocinas e outros mediadores que estão presentes no ambiente inflamatório (LI CASTRO *et al*, 2005).

A infecção das células pelo SARS-CoV-2 induz uma forte resposta inflamatória que, para fins meramente didáticos, podemos classificar em dois estágios. O primeiro estágio,

se refere a uma inflamação aguda que ocorre entre 1 a 7 dias, a partir do dia de início dos sintomas (DIS) (GUAN *et al*, 2020; PUNG *et al*, 2020). Esta resposta inflamatória é caracterizada por uma forte secreção de mediadores pró-inflamatórios, como proteína C-reativa (PCR), interferon- γ (IFN- γ), quimiotáticos para células inatas, além de outras moléculas, que recrutarão neutrófilos e monócitos para o sítio da inflamação. Os monócitos serão grandes protagonistas, se diferenciando em macrófagos nos tecidos, fazendo a fagocitose e a indução e produção de mais sinalizadores e mediadores pró-inflamatórios. O segundo estágio da inflamação se refere a uma resposta imune mais específica aos antígenos da COVID-19, e ocorre a partir do sétimo dia de sintomas (MURPHY, 2014). Nesta fase, há o aparecimento de linfócitos que, por isso, são responsáveis por direcionar uma resposta imune específica e diferenciada com a participação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ efetores. Os linfócitos T CD8⁺ começam a secretar mediadores citotóxicos como granzimas e perforinas, que induzirão apoptose de células infectadas, enquanto, os linfócitos T CD4⁺ efetores orquestrarão a inflamação, secretando mediadores favoráveis ao estado inflamatório intensificando a resposta inflamatória local (HU *et al*, 2020; PENG *et al*, 2020). Nesse segundo estágio, outras células também migram para o sítio da inflamação: as células *natural killer* (NK) que induzem a morte de células infectadas, os linfócitos B que secretam anticorpos e mediadores inflamatórios (MATYUSHENKO *et al*, 2020) e os linfócitos T reguladores (TREG) que secretam mediadores anti-inflamatórios como IL-10, TGF- β e IL-25 capazes de controlar a resposta inflamatória, estimulando o reparo tecidual e a manutenção da homeostase. Entretanto, esta é uma realidade ideal para a resposta inflamatória à COVID-19, onde o indivíduo infectado atravessa uma fase aguda da inflamação, há resolução do processo e os danos teciduais são reparados com a eliminação total do vírus infectante. Contudo, o que é observado em indivíduos que evoluem clinicamente para estágios mais graves da doença é a presença de uma inflamação descontrolada, com um desequilíbrio tanto nos mediadores responsáveis pela inflamação, quanto nos responsáveis pela regulação de todo o processo inflamatório (TAY *et al*, 2020; MEDZHITOV, 2008). A figura 6 demonstra detalhadamente a infecção (figura 6A) e o desfecho da resposta inflamatória (figura 6B), incluindo a participação das proteínas do SARS-CoV-2 discutidas anteriormente.

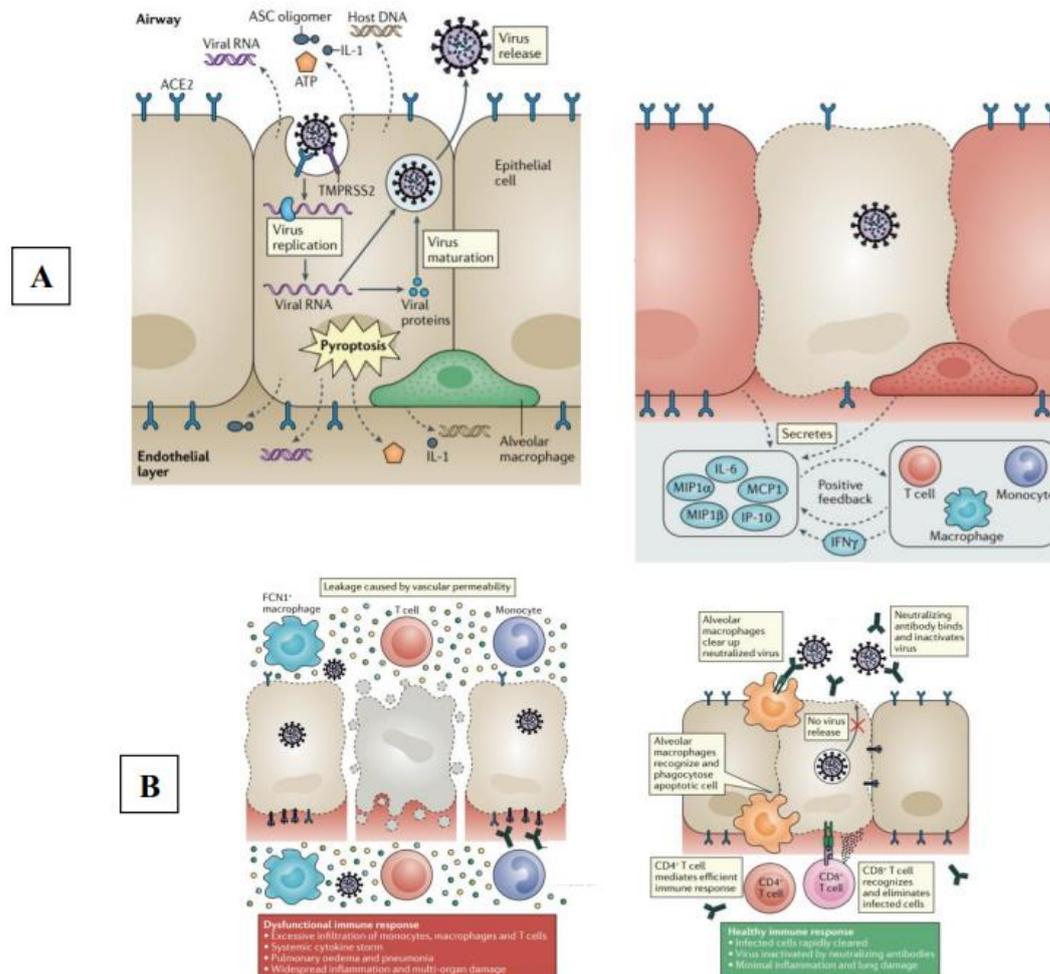


Figure 6: Infecção Viral e Resposta Imune Durante a COVID-19. (A): A infecção viral pelo SARS-CoV-2 inicialmente induz a secreção de IFN do tipo 1 (a e b) pelas células epiteliais do pulmão que estimulam a migração de células imunes inatas como neutrófilos e ativam macrófagos residentes desencadeando um processo inflamatório com a secreção de moléculas como IFN- γ , CCL2 (MCP1), CCL3 (MIP1 α), CCL4 (MIP1 β), IL-6 e CXCL-10 por essas células. **(B):** A COVID-19 pode evoluir para diferentes tipos de desfecho: à esquerda, a doença induz uma inflamação exacerbada e descontrolada e, à direita, uma inflamação equilibrada que é conduzida a uma resolução com eliminação viral, reparo tecidual e manutenção da homeostase. TAY *et al*, 2020.

Um fenômeno que voltou a ser muito discutido durante a pandemia do SARS-CoV-2, foi a *Cytokine Storm* (CS) (Tempestade de Citocinas), descrito por muitos autores como uma grande quantidade de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios secretados pelos indivíduos infectados com o SARS-CoV-2 (LUCAS *et al*, 2020). No estágio inicial da doença, sintomas comuns da inflamação aguda, como a febre e a cefaleia, surgem em função da secreção exagerada de IL-1 β , TNF- α e IL-6. Além destes, vários outros mediadores vêm sendo descritos na resposta inflamatória da COVID-19, tais como IFN-

γ , IL-10, IL-15, IL-2, IL-5, CCL2, CCL3, CCL4 e CXCL10 (TAY *et al*, 2020; LUCAS *et al*, 2020). Apesar do CS não ser um fenômeno exclusivo da COVID-19, este se apresenta de maneira muito acentuada na doença sendo muito relevante saber quais destes marcadores se destacam nesta doença em relação a outras infecções virais, como *influenza*, por exemplo.

Durante a pandemia da COVID-19, muitos estudos clínicos demonstraram indivíduos infectados que evoluíram para um quadro mais grave da doença, sendo que certos grupos estavam mais vulneráveis, a exemplo de indivíduos que apresentavam alguma comorbidade, como doenças respiratórias (SKEVAKI *et al*, 2020; HALPIN *et al*, 2020), cardíacas (LIM *et al*, 2020), renais e/ou autoimunes (SINGH *et al*, 2020). Entretanto, os idosos, como já mencionado, se destacaram dentre estes grupos de risco para COVID-19, tendo sua vulnerabilidade à doença descrita desde o início dos casos na China.

Uma limitação bastante observada em artigos publicados sobre COVID-19 é a ausência de um número amostral mais significativo. Ademais, são poucos os trabalhos confiáveis realizados com indivíduos infectados com a forma leve da COVID-19, o que dificulta o entendimento desta forma clínica da doença.

2.2 A Imunossenescência e o *Inflammaging*

A transição demográfica observada no último século foi marcada pelo crescimento significativo da população mundial – de 2,9 bilhões para 7,8 bilhões nos últimos 70 anos, e pelo aumento expressivo da expectativa de vida de homens e mulheres (GARMANI *et al*, 2021). Uma das consequências desse processo é o maior do número de pessoas idosas vivendo no mundo e a surpreendente projeção do aumento de mais de 1000% da população de centenários entre 2010 e 2050 (WHO, 2019). Embora essa transição represente uma conquista para a humanidade, o incremento no tempo de vida não tem sido acompanhado pela manutenção da saúde durante esse período. Estima-se que exista uma lacuna de nove anos entre a expectativa de vida e o tempo de saúde com boa qualidade de vida da população, o que significa que as pessoas estão vivendo mais, porém acompanhadas de doenças crônicas e/ou incapacitantes (OLSHANSKY, 2018; GARMANI *et al*, 2021).

O envelhecimento é um processo multifatorial e heterogêneo que afeta indivíduos e tecidos de forma diferenciada, não podendo ser visto como um fenômeno biológico único

(COHEN *et al*, 2020). No que tange à imunologia, o envelhecimento tem como pilar dois importantes fenômenos já mencionados anteriormente, a imunossenescência e o *inflammaging*.

O processo de senescência resulta em diversas alterações genéticas, epigenéticas, metabólicas, ambientais e estocásticas que conduzem a um remodelamento de todo o organismo, responsável pela redução gradual das atividades imunológicas efetoras e reguladoras (BATISTA *et al*, 2020; FRANCESCHI *et al*, 2014). O acúmulo de danos moleculares, celulares e teciduais decorrentes de um expressivo número de infecções, inflamações e outros processos que ocorrem ao longo dos anos colaboram para uma maior fragilidade e um mau funcionamento do organismo nos estágios mais longevos da vida (HEELMS, 2010; GRAYSON, 2012; PAWELEC, 2020). Esses fatores expõem o indivíduo idoso a uma maior vulnerabilidade em relação aos mais jovens, considerando infecções e doenças em geral, estando associado, principalmente, ao processo de imunossenescência e ao *inflammaging*, caracterizado pelo aumento na concentração sérica de determinados mediadores como: IL-6, IL-15, CCL5, TNF- α e IL-1 β , e redução de outros, como IL-10 e TGF- β , por exemplo (FRANCESCHI *et al*, 2000; BATISTA *et al*, 2020).

Ao nascimento, o sistema imune atua com características predominantemente inatas e, nos anos subsequentes da infância, ele continua sua maturação com a produção e maturação de células B e T *naive*, levando à uma resposta imune mais completa e balanceada que perdura até a vida adulta. Todavia, nos idosos, há uma alteração neste perfil imune, configurada pelo predomínio de células senescentes que expressam o *senescence-associated secretory phenotype* (SASP), células com perfil de exaustão e células T CD4⁺, T CD8⁺ e B de memória. A presença destas células, associadas às mudanças que estão acontecendo no organismo, caracterizam um perfil de resposta imune com baixa diversidade por parte das células T e B, o que direcionará o organismo nos estágios finais da vida para um perfil inflamatório limitado, oligoclonal, frágil e, predominantemente inato, como no início da vida.

Uma das principais alterações no sistema imune com a idade, é a atrofia tímica (AT). Este processo ocorre de maneira gradual e apresenta um papel importante na imunossenescência, estabelecendo um perfil de redução da produção de células T *naive* (ASPINALL *et al*, 2010; HAYNES *et al*, 2000; ISAACSON, *et al* 2006). A AT é um dos responsáveis por conduzir, sobretudo na população idosa, a um acúmulo de células T de

memória (algumas senescentes e exaustas) e um predomínio de células T oligoclonais com baixa diversidade o que, conseqüentemente, leva também a um aumento na susceptibilidade para algumas condições patológicas (ASPINALL *et al*, 2010; HAYNES *et al*, 2000; ISAACSON *et al*, 2006), como infecções, principalmente virais (YAGER *et al*, 2008), aumento na responsividade a vacinas (DUGAN *et al*, 2019), aumento da susceptibilidade ao aparecimento de neoplasias (MANTOVANI *et al*, 2008; CROCE *et al*, 2020) e aumento da susceptibilidade ao surgimento de doenças autoimunes (MÜLLER & PAWELEC, 2015; MUELLER, 2016), o que corrobora ainda mais para o aumento da vulnerabilidade e da fragilidade dos idosos.

O fenômeno da AT acontece de maneira natural com a idade, entretanto, existem diversos fatores diretamente ligados à rede do envelhecimento que induzem a aceleração da AT (FRANCESCHI, 1989). Alguns destes fatores são: o estresse (BENJAMIN *et al*, 2016), as infecções em geral (SAVINO, 2006; DEOBAGKAR-LELE *et al*, 2012; LIU *et al*, 2014), principalmente, infecções como o *human immunodeficiency virus* (HIV) que já possuem estudos demonstrando seu alto potencial senescente (DION *et al*, 2004), o uso contínuo ou abusivo de drogas imunossupressoras e corticosteroides (MARCHETTI *et al*, 2003), a má nutrição (RYTTER *et al*, 2014; HOSEA *et al*, 2004; LIU & LIU, 2012), a composição da microbiota (BIAGI *et al*, 2016), dentre outros fatores. O mesmo processo ocorre com as células B, pela existência de uma perda na função medular de maturação e liberação de células B efectoras, que conduz a um resultado semelhante à AT, levando a uma resposta com perfil mais oligoclonal e inespecífico nos indivíduos mais idosos (FRANCESCHI, 1995).

A redução de células B efectoras em indivíduos com idades mais avançadas não impede um fenômeno denominado como “paradoxo das imunoglobulinas”, caracterizado por um aumento das imunoglobulinas séricas, mesmo com a diminuição de células B. (FRANCESCHI *et al*, 1995^a). Este processo ocorre em função de dois eventos: 1) a redução da linfopoiese na medula óssea (em detrimento da mielopoiese) e do acúmulo de células B ativadas (e de memória) que se expandem oligoclonalmente nos órgãos linfoides periféricos; 2) da exposição do organismo ao longo da vida a diferentes antígenos virais, parasitários, microbianos, alimentares ou alergênicos. Essas alterações acentuam o *inflammaging* e aumentam a progressão da imunossenescência (FRANCESCHI, 2000^a; BAGGIO *et al*, 1998).

O ciclo celular é de grande importância nos eventos que acompanham o envelhecimento, como já mencionamos no caso da senescência replicativa (FRANCESCHI *et al*, 1989). A indução de determinadas moléculas durante o processo de redução dos telômeros leva à inibição da proliferação por meio das proteínas p53/vias supressoras de tumor p21CIP1 e p16INK4/RB; essas proteínas são inibidoras de CDKs (*cyclin-dependent kinases*), no caso CDK2, CDK4 e CDK6, que são necessárias para a progressão do ciclo celular. Assim, as células senescentes atingem o limite replicativo pela inibição do ciclo celular. No entanto, células senescentes são resistentes à apoptose e metabolicamente ativas. Essas células ativam as vias de inibição da apoptose (BIRCH & GIL, 2020; DEUTSCH *et al*, 2012) e também vias de produção de mediadores inflamatórios que compõem o SASP. Segundo BIRTH & GIL 2020, as células senescentes podem se comunicar de diferentes maneiras, podendo ser: célula-célula, fusão celular, vesículas extracelulares, formação de pontes citoplasmáticas e, principalmente, por meio da sinalização pelos mediadores que compõem o SASP (BIRTH & GIL, 2020).

Além disso, o SASP, pode contribuir para o aumento do *inflammaging*, sendo responsável por induzir lesões teciduais que conduzem a uma perda de função celular local, de forma que quanto mais células senescentes, maior será a exposição e o risco do organismo para estas lesões e, quanto mais lesões, mais intensificado será o *inflammaging* pelo aumento da circulação de mediadores inflamatórios (FRANCESCHI & CAMPISI, 2014; BIRTH & GIL, 2020; WILEY *et al*, 2019).

As modificações associadas ao envelhecimento ocorrem de maneira que todos os fenômenos influenciam uns aos outros (FRANCESCHI, 1989). O metabolismo é responsável por grande parte das mudanças, alterações hormonais induzidas pelo hormônio GH (BROWN *et al*, 1999) e os hormônios sexuais (MAJUNDAR *et al*, 2017; CHEN *et al*, 2010), por exemplo, são capazes de influenciar na aceleração da AT, anteriormente mencionada. Em concordância, as funções do timo têm fortes relações com o sistema endócrino, sobretudo no controle do sistema reprodutor (MONTECINO-RODRIGUEZ, 2005).

A rede do envelhecimento também conta com outros fatores que colaboram para o processo de senescência, um destes fatores é a imunobiografia. Como já mencionamos, a convivência diária e crônica com agentes infecciosos, como ocorre em áreas endêmicas para doenças infecciosas crônicas, pode levar ao aumento do *inflammaging* e à aceleração

da imunossenescência e da senescência biológica (DURSO *et al*, 2022; FRANCESCHI *et al*, 2017).

Assim, o processo de envelhecimento ou senescência, e os eventos que o acompanham, como o *inflammaging*, são fisiológicos e inevitáveis, envolvem células, tecidos e órgão de forma diferenciada, mas ele pode ser acelerado por fatores extrínsecos e intrínsecos (como mostrado na Figura 7) ou controlado e remodelado como no caso dos centenários que representam o melhor exemplo de envelhecimento saudável.

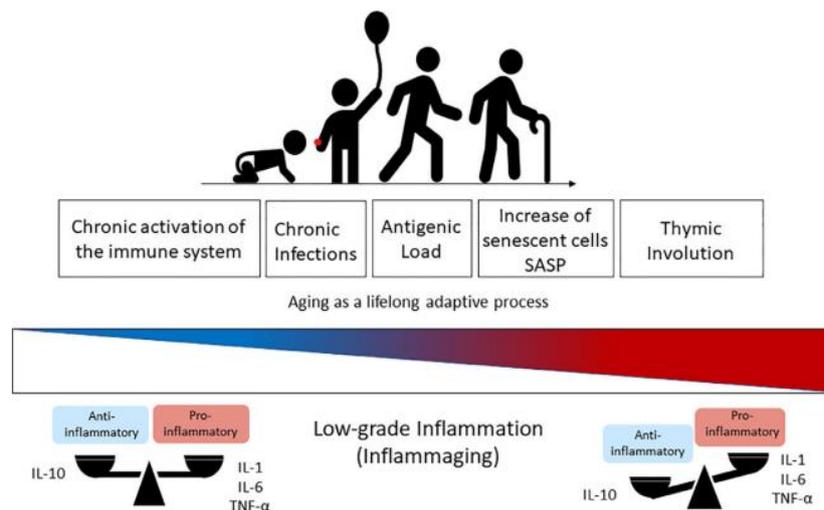


Figura 7: Visão Geral do Processo de Envelhecimento Fisiológico. Diferentes alterações que ocorrem ao longo da vida como a involução tímica, o aumento de células senescentes e infecções crônicas, por exemplo, podem intensificar o envelhecimento fisiológico, sobretudo através da associação com o *inflammaging*, causando um desbalanço de alguns mediadores inflamatórios como: IL-1, IL-6 e TNF- α . O envelhecimento saudável, por outro lado, se associa a processos compensatórios (por exemplo, citocinas anti-inflamatórias como a IL-10) que criariam um equilíbrio imunológico. BATISTA *et al*, 2020.

2.3 Mediadores sanguíneos associados ao *Inflammaging* e à COVID-19

Um fenômeno descrito pela primeira vez nos anos de 1980 em casos de malária e sepse, chamado naquela época de (*Endotoxin Shock*), está presente de maneira exagerada na COVID-19 e é denominado *Cytokine Storm* ou tempestade de citocinas (CLARCK *et al* 1981; CLARCK 1982; FARA *et al*, 2020). Este evento acontece em função de uma inflamação exacerbada, onde o organismo em resposta ao vírus SARS-CoV-2, induz uma grande concentração de mediadores pró-inflamatórios (FARA *et al*, 2020).

Por outro lado, o *inflammaging* é um processo predominantemente inato, caracterizado pelo aumento sistêmico nos níveis de determinados mediadores. O perfil clássico do *inflammaging* pode sofrer alterações de indivíduo para indivíduo sob determinadas circunstâncias.

Alguns trabalhos recém-publicados mostram uma grande semelhança no perfil inflamatório da COVID-19 e do *inflammaging* (LUCAS et al, 2020; SAYED et al, 2021). Esta semelhança é uma das bases da nossa hipótese acerca do papel da senescência no desfecho da COVID-19. A seguir, serão descritos alguns dos principais mediadores presentes em ambos os fenômenos.

A *interleukin-6* (IL-6) é um dos principais mediadores da inflamação aguda e começa a ser secretada logo no início da resposta imune, auxiliando posteriormente, na manutenção do estado inflamatório (TANAKA *et al*, 2014). Esta citocina desempenha importantes funções, sobretudo na fase aguda da inflamação com a rápida indução de proteína C-reativa (PCR) e soro amiloide A (SAA), importantes na ativação de uma das vias do sistema do complemento. Entretanto, a IL-6 também estimula a diminuição da produção de albumina, o aumento da produção de fibrinogênio pela indução do *fibroblast growth factor-basic* (FGF-*basic*) (importante na formação de coágulos e reparo tecidual) e o aumento da produção de anti-quimi tripsina- α , importante no transporte e proteólise de compostos enzimáticos circulantes (TANAKA *et al*, 2014; HEINRICH *et al*, 1990).

Além disso, a IL-6 possui outras funções no sistema imune atuando na diferenciação de células Th17, na diferenciação de células T CD8⁺ citotóxicas, na inibição de TGF- β e diferenciação de células TREG, na estimulação de produção de anticorpos pelas células B e na indução de vias que estimulam o aumento da permeabilidade vascular e angiogênese, induzindo, principalmente, *vascular endothelial growth factor* (VEGF). (HUNTER & JONES, 2015; KORN *et al*, 2009; OKADA *et al*, 1988; BETTELLI *et al*, 2006; MA *et al*, 2012; NAKAHARA *et al*, 2003). Ademais, é importante ressaltar que a IL-6 é uma citocina que se destaca na inflamação crônica do *inflammaging*, estando muito aumentada nos indivíduos mais idosos e com o perfil mais senescente (FRANCESCHI & BONAFÈ, 2003; TORRES *et al*, 2018).

A *interleukin-1 β* (IL-1 β) é uma das principais citocinas de manutenção do estado pró-inflamatório. A IL-1 β é um mediador de fase aguda já descrito em diferentes estados inflamatórios, como doenças pulmonares, câncer, doenças inflamatórias intestinais e doenças infecciosas que, inclusive, desempenha um importante papel de manutenção do

estado inflamatório frente a patógenos invasores, sobretudo, intracelulares (AREND, 2002). A IL-1 β é responsável pela ativação da via MyD88 que estimula IKK e MKK a iniciarem a cascata de ativação das vias do *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) e do HIF1 (*hipoxia-inducible factor 1*), respectivamente, onde ambas possuem uma importante função inflamatória, como ativação do inflamossoma e secreção de mediadores pró-inflamatórios (WALSH *et al*, 2008; BRINSON *et al*, 2016; BENT *et al*, 2018).

As principais fontes celulares responsáveis pela secreção das citocinas da família da IL-1 são os monócitos, macrófagos e neutrófilos, entretanto, outras populações celulares são responsáveis pela secreção de diferentes isoformas, incluindo antagonistas da IL-1 β . (AREND, 2002). O principal antagonista da IL-1 β , com a função de atuar na homeostase inflamatória, é o IL-1Ra.

O *tumoral necrosis factor- α* (TNF- α) é uma citocina com amplo potencial de sinalização imunológica, sendo capaz de se ligar a dois receptores, TNFRI (para ligantes solúveis) e TNFRII (para ligantes integrados a membrana), que são expressos em todas as células hematopoiéticas (BALKWILL, 2005). O TNF- α , em função da sua sinergia com vias promotoras da inflamação aguda, está presente em diferentes estados inflamatórios, como doenças autoimunes (MOELANTS *et al*, 2013; JANG *et al*, 2021), câncer (ZHOU *et al*, 2016), obesidade (TZANAVARI *et al*, 2010) e infecções bacterianas e virais, como a própria COVID-19 (LUCAS *et al*, 2020). Sua associação com IL-6 e IL-1 β , quando muito estimulada, é responsável pelo desenvolvimento de sintomas comumente observados em várias patologias, tendo cefaleia (dor de cabeça) e pirexia (febre) como os principais exemplos. Todavia, quando controlada a inflamação aguda, o TNF- α continua atuando na estimulação do recrutamento de células imunes, a partir da indução de vias de sinalização imune, tendo a via do NF- κ B como destaque e com importância na COVID-19 (BALKWILL, 2005; DAVIES *et al*, 2021; HARIHARAN *et al*, 2021).

O *interferon- γ* (IFN- γ) é uma das citocinas mais importantes em infecções virais, sendo capaz de interferir na replicação viral e ativar, sinergicamente, várias vias imunológicas via *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT), NF κ B e *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) (ANTONELLI *et al*, 2010). Embora sua ação dependa da sinergia e do ambiente proporcionado por outras citocinas, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, sua estimulação é facilmente induzida no início do processo inflamatório, além de ser responsável pelo aumento da expressão de várias outras moléculas

importantes no contexto inflamatório, como CXCL9, CXCL10, CXCL11, *platelet derived growth factor-BB* (PDGF-BB) *FGF-basic*, dentre outros (ANTONELLI *et al* 2010; DHILLON *et al*, 2007).

O IFN- γ é fundamental para a secreção do CXCL10, participando de vias de sinalização imunológica que estimulam o aumento da expressão do receptor CXCR3 na membrana celular, levando a uma maior indução da secreção de certas moléculas, incluindo a CXCL10. (LEI *et al*, 2018; WANG *et al*, 2017). A CXCR3 possui várias isoformas que estão descritas em diferentes tipos celulares, sendo mais encontradas em células de linhagem linfocítica, como linfócitos T efetores, células NKs e NKTs (LUNARDI *et al*, 2015; QIN *et al*, 1998; THOMAS *et al*, 2003). O CXCR3 está sempre associado a proteínas G de sete membranas e a três outros ligantes, sendo eles CXCL9, CXCL10 e CXCL11. A CXCL9, possui funções circulatórias importantes e foi descrita em trabalhos recentes como um provável biomarcador do envelhecimento (TORRES *et al* 2018; SAYED *et al*, 2021). A CXCL10, por sua vez, possui diversas células responsáveis pela sua secreção, sendo as principais células endoteliais, NKs, linfócitos T efetores e os monócitos que, são os responsáveis pela secreção da quimiocina em maiores concentrações, o que justificaria o seu crescimento exagerado neste contexto inflamatório viral (LEI *et al*, 2018; WU *et al*, 2017). Todavia, sua principal função é a ativação de linfócitos e a estimulação da sua migração para regiões inflamadas (LANDE *et al*, 2003). Dados previamente publicados demonstram que os altos níveis plasmáticos da CXCL10 estão fortemente associados à progressão da infecção pelo HIV e são capazes de suprimirem as funções das células T e células NK, além de promoverem a latência e a replicação viral (LEI *et al*, 2018; LEE *et al*, 2015; VALVERDE-VILLEGAS *et al*, 2018; MHANDIRE *et al*, 2017).

As quimiocinas são constituídas por duas grandes famílias, classificadas por seus primeiros resíduos de cisteína como CC (α -quimiocinas) e CXC (β -quimiocinas). Esses mediadores são formados e secretados a partir da ativação de fatores de transcrição e fatores de crescimento celular, estando fortemente envolvidos na migração de células recém-formadas na medula (PALOMINO & MARTI, 2015; MERCIER *et al*, 2014). Em geral, as α -quimiocinas têm a função de estimularem a migração de monócitos, basófilos, eosinófilos, células NK e linfócitos T, enquanto as β -quimiocinas estimulam principalmente neutrófilos, embora algumas recrutem células mais específicas, como linfócitos T *helper* (Th), TCD8⁺ e NK (CXCL9, CXCL10 e CXCL11), *intraepithelial*

lymphocytes (IEL) e NKT (CXCL16) e linfócitos B e células T foliculares (Tfh) (CXCL13) (MURPHY *et al*, 2000).

Em infecções virais, certas quimiocinas se destacam durante a resposta inflamatória, tais como a CCL2, CXCL8 e a CXCL10. A CCL-2 é responsável pela quimiotaxia e estimulação de produção/secreção de mediadores inflamatórios nos monócitos, precursores dos macrófagos e essenciais no combate do organismo contra patógenos microbianos (JIANG *et al*, 1990; MURPHY *et al*, 2000). Quando produzida em altas concentrações, a CCL2 é capaz de induzir uma “explosão” inflamatória, relacionada à hiperativação celular, muito observada em infecções respiratórias, como tuberculose e COVID-19 (ARAVINDAN, 2019; TAY *et al*, 2020). Além disso, a CCL2 pode induzir outras quimiocinas como CCL3, CCL4, CCL5 e CCL7, com o intuito de potencializar e completar a sua função original, além de auxiliar em outras vias inflamatórias, a exemplo da CCL5, que regula a migração e a ativação de células T, tendo uma participação importante no *inflammaging*, quando observados os seus efeitos nos indivíduos mais idosos (PALOMINO & MARTI, 2015; TORRES *et al*, 2018).

A CXCL8, por sua vez, representa a principal quimiocina recrutadora de neutrófilos, pelo fato de agirem diretamente no *neutrophil activating protein-1* (NAP-1) e/ou no *granulocyte colony-stimulation factor* (G-CSF), principal fator de proliferação celular dos neutrófilos, sendo que estes constituem cerca de 70% dos granulócitos circulantes no sangue (PALOMINO & MARTI, 2015). Além disso, o CXCL8 está presente em quase todos os processos inflamatórios do organismo, sendo estimulado, principalmente, durante a fase aguda do processo.

Contudo, a tempestade de citocinas da COVID-19, proporciona um grande aumento de mediadores pró-inflamatórios como as já citadas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ , por exemplo, todavia, todos precisam estar regulados porque a tendência é que um descontrole pode ser uma das causas da evolução para as formas mais graves da doença.

Assim como a IL-1Ra, a IL-10 possui uma importante função reguladora para o organismo, sendo secretada, principalmente, pelas células TREG, com o intuito de controlar o ambiente inflamatório agindo em leucócitos, linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ efetores, dentre outras células (YAO *et al*, 2013). No perfil do *inflammaging*, já foi descrito que os mais idosos apresentam menos mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10, TGF- β e IL-25, o que potencializa e desequilibra esta inflamação (FRANCESCHI &

BONAFÈ, 2003; BATISTA *et al*, 2020). Em infecções virais, como na COVID-19, é possível observar outras citocinas exercendo um papel regulador, como no caso da IL-4 e da IL-5, que apesar de atuarem com função reguladora neste contexto inflamatório, possuem características extremamente pró-inflamatórias em respostas do tipo Th2 (HUANG *et al*, 2020; LUCAS *et al*, 2020; YUAN *et al*, 2021).

Existem outros mediadores importantes e constantemente citados em diferentes processos inflamatórios ou homeostáticos, como a IL-12, que aumenta também no *inflammaging* (FRANCESCHI & BONAFÈ, 2003), IL-15 e IL-17A, que aumentam na COVID-19 (LUCAS *et al*, 2020; YUAN *et al*, 2021), IL-9, IL-2, TGF- β e IL-25, que também apresentam variações na COVID-19 e no *inflammaging* (FRANCESCHI & BONAFÈ, 2003). A tendência é que como existe a expressão em comum destes mediadores no *inflammaging* e na COVID-19, a tempestade de citocinas da COVID-19 pode potencializar a inflamação nos idosos, deixando-os ainda mais vulneráveis à doença e suas formas mais graves. A figura 9 resume parte das informações detalhadas anteriormente.

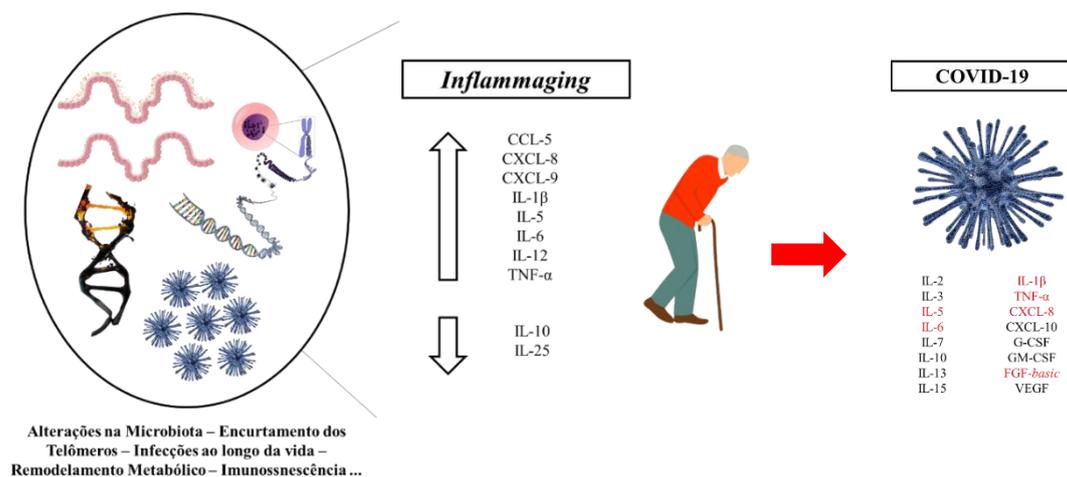


Figura 8: Sobreposição de Citocinas e Quimiocinas do Perfil *Inflammaging* e do Processo Inflamatório Desencadeado pela Infecção com SARS-CoV-2. Algumas alterações biológicas que acompanham a imunossenescência induzem um quadro sistêmico de inflamação crônica de baixa intensidade chamada *inflammaging*. Esse processo inflamatório apresenta mediadores em comum com aqueles induzidos durante a COVID-19 (destacados em vermelho) sugerindo que o *inflammaging* poderia intensificar a resposta inflamatória da doença.

Desde o início da pandemia outros marcadores bioquímicos por já serem amplamente padronizados e utilizados para diagnóstico em hospitais e nas clínicas médicas tiveram muitos relatos publicados que reforçam a associação de suas alterações com os casos mais graves da COVID-19. A ferritina é uma proteína produzida pelo fígado com a importante função de armazenar moléculas de ferro, sobretudo, auxiliando indiretamente na produção de glóbulos vermelhos e diretamente no funcionamento celular e fisiológico (KNOVICH *et al*, 2009). Quando alterada, pode ser associada a complicações como disfunção hepática, anemia, câncer, rejeição de determinados transplantes, distúrbios da coagulação e/ou cardíacos, este último podendo ter forte relação com as consequências da inflamação induzida durante a COVID-19. Níveis elevados de ferritina estão correlacionados com a gravidade da doença (KNOVICH *et al*, 2009; DECLERCQ *et al*, 2021; AL-SAMKARI *et al*, 2020). A proteína C-reativa (PCR) é uma proteína produzida pelo fígado, mas que além dos hepatócitos, também pode ser produzida por células endoteliais, musculares, adipócitos, macrófagos e linfócitos e que se eleva em situações de inflamação aguda (SPROSTON & ASHWORTH, 2018). O que tem sido relatado pelos trabalhos é um aumento ainda mais expressivo da PCR em pacientes com COVID-19 na forma mais grave, mais uma consequência deste processo inflamatório que é singularmente intenso (SPROSTON & ASHWORTH, 2018; AL-SAMKARI *et al*, 2020). Por fim, outro parâmetro que ganhou certa popularidade no início da pandemia é a vitamina D, este marcador atua em muitas áreas do organismo, sendo, em geral, a imunidade, o metabolismo e a homeostase algumas delas. No sistema imune, especificamente, já foi observado que em patologias como a tuberculose níveis adequados de vitamina D no organismo pode ser um importante potencializador do sistema imunológico que auxilia no combate à infecção (NNOAHAM & CLARKE, 2007; MARTINEAU *et al*, 2011). Entretanto, em outros casos, já foi observado que a suplementação da vitamina D não tem o mesmo efeito esperado e não apresenta uma melhora significativa, contudo, esta dualidade tem sido discutida também na COVID-19, apesar de estudos observacionais mostrarem que uma deficiência de vitamina D tem sido mais observada em pacientes com a forma clínica grave da doença. É importante salientar que são necessários mais estudos para confirmar esta informação e que uma suplementação intensa e desbalanceada dessa vitamina também pode ser prejudicial ao organismo como um todo (ANNWEILER *et al*, 2020; TAN *et al*, 2020; CHANG & LEE, 2019). Ademais, informações adquiridas na clínica médica para um tratamento “preventivo” da COVID-19 ainda não possuem uma comprovação científica.

Assim, a união de fatores como a senescência (com o *inflammaging* que a acompanha) e a imunobiografia (FRANCESCHI *et al*, 2017; FULOP *et al*, 2018; LENG & MARGOLICK, 2020; BELKINA *et al*, 2018; WERTHEIMER *et al*, 2015) podem ter cumprido um papel importante durante a pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2 na modulação do sistema imune de indivíduos idosos contribuindo para a sua suscetibilidade mais acentuada às formas mais graves da COVID-19. Portanto, nossa **hipótese de trabalho** é que o *inflammaging* que acompanha o envelhecimento pode ser um fator determinante no desfecho clínico da COVID-19 nos indivíduos idosos.

3 JUSTIFICATIVA

Apesar da grande quantidade de trabalhos que vem sendo publicados sobre a COVID-19, são poucos aqueles que fazem a relação entre os efeitos inflamatórios da doença e as modificações imunológicas associadas ao envelhecimento. O Brasil apresenta uma diversidade de aspectos culturais e regionais que configuram, de maneira singular, as características imunológicas de cada um dos indivíduos da sua população. Além disto, o país ainda conta com várias áreas endêmicas para diversas doenças infecciosas com as consequências sociais e imunológicas para os indivíduos que aí residem. Este trabalho teve como objetivo estudar o perfil inflamatório de indivíduos infectados e não infectados com SARS-CoV-2 de Governador Valadares-MG (área endêmica), Belo Horizonte-MG e São Paulo-SP, sendo 3 centros com características distintas para entender o impacto desse perfil no desfecho clínico da COVID-19. Também pretendemos estudar esse perfil inflamatório em diferentes faixas etárias (adultos e idosos) e raças/etnias, em indivíduos do sexo feminino e masculino procurando relacionar o impacto dessas variáveis no fenômeno inflamatório associado com a doença. O trabalho também procurou estudar: 1) as peculiaridades da COVID-19 quando comparada com outras síndromes infecciosas respiratórias utilizando um grupo controle chamado de “síndrome gripal” com sintomas gripais, mas negativo para SARS-CoV-2; 2) a evolução do perfil inflamatório em pacientes com COVID-19 moderada/grave ao longo de 7 dias de hospitalização; 3) o perfil laboratorial, clínico e inflamatório de coortes de indivíduos vacinados e reinfectados quando comparados a grupos infectados com SARS-CoV-2 não vacinados. Acreditamos que este estudo poderá contribuir para entender os fatores envolvidos no desfecho da COVID-19 em populações brasileiros distintas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a correlação entre o perfil clínico, laboratorial e de mediadores no plasma de indivíduos infectados com o SARS-CoV-2 em Belo Horizonte/MG, Governador Valadares/MG e São Paulo/SP com diferentes formas clínicas da COVID-19.

4.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o perfil clínico de indivíduos infectados e não infectados com o SARS-CoV-2 de Belo Horizonte/MG, Governador Valadares/MG e São Paulo/SP;
2. Avaliar o perfil de mediadores inflamatórios no plasma desses indivíduos;
3. Associar esses dados com diferentes faixas etárias nos diferentes locais de coleta.

5 MÉTODOLOGIA

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CEP-UFMG), pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emilio Ribas/SP (CEP-IIER), pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Risoleta Tolentino Neves e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (Anexo 2). A assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos pacientes ou responsáveis foi indispensável para que participassem do estudo.

5.1 Desenho do Estudo e Coleta dos Dados

Foi realizado um estudo transversal e clínico, com uma população total de 763 indivíduos coletados em 3 centros, Belo Horizonte/MG (445 indivíduos), Governador Valadares/MG (159 indivíduos) e São Paulo/SP (159 indivíduos). Os voluntários foram recrutados no período de dezembro de 2020 à outubro de 2021. As cepas que circulavam durante o período de coleta de pacientes eram a original e a P1. Desta forma, foram coletados indivíduos que apresentavam um quadro de síndrome gripal com etiologia a esclarecer e indivíduos saudáveis. O recrutamento dos voluntários em Belo Horizonte-MG ocorreu na Unidade de Pronto Atendimento da região Centro-Sul (UPA-CS), no

Hospital Risoleta Tolentino Neves, na Casa do Ancião da Cidade Ozanam e em domicílio. Em São Paulo-SP, as coletas ocorreram no Instituto de Infectologia do Hospital Emílio Ribas (IIER) e em Governador Valadares-MG, no Hospital da Unimed de Governador Valadares e a domicílio para alguns casos excepcionais. O delineamento do recrutamento e das coletas de amostras nos centros está mostrado na Figura 9. Todos os voluntários realizaram um exame de RT-PCR (*Real Time – Polymerase Chain Reaction*) para confirmação do diagnóstico da COVID-19, e este exame foi realizado em colaboração com o CT-Vacinas, seguindo o protocolo de coleta disponível no Anexo 3.

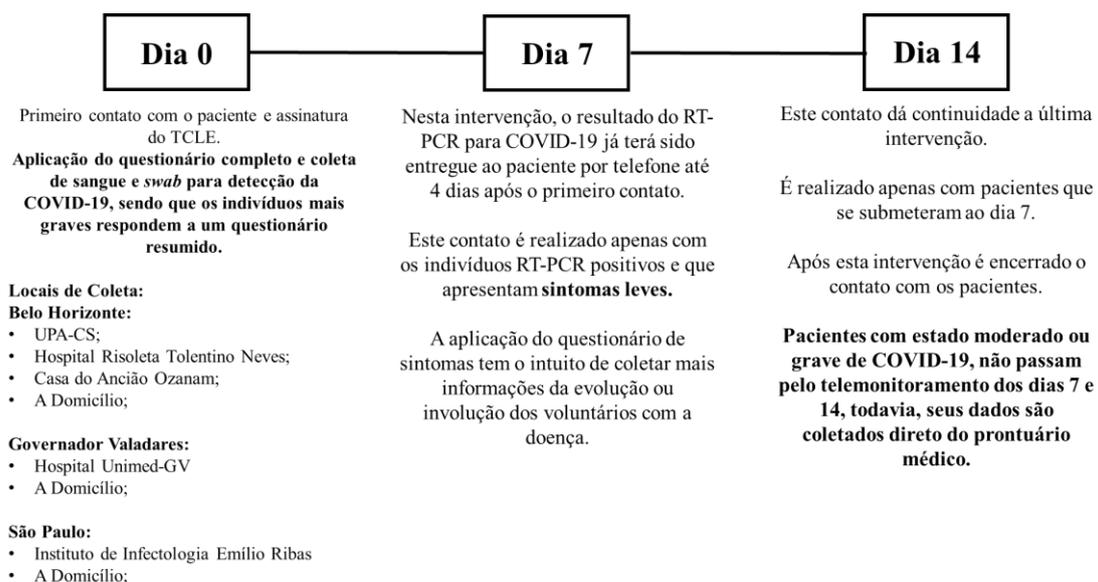


Figura 9: Desenho do estudo. Foram recrutados voluntários que apresentavam sintomas gripais leves, moderados ou graves nas unidades de atendimento. Os dados de desfecho clínico daqueles voluntários que apresentavam RT-PCR positivo para SARS-CoV-2 foram acompanhados por telemonitoramento nos dias 7 e 14 pós-atendimento e os voluntários graves que foram internados tiveram seus dados coletados diretamente do prontuário médico. Os voluntários que apresentaram o teste RT-PCR negativo para COVID-19, por sua vez, tinham sua participação encerrada no primeiro dia da intervenção.

Os critérios de inclusão do estudo foram: voluntários adultos ou idosos, com idade superior a 20 anos de idade, que apresentavam sintomas gripais ou não e que aceitaram assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Anexo 04). A população do estudo também foi selecionada a partir de critérios de exclusão (Tabela 1).

Posteriormente, os indivíduos que apresentaram dia de início dos sintomas (DIS) acima de 7 dias e os voluntários do grupo negativo que apresentaram sorologia positiva para COVID-19 foram excluídos do estudo com o intuito de obter uma amostra mais homogênea e adequada aos objetivos do estudo. Foram coletados indivíduos saudáveis e que não apresentavam sintomas gripais no ato da coleta para comporem um grupo controle de cada região, entretanto, durante a aplicação dos filtros de exclusão do estudo, estes grupos acabaram excluídos da população principal e não sendo utilizados nas análises. Desta forma, a população selecionada para as análises foi de 309 indivíduos. A Figura 10 mostra um fluxograma que ilustra como os pacientes foram filtrados e selecionados para análise.

Tabela 1 – Critérios de Exclusão do Estudo

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	• Convivendo com HIV.
	• Crianças e adolescentes (Idade abaixo de 18 anos).
	• Resultado Inconclusivo no RT-PCR para detecção da COVID-19.
	• Vacinados com qualquer dose de imunizante contra COVID-19.
	• Dia de início dos sintomas (DIS) acima de 14 dias.
	• Diagnóstico de forma clínica crítica para COVID-19.
	• Dados coletados incompletos.

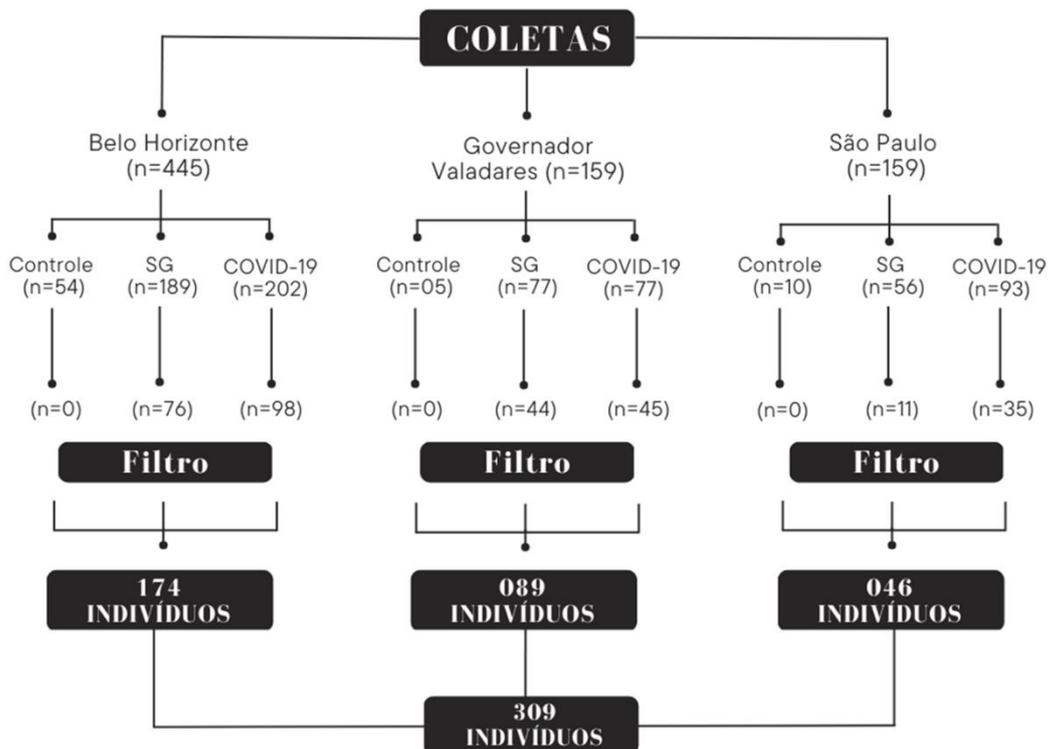


Figura 10: Fluxograma de Seleção dos Voluntários. De uma amostra inicial, foram selecionados aqueles voluntários que se enquadravam nos critérios do estudo nos 3 centros por grupo. Após a adição dos filtros com critérios de inclusão e exclusão do estudo, o número final de indivíduos por grupo em cada região e o total de indivíduos aparece nos quadros em negro.

A população foi segregada por idade, em adultos (18 a 59 anos) e idosos (a partir de 60 anos). Ademais, o índice de massa corporal (IMC) dos pacientes coletados, exibido na tabela 2, foi classificado como: inferior a 18,5: abaixo do peso ideal, entre 18,5 e 24,9: eutrófico, entre 25,0 e 29,9: sobrepeso, a partir de 30,0 acima: obesidade. O número de indivíduos e suas características estão mostrados na Tabela 2, a seguir.

Tabela 2 – Número e Características dos Participantes do Estudo.

	Governador Valadares (n = 89)		Belo Horizonte (n = 174)		São Paulo (n = 46)		Valor de P
	COVID-19 (n = 45)	SG (n = 44)	COVID-19 (n = 98)	SG (n = 76)	COVID-19 (n = 35)	SG (n = 11)	
Idade (anos) (n,%)	39,7 ± 15,8	38,0 (18 to 90)	42,9 (18 to 70)*	42,1 ± 14,6	46,0 ± 11,0*	39,0 (23 to 69)	0.0057* 0.0017*
Faixa etária (idoso) (n,%)	07 (15,55%)	05 (11,36%)	15 (15,30%)	11 (14,47%)	02 (5,71%)	01 (9,09%)	0.0895
Sexo (feminino) (n,%)	26 (57,77%)	21 (47,72%)	45 (45,91%)	41 (53,94%)	21 (60,00%)	05 (45,45%)	0.0674
IMC	26,7 ± 4,89	26,6 ± 4,22	26,8 ± 5,22	26,8 ± 4,48	-	-	0.0679
Escolaridade (n,%)							
Sem estudo	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1,02	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0.0769
Fundamental Completo	4,44	4,54	4,08	9,21	2,85	0 (0,0%)	0.0864
Ensino Médio Completo	28,88	25,0	40,81	30,26	31,42	36,36	0.0347
Superior Incompleto	22,22	40,90	8,16	10,52	17,14	18,18	0.0568
Graduação Completa	0 (0,0%)	0 (0,0%)	5,10	1,31	2,85	0 (0,0%)	0.0834
Renda (R\$) (n,%)							
Até R\$ 800,00	04 (8,88%)	02 (4,54%)	05 (5,10%)	06 (7,89%)	-	-	0.0794
Entre R\$ 801,00 até R\$ 2.000,00	20 (44,44%)	18 (40,90%)	53 (54,08%)	46 (60,52%)	-	-	0.0692
Entre R\$ 2.001,00 até R\$ 5.000,00	10 (22,22%)	17 (38,63%)	18 (18,36%)	10 (13,15%)	-	-	0.0827
Acima de R\$ 5.000,00	09 (20,00%)	05 (11,36%)	03 (3,06%)	07 (9,21%)	-	-	0.0582

Os voluntários foram abordados pela equipe do estudo em 3 momentos. No primeiro, os voluntários liam, esclareciam suas dúvidas e assinavam o TCLE (Anexo 04), em seguida eram submetidos à aplicação de um questionário clínico e sociodemográfico (Anexo 05) e, por fim, eram realizadas as coletas de sangue, para separação de soro e plasma, e de *swab* para detecção do SARS-CoV-2 por RT-PCR (Figura 9). Foi utilizado um questionário resumido para a coleta de dados dos voluntários que apresentavam sintomas moderados e/ou graves, visando uma otimização do tempo e redução da interação com o paciente durante seu tratamento (Anexo 06) (Figura 9). Nos segundo e terceiro momentos, após a confirmação e entrega do resultado do exame de RT-PCR, era realizado um telemonitoramento, por meio de duas ligações, no período de 7 e 14 dias, respectivamente, com os indivíduos positivos para COVID-19, sendo aplicado um questionário que permite acompanhar a evolução clínica dos voluntários (Anexo 07) (Figura 9). Os pacientes com sintomas moderados e/ou graves, não participavam do telemonitoramento em função das suas condições clínicas. Nesses casos, seus dados de evolução da doença foram coletados do prontuário nos hospitais onde estavam internados, havendo a autorização prévia durante a assinatura do TCLE (Figura 9).

Com o intuito de otimizar e padronizar a coleta de dados nos 3 centros, foi criado um protocolo de coleta dos pacientes hospitalizados. Desta forma, todos os dados de prontuário necessários para classificação clínica desses indivíduos puderam ser coletados de maneira padronizada.

5.2 Critérios Clínicos para Classificação dos Pacientes com COVID-19

Todos os indivíduos que fizeram o exame de RT-PCR para diagnóstico de COVID-19 e cujo resultado foi positivo para SARS-CoV-2 foram segregados de acordo com a classificação clínica recomendada pela WHO (WHO, 2020) (Tabela 3).

A partir desta classificação, é possível compreender e distinguir melhor o quadro clínico dos indivíduos infectados. A WHO gerou um escore clínico (*score*) para classificação dos pacientes com COVID-19 a partir de estudo detalhado das condições clínicas desses indivíduos em vários países do mundo. Este escore se tornou padrão e foi adotado por protocolos governamentais em todos os países. Esse escore foi também utilizado em muitos trabalhos clínicos, como em estudos de drogas terapêuticas e vacinas, com o objetivo de classificar o quadro dos pacientes que apresentavam diagnóstico de

COVID-19, mostrando-se bastante útil para acompanhamento dos efeitos terapêuticos de medicamentos (MBBS *et al*, 2022; NICKEL *et al*, 2022; WHO, 2020). A tabela 3, a seguir, foi retirado da publicação feita pela WHO mostrando a classificação recomendada e o escore (*Score*) de cada forma clínica (WHO, 2020).

Tabela 3: Classificação dos Pacientes com as diferentes formas clínicas da COVID-19

Patient State	Descriptor	Score
Uninfected	Uninfected; no viral RNA detected	0
Ambulatory mild disease	Asymptomatic; viral RNA detected	1
	Symptomatic; independent	2
	Symptomatic; assistance needed	3
Hospitalised: moderate disease	Hospitalised; no oxygen therapy*	4
	Hospitalised; oxygen by mask or nasal prongs	5
Hospitalised: severe diseases	Hospitalised; oxygen by NIV or high flow	6
	Intubation and mechanical ventilation, $pO_2/FiO_2 \geq 150$ or $SpO_2/FiO_2 \geq 200$	7
	Mechanical ventilation $pO_2/FiO_2 < 150$ ($SpO_2/FiO_2 < 200$) or vasopressors	8
	Mechanical ventilation $pO_2/FiO_2 < 150$ and vasopressors, dialysis, or ECMO	9
Dead	Dead	10

Esta classificação foi publicada pela *World Health Organization* (WHO) em 2020 e detalha as condições e o escore (*Score*) para a classificação clínica de indivíduos com Síndrome Respiratória Aguda (SRA) e SARS infectados com SARS-CoV-2.

Os voluntários com RT-PCR negativo para SARS-CoV-2, incluindo os indivíduos saudáveis do grupo negativo, receberam o escore 0. É importante salientar que os voluntários definidos como grupo saudável foram os indivíduos que apresentaram resultado negativo para o teste de RT-PCR para COVID-19 e no teste sorológico para anticorpos anti-SARS-CoV-2 (não foram previamente infectados). Os voluntários RT-PCR positivos que conseguiram se recuperar sem a necessidade de hospitalização, ou seja, dentro dos escores 1, 2 e 3 foram considerados com quadro “leve” de COVID-19. Entretanto, aqueles que precisaram de suporte médico com características não invasivas, sem apresentar nenhuma evolução no seu quadro clínico e sem uma administração muito

intensa de oxigenoterapia se encaixaram nos escores 4 e 5, sendo classificados como apresentando a forma “moderada” da doença. Por fim, aqueles voluntários que precisaram de hospitalização e evoluíram para um quadro ainda mais grave após a internação, sendo necessário passar por procedimentos médicos mais invasivos e recebendo volumes maiores na oxigenoterapia, se enquadraram dentro dos escores 6 a 9 e foram considerados casos “graves” de COVID-19.

Como já mencionado anteriormente, os voluntários que o quadro clínico evoluiu sistemicamente levando-os ao óbito como desfecho clínico foram classificados como quadro crítico com escore 10. Por serem estes poucos indivíduos no nosso n amostral, optamos por excluí-los das análises.

Durante as análises, em alguns momentos, os pacientes moderados e graves foram unidos em um grupo denominado “hospitalizado” com o intuito de aumentar o número amostral de indivíduos que evoluíram da forma leve para COVID-19 grave ou que não tiveram dados de prontuários suficientes para a classificação clínica. Ademais, esse grupo de pacientes atendido quando ainda apresentaram sintomas leves e, posteriormente, evoluíram para um estado moderado, grave ou crítico, foram chamados de “EVO” e tratados como um grupo a parte.

5.3 Coleta de Material Biológico

Foram coletados, por paciente, entre 30 mL a 40 mL de sangue periférico, sendo até 30 mL de sangue coletado em tubo contendo heparina sódica e até 10 mL de sangue coletado em tubo com ativador de coágulo. As coletas foram realizadas por profissionais treinados e devidamente paramentados com jaleco descartável, touca, luva, óculos de proteção ou *face shield*, máscara N-95 e luvas nitrílicas ou de vinil sem pó. Os tubos utilizados na coleta de sangue foram das marcas BD Biosciences[®], Vacuplast[®] ou Olen[®], variando de acordo com a disponibilidade do produto em cada um dos centros de recrutamento durante a pandemia. Após a coleta de sangue, as amostras foram direcionadas para os centros de processamento. Em Belo Horizonte-MG, as amostras foram transportadas no mesmo dia, em caixas térmicas de uso exclusivo para transporte de material biológico humano, para o Instituto René Rachou (IRR). Em Governador Valadares-MG, o material foi transportado no mesmo dia ou enviado na manhã do dia seguinte, em caixas térmicas ou isopor exclusivo para transporte de material biológico

humano, para ser processado no Laboratório Multiusuário da Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALE). Em São Paulo-SP, as amostras foram transportadas no mesmo dia, em caixas térmicas ou isopor de uso exclusivo de transporte de material biológico humano, para o Laboratório de Imunologia de Mucosas (LIM), no Instituto de Ciências Biológicas IV (ICB-IV), na Universidade de São Paulo (USP).

O processamento do sangue nos 3 centros ocorreu em até 48 horas após a coleta do material. A separação do soro e plasma foram realizados através de centrifugação a 700x g a 20°C por 10 minutos com aceleração de 9 e desaceleração de 4 (protocolo completo disponível no Anexo 9), sempre utilizando a centrífuga refrigerada de mesa Sorvall modelo ST16-R – Thermo Scientific® ou semelhante. O soro obtido após centrifugação foi transferido para microtubos de 1,5 mL ou 2 mL (contendo até cerca de 0,5 mL menos do volume total do microtubo) com o auxílio de micropipeta automática. Cada alíquota foi devidamente identificada, mapeada e armazenada em freezer -80°C para análises posteriores.

As coletas de *swab* para detecção do SARS-CoV-2 foram realizadas por profissionais treinados e devidamente paramentados com jaleco descartável, touca, luva, óculos de proteção ou *face shield*, máscara N-95 e luvas nitrílicas sem pó. Os materiais utilizados foram tubo com tampa de rosca de 15 mL da marca Sarstedt® e *swabs* estéreis da marca Labor Import®. Estas amostras foram mantidas em geladeira (2°C à 4°C) e transportadas no mesmo dia para serem processadas e analisadas por colaboradores do CT-Vacinas, que disponibilizaram equipamentos, insumos e protocolos para realizar os exames dos indivíduos de Belo Horizonte-MG e Governador Valadares-MG (Anexo 3). Em São Paulo-SP, os exames de RT-PCR para detecção da COVID-19 foram realizados no próprio IIER.

5.4 Medida de Mediadores Plasmáticos Pela Técnica de Luminex.

A medida dos mediadores sanguíneos foi realizada no plasma heparinizado para detecção e quantificação dos analitos. Foi utilizado o kit da Bio-Rad Laboratories (Bio-Plex® Pro Human Cytokine Standard), que, por ser multiplex, permite que sejam analisadas vários analitos simultaneamente utilizando a técnica de imunoensaio magnético realizado pelo equipamento Luminex (Bio-Plex® 200, Bio-Rad), seguindo os

protocolos de armazenamento e processamento padronizados pelo Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) do IRR.

As análises foram feitas utilizando o *software* Bioplex™ xPONENT versão 3.1. (Bio-Rad) e painel de analitos quantificados foi: IL-1 β , IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, CXCL8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, CCL11, FGF-*Basic*, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, PDGF-BB, CCL5, TNF- α e VEGF. A tabela a seguir contém mais informações do painel inflamatório utilizado. O protocolo utilizado para a detecção dos mediadores do painel (Tabela 4). O protocolo não pôde ser disponibilizado, porque é de uso confidencial da FIOCRUZ/MG.

Tabela 4: Painel de Mediadores Sanguíneos Medidos Pelo kit Bio-Plex® Pro Human Cytokine Standard.

ANALITO	DESCRIÇÃO	VALOR MÉDIO DE AQUISIÇÃO (pg/mL)
IL-1β	Interleucina – 1 beta.	1,013
IL-1Ra	Antagonista do receptor de Interleucina – 1.	76,896
IL-2	Interleucina – 2.	17,225
IL-4	Interleucina – 4.	1,588
IL-5	Interleucina – 5.	57,568
IL-6	Interleucina – 6.	7,980
IL-7	Interleucina – 7.	37,632
CXCL8	Interleucina – 8 (IL-8).	17,258
IL-9	Interleucina – 9.	37,868
IL-10	Interleucina – 10.	26,569
IL-12p70	Interleucina – 12p70.	19,101
IL-13	Interleucina – 13.	4,658
IL-15	Interleucina – 15.	137,986
IL-17A	Interleucina – 17A.	27,648
CCL11	Eotaxina.	2,081
FGF-<i>Basic</i>	Fator de Crescimento Básico de Fibroblastos.	61,360

G-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos.	97,519
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos.	6,627
IFN-γ	Interferon- γ .	4,495
CXCL10	Proteína10 induzida (IP-10).	57,004
CCL2	Proteína Quimioatraente 1 de Monócitos.	7,634
CCL3	Proteína Inflamatória de Macrófago-1 alfa.	755
CCL4	Proteína Inflamatória de Macrófago-1 beta.	7,107
PDGF-BB	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas.	76,160
CCL5	Regulação pós-ativação de célula T expressa e secretada.	59,870
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-Alfa.	53,044
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular.	209,528

Mediadores detectáveis pelo kit Bio-Plex® Pro Human Cytokine Standard. Os valores para os mediadores presentes no quadro representam a média da aquisição do padrão de cada um deles e são importantes para avaliar se os valores dos padrões de cada lote estão de acordo com a média prevista na bula.

5.5 Exames Complementares para Medida de Mediadores no Plasma

Com objetivo de complementar os resultados do ensaio Luminex para medida de mediadores no plasma, optamos por utilizar o sistema *Cytometric Bead Array* (CBA) (Becton Dickinson-BD), cujo protocolo de execução é semelhante ao da técnica de Luminex, entretanto, faz uso de esferas de poliestireno associados a anticorpos específicos para os mediadores humanos (no caso as quimiocinas). São utilizados anticorpos anti-IgG humana acoplados a fluoróforos de fluorescência discretas e distintas (detectadas no canal de fluorescência 3 do citômetro BD FACSverse). Para essa metodologia de CBA, foi utilizado um protocolo adaptado pelo GIPB-FIOCRUZ/MG do

protocolo original do kit CBA. O kit contém um painel de anticorpos para as seguintes quimiocinas: CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10 e todos os analitos foram dosados no plasma heparinizado. A tabela 5, a seguir, descreve as quimiocinas detectáveis pelo kit. O protocolo de CBA utilizado não pôde ser disponibilizado porque é de uso confidencial da FIOCRUZ/MG.

Tabela 5: Painel de Mediadores Sanguíneos Medidos pela Técnica de CBA (BD).

ANALITO	DESCRIÇÃO
CCL2	Proteína Quimioatraente 1 de Monócitos.
CCL5	Regulação pós-ativação de célula T expressa e secretada.
CXCL8	Interleucina – 8 (IL-8).
CXCL9	Monocina Induzida por Gama (MIG).
CXCL10	Proteína 10 induzida (IP-10).

5.6 Medida de Marcadores Bioquímicos

A dosagem dos marcadores bioquímicos foi realizada no soro. Os exames foram terceirizados para o Laboratório Hermes Pardini (LHP) e, desta forma, foram respeitados o volume e o material biológico solicitados pelo LHP para análise de cada analito.

Os seguintes marcadores integraram o painel bioquímico: Proteína C-Reativa (PCR), Ferritina e Vitamina D. Uma descrição mais detalhada de cada molécula está presente a seguir no Tabela 6.

Tabela 6: Painel de Exames Bioquímicos

MARCADOR	MATERIAL	CARACTERÍSTICAS GERAIS
PCR	Soro	Marcador bioquímico de inflamação aguda que ativa o sistema do complemento.
FERRITINA	Soro	Proteína hepática responsável pelo armazenamento de ferro no organismo. É bastante relacionada a infecções agudas e ao COVID-19.

VITAMINA D	Soro	Hormônio que atua em várias células inclusive as imunes e tem sido relacionados com a redução da inflamação na COVID-19.
------------	------	--

5.7 Medida de Anticorpos Séricos Anti-SARS-CoV-2

O ensaio utilizou o kit Bio-Plex Pro Human IgG SARS-CoV-2 N/RBD/S1/S2 4-Plex[®] da Bio-Rad[®]. O ensaio caracteriza-se como uma imunofluorescência indireta com aquisição feita por *beads* magnéticas, onde as proteínas virais SPIKE 1, SPIKE 2, RBD e N (*nucleocapsídeo*) do SARS-CoV-2, são associados e se ligam a anticorpos específicos presentes no soro dos indivíduos. Após várias lavagens para retirar os elementos que não se ligaram às proteínas virais, é adicionado um anticorpo biotinilado de detecção (anti-IgG humana) acoplado a um fluoróforo (acoplado à estreptavidina) que permite a aquisição específica dos conjugados. A figura 11, a seguir, ilustra os passos da técnica. O protocolo testado e padronizado pelo GIPB no IRR não pôde ser disponibilizado porque é de uso confidencial da FIOCRUZ/MG.

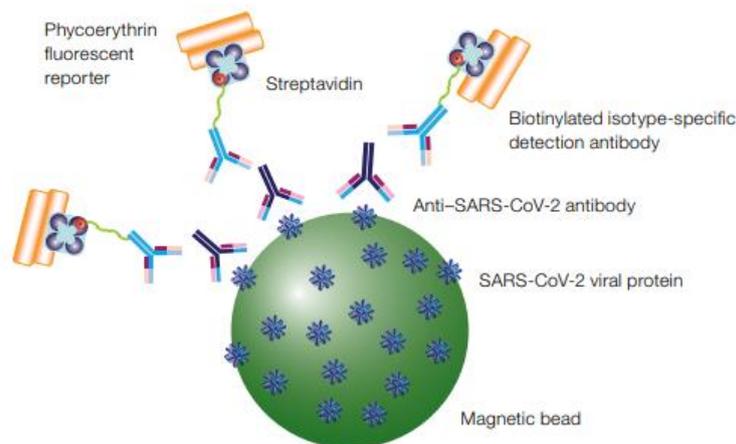


Figura 11: Ensaio Luminescência Sorológico para SARS-CoV-2. Representação esquemática do ensaio para medida de anticorpos anti-SARS-CoV-2 no soro pelo kit Bioplex (Bio-Rad[®]). Esferas (*beads*) magnéticas acopladas aos antígenos de interesse (proteínas N e S do SARS-CoV-2) ligam-se aos anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2 presentes no soro. Anticorpos de detecção anti-IgG humana acoplados a biotina se ligam aos anticorpos imobilizados nas esferas e são ligados por estreptavidina marcada com fluoróforo permitindo sua detecção pela medida da imunofluorescência, pelo equipamento Luminescência (Bio-Rad[®]).

5.8 Análises Estatísticas

5.8.1 Teste de Normalidade

Os testes de normalidade e lognormalidade são utilizados para ajustar as distribuições de probabilidade contínuas e unidimensionais de maneira que todas fiquem distribuídas de forma igualitária e permitindo uma análise mais segura e confiável dos dados. Utilizamos o teste Kolmogorov-Smirnov para análises com n amostral inferior a 30 indivíduos e o teste Shapiro-Wilk para análises com n amostral superior a 30 indivíduos.

5.8.2 Teste de Mann Whitney

As diferenças de abundância relativa dos números gerados pelas análises realizadas foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney não paramétrico sempre que era realizada uma comparação simples entre duas colunas ou grupos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo, utilizando o programa Graph Pad Prism 8.0[®].

5.8.3 Teste de Kruskal-Wallis e Pós-Teste de Dunn

As diferenças de abundância relativa dos números gerados pelas análises realizadas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis não paramétrico sempre que era realizada uma comparação com mais de duas colunas ou grupos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo, utilizando o programa Graph Pad Prism 8.0[®]. O pós-teste de Dunn foi utilizado para a aquisição dos valores estatísticos específicos para cada comparação realizada.

5.8.4 Teste de ROUT

O teste ROUT é um método utilizado para identificação de valores distribuídos drasticamente fora (*outliers*) de uma curva gaussiana da distribuição dos dados em análise. Esses *outliers* podem induzir resultados menos confiáveis sendo necessário sua exclusão do n amostral.

5.9 Gráficos

5.9.1 Radar

O gráfico em radar faz a representação do balanço da alta frequência de uma população de interesse, no caso do presente trabalho, os mediadores inflamatórios ou reguladores dos grupos descritos. Os gráficos foram construídos com cada eixo exibindo a proporção dos voluntários com a frequência de produção de cada biomarcador em cada um dos grupos. Os valores, em cada um dos eixos, foram unidos para formar a área poligonal central que representa o equilíbrio global dos mediadores. O aumento (acima de 50% em relação à média global) ou redução (inferior a 50% em relação à média global) das áreas poligonais centrais refletem a expressão de cada um dos analitos.

5.9.2 Violino

O gráfico de Violino é uma demonstração visual da variação de dados numéricos semelhante ao *Box Plot* (gráfico que representa os dados em caixas ou barras), entretanto permite uma melhor visualização das distribuições dos dados por meio de seus quartis nos diferentes grupos de estudos.

5.9.3 Correlograma de Correlação de Spearman

As matrizes de correlação em todas as citocinas do plasma do paciente, comparando 0 dias de infecção por COVID-19 e 7 dias de infecção por COVID-19 em Belo Horizonte, Brasil. A força da correlação entre duas variáveis é representada pela cor do círculo na interseção dessas variáveis. As cores variam de azul brilhante (forte correlação positiva; ou seja, $r^2 = 1,0$) a vermelho brilhante (forte correlação negativa; ou seja, $r^2 = -1,0$). O tamanho do círculo representa a diferença estatística (*p-value*) entre as citocinas, quanto maior o círculo, maior a diferença estatística. Os resultados não foram exibidos se $P > 0,05$.

5.9.4 Heatmap

O *Heatmap* é capaz de representar os dados em duas dimensões de maneira que os valores são apresentados em coloração com maior ou menor intensidade indicando

claramente os fenômenos que estão associados ou que variam dentro do espaço. Nesse tipo de representação gráfica, quanto mais forte é a coloração azul, maior é a correlação positiva e quanto mais forte a coloração vermelha, maior é a correlação negativa. Os espaços em branco indicam que os dados possuem uma correlação nula por seguirem direções opostas e desassociadas.

6 RESULTADOS & DISCUSSÃO

6.1 Análise das Características das Populações do Estudo

Inicialmente, analisamos as características demográficas e de saúde dos 309 indivíduos selecionados para as análises de mediadores plasmáticos (Tabela 7).

Tabela 7 – Tabela Populacional de Indivíduos Utilizados na Análise

	Governador Valadares (n = 89)		Belo Horizonte (n = 174)		São Paulo (n = 46)		Valor de P
	COVID-19 (n = 45)	SG (n = 44)	COVID-19 (n = 98)	SG (n = 76)	COVID-19 (n = 35)	SG (n = 11)	
Idade (anos) (n;%)	39,7 ± 15,8	38,0 (18 to 90)	42,9* (18 to 70)	42,1 ± 14,6	46,0 ± 11,0*	39,0 (23 to 69)	0.0057*
							0.0017*
Faixa Etária (idosos) (n;%)	07 (15,55%)	05 (11,36%)	15 (15,30%)	11 (14,47%)	02 (5,71%)	01 (9,09%)	0.0895
Sexo (feminino) (n;%)	26 (57,77%)	21 (47,72%)	45 (45,91%)	41 (53,94%)	21 (60,00%)	05 (45,45%)	0.0674
Índice de Massa Corporal (IMC)	26,7 ± 4,89	26,6 ± 4,22	26,8 ± 5,22	26,8 ± 4,48	-	-	0.0679

Comorbidades							
<i>Obesidade</i>	10 (22,22%)	08 (18,18%)	18 (18,36%)	16 (21,05%)	-	-	-
<i>Doenças Respiratórias (n;%)</i>	07 (15,55%)	04 (9,09%)	13 (13,26%)	10 (13,15%)	02 (5,71%)	03 (27,27%)	-
<i>Doenças Cardíacas (n;%)</i>	08 (17,77%)	09 (20,45%)	24 (24,48%)	15 (19,73%)	13 (37,14%)	0 (0,0%)	-
<i>Hipertensão (n;%)</i>	07 (15,9%)	07 (15,55%)	21 (21,42%)	15 (19,73%)	7 (20,0%)	01 (16,6%)	-
<i>Doenças Metabólicas (n;%)</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	11 (11,22%)	04 (5,26%)	06 (17,14%)	0 (0,0%)	-
<i>Doenças Renais Crônicas (n;%)</i>	01 (2,22%)	0 (0,0%)	05 (5,10%)	03 (3,94%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	-
<i>Com mais de uma comorbidade dentro destes grupos (n;%)</i>	02 (4,44%)	0 (0,0%)	11 (11,22%)	08 (10,52%)	07 (20,00%)	0 (0,0%)	-
Gravidade da COVID-19 (n;%)							
<i>Leve</i>	42 (93,33%)	-	79 (80,61%)	-	6 (17,14%)	-	-
<i>Moderado</i>	0 (0,0%)	-	5 (5,10%)	-	13 (37,14%)	-	-
<i>Grave</i>	0 (0,0%)	-	8 (8,16%)	-	16 (45,71%)	-	-
<i>Hospitalizado (Moderado ou Grave)</i>	03 (6,66%)	-	06 (6,12%)	-	0 (0,0%)	-	-

Estes indivíduos foram selecionados (309 entre os 763 voluntários recrutados), isto porque eles nos permitiram um pareamento mais adequado de sexo, idade e presença de comorbidades para comparar os grupos de indivíduos com COVID-19 nas formas leve, moderada e grave entre si e com o grupo síndrome gripal (SG). Desta maneira, pudemos excluir a influência desses fatores no desfecho da doença e analisar com mais precisão o efeito do perfil inflamatório. Foram observadas diferenças apenas na idade dos indivíduos do grupo geral, mas essas diferenças foram utilizadas posteriormente para segregar os indivíduos entre adultos e idosos que puderam ser analisados separadamente (Figura 19).

6.2 Análises dos Mediadores Plasmáticos Para Caracterização da População do Estudo

Observamos, ao longo das análises, que 8 mediadores detectados pelo ensaio de Luminex (CCL2, CXCL8, CXCL10, IL-6, IL12p70, IFN- γ , IL-1Ra e IL-10) se destacaram apresentando diferenças significativas entre os grupos comparados em quase todas as análises. Além desses mediadores, optamos por adicionar 6 mediadores complementares (CCL5, IL-15, TNF- α , IL-4, IL-5 e IL-2) para complementar o painel inflamatório dos indivíduos tendo em vista aqueles já descritos como importantes no *inflammaging*.

Para as análises globais do perfil inflamatório, foram considerados todos os 27 mediadores medidos pelo ensaio de Luminex. No entanto, para as análises individualizadas dos mediadores com cálculos estatísticos de diferenças entre grupos foram considerados apenas aqueles mencionados no parágrafo anterior.

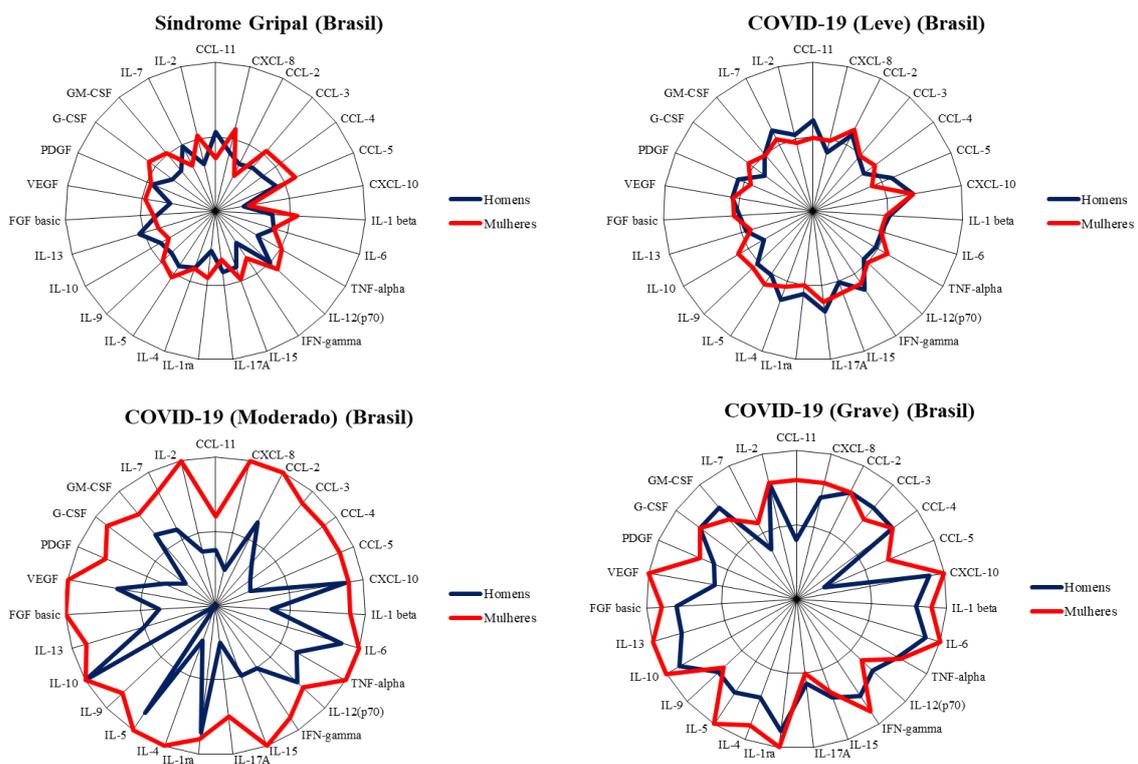
Primeiramente, foram feitas análises gerais para entender se havia variações no perfil inflamatório dos indivíduos quando consideradas variáveis como o sexo e a raça, por exemplo. Depois, analisamos as possíveis diferenças entre os grupos em outros parâmetros como os biomarcadores bioquímicos e o valor da carga viral obtida no exame de RT-PCR para COVID-19. Em seguida, as análises se direcionaram para a escolha do dia de início de sintomas que melhor se adequava ao objetivo principal do estudo que era detectar mediadores e biomarcadores que pudessem predizer o desfecho da COVID-19. Para isto, o perfil inflamatório dos indivíduos deveria ser o mais inicial possível para evitar a confusão destes com as grandes alterações produzidas pelo curso da doença. Após esta escolha, foram analisados os grupos clínicos da doença, primeiro comparando os grupos em comum nos 3 centros de coleta, observando também as diferenças entre os indivíduos adultos (20 a 59 anos) e idosos (acima de 60 anos) de regiões endêmicas e não endêmica, depois comparado todas as formas clínicas da COVID-19, considerando os voluntários das cidades de Belo Horizonte e São Paulo. Ainda pensando nos possíveis biomarcadores ou preditores de diferentes formas clínicas da COVID-19, foram analisadas duas pequenas coortes, uma contendo um grupo de pacientes que tiveram material coletado quando apresentavam a COVID-19 na sua forma leve e, posteriormente, evoluíram e foram hospitalizados (denominados como grupo COVID-19 EVO) e a outra coorte com indivíduos hospitalizados coletados em dois tempos distintos (tempo 0 e 7 dias após a primeira coleta). Por fim, foi realizada uma comparação do perfil inflamatório de indivíduos vacinados e reinfectados e uma análise adicional com um painel contendo

a citocina CXCL9, recentemente descrita como possível biomarcador do envelhecimento. Neste último caso, comparamos as concentrações de CXCL9 em indivíduos com COVID-19 em diferentes faixas etárias.

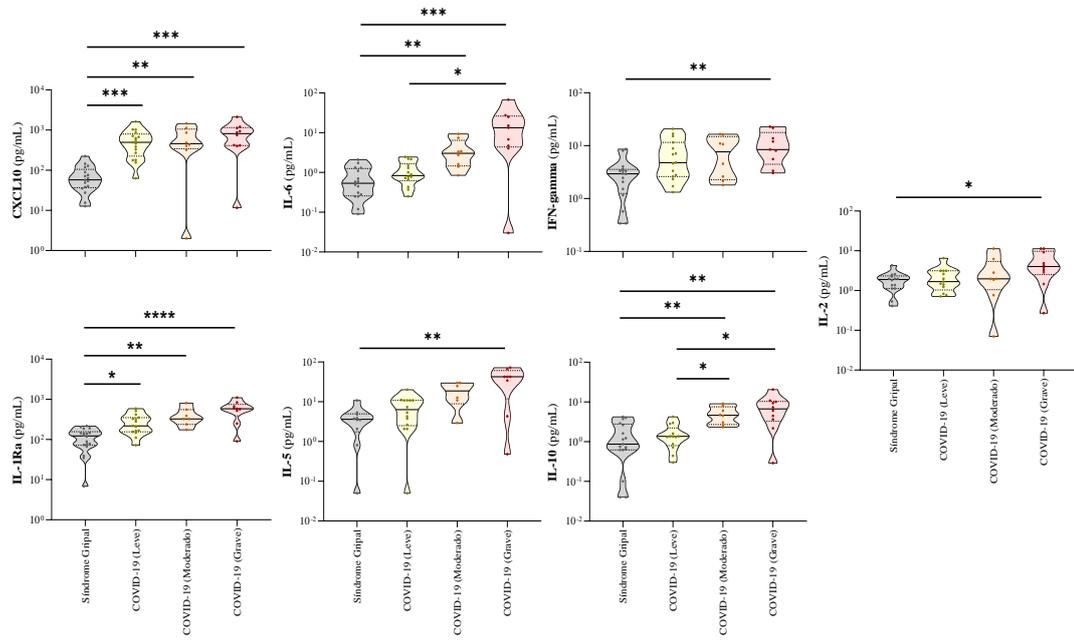
O grupo “síndrome gripal” (SG) se refere a um grupo de indivíduos não infectados com SARS-CoV-2, mas que apresentou alguma doença respiratória aguda cujo agente infeccioso é desconhecido. O grupo de pacientes “hospitalizados” foi composto de indivíduos com COVID-19 que podem apresentar as formas moderada ou grave de COVID-19 e que foram unidos em um só grupo com o intuito de ampliar o *n* amostral.

É importante destacar que o gráfico de radar entrega um resultado da complexidade dos biomarcadores que estão sendo analisados, sendo importante na observação global das frequências de alto produtores (todos que ultrapassarem o eixo interno que equivale a 50%) dentro de cada grupo. O gráfico de radar como está aqui apresentado, não é capaz de dar confirmação estatística das diferenças que demonstra.

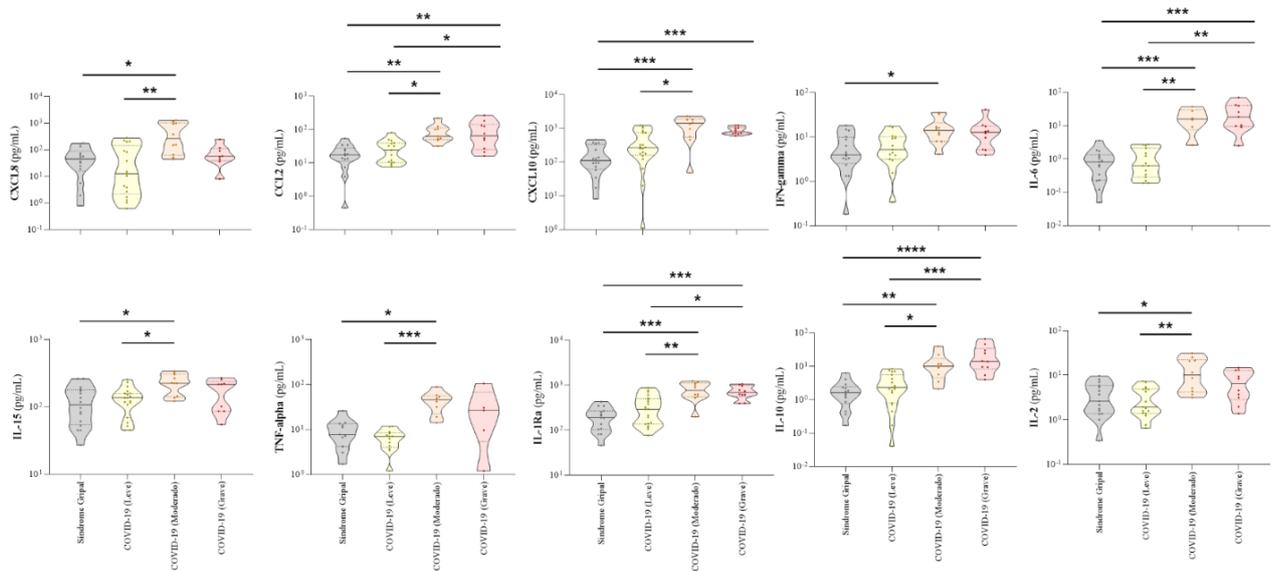
Para facilitar a discussão dos dados, apresentamos a descrição dos resultados e a sua discussão em uma sessão única.



B



C



D

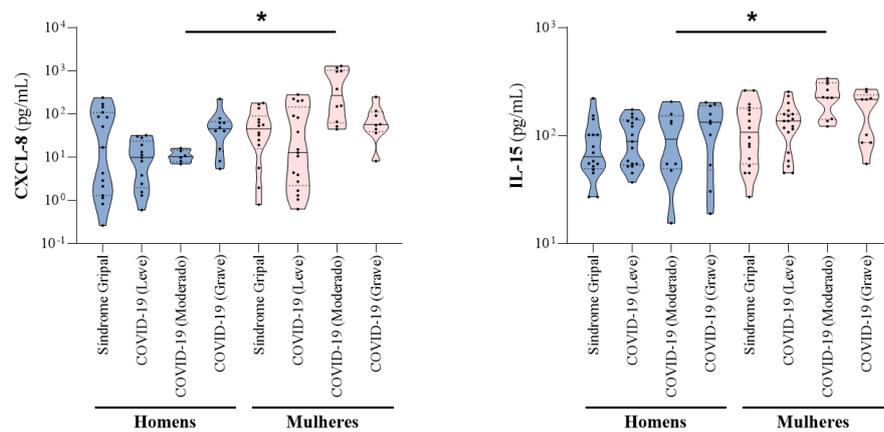


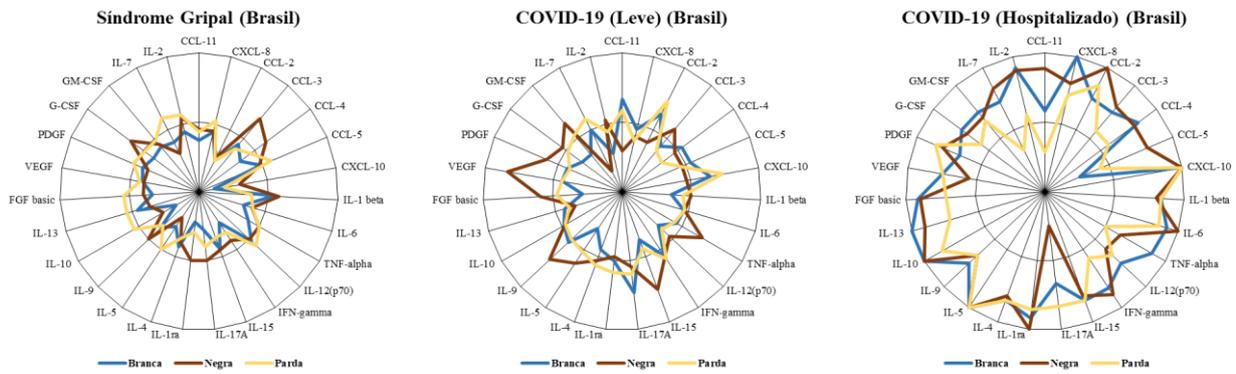
Figura 12: Influência do Sexo dos Voluntários no Seu Perfil Inflamatório. (A) Análise comparativa da frequência de altos produtores dos mediadores entre homens (n=53) e das mulheres (n= 57) em cada um dos grupos clínicos, utilizando a população dos 3 centros de coletas. Os dados foram apresentados em gráficos de radar e expressos em percentual. (B) Análise comparativa das concentrações dos mediadores plasmáticos entre as formas clínicas da COVID-19 e o grupo com síndrome gripal (SG) nos indivíduos sexo masculino. (C) Análise comparativa das concentrações dos mediadores plasmáticos entre as formas clínicas da COVID-19 e o grupo com síndrome gripal (SG) nos indivíduos sexo feminino. (D) Análise comparativa dos mediadores CXCL8 e IL-15 entre homens e mulheres nas diferentes formas clínicas da COVID-19 e no grupo com SG. Nos gráficos de violino, a mediana separa os quartis e o formato do violino é diretamente proporcional aos valores dos dados. As amostras foram previamente normalizadas e com *outliers* excluídos do *n* amostral, foi realizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. As linhas foram utilizadas para representar quais grupos foram comparados e os asteriscos para representar a significância estatística (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ ou **** $p < 0,0001$).

Como já colocado no início do tópico anterior, as primeiras análises buscaram compreender mais informações sobre a população que foi coletada. Sendo assim, sabe-se que a literatura nos mostra uma extensa discussão sobre como os homens, em geral, possuem uma susceptibilidade maior para várias doenças inflamatórias e, conseqüentemente, podem expressar um processo inflamatório mais acentuado em relação às mulheres (CARDANO *et al*, 2022). Muitas diferenças já foram abordadas como prováveis fatores que podem favorecer este fenômeno mais inflamatório nos homens, embora ainda não haja uma resposta conclusiva, fatores genéticos (CARDANO *et al*, 2022; SMITH *et al*, 2010), hormonais e metabólicos (JOOSTEN *et al*, 2004), dentre outros, já foram descritos. Desta forma, já é compreendido que um dos grupos com susceptibilidade à COVID-19 são os homens, que são responsáveis por integrar em sua maioria os grupos de indivíduos com as formas mais graves da doença desde o início da pandemia (HUANG *et al*, 2020) e que apesar de não ter necessariamente, uma comorbidade envolvida, como é o caso dos demais grupos de risco da COVID-19, a tendência é que os homens podem ser capazes de induzir processos inflamatórios mais intensos no organismo, que podem levar a um perfil inflamatório mais específico e com menor complexidade, como observado, por exemplo, em idosos (LIPSITZ, 2004). De fato, um trabalho recente discute o achado epidemiológico de que os homens são mais suscetíveis às formas graves da COVID-19 e essa suscetibilidade está correlacionada com um perfil de produção mais acentuada de citocinas inflamatórias no plasma (tais como CXCL8 e IL-18) e com ativação mais robusta de macrófagos não-clássicos durante o desenvolvimento da doença (TAKAHASHI *et al*, 2020).

Nós investigamos se o perfil inflamatório dos homens estava aumentado em relação ao das mulheres. Entretanto, na coorte do presente estudo, observamos na comparação entre os sexos (Fig. 12) que os grupos SG, COVID-19 (Leve) e (Grave) apresentam um

perfil semelhante entre homens e mulheres e que há diferenças apenas nos indivíduos com COVID-19 moderada sendo que as mulheres apresentam um perfil de produção de mediadores plasmáticos mais pronunciado que os homens (Fig. 12A). Em concordância, as análises (Fig. 12B e Fig. 12C) demonstraram diferenças significativas semelhantes entre os grupos. É importante notar que as mulheres com COVID-19 moderada apresentam um aumento significativo da concentração de 5 mediadores (CXCL8, IFN- γ , IL-15, TNF- α e IL-2) quando comparadas com seu controle SG e também um grande aumento na expressão de alguns mediadores como: IL-1Ra, IL-6, IL-10 e CXCL10, entre os grupos de ambos os sexos. Quando realizamos a comparação dos grupos entre os gêneros (Fig. 12D), percebe-se que existem diferenças significativas nas concentrações de CXCL8 e IL-15 ambas entre os grupos moderados sendo que as mulheres apresentam níveis mais elevados. No entanto, apesar das mulheres apresentarem um perfil inflamatório aparentemente mais acentuado no grupo COVID-19 (Moderado), os homens apresentaram um perfil menos complexo e mais específico, semelhante ao que já foi observado na literatura em indivíduos mais idosos ou com idade biológica acelerada, por exemplo (DURSO *et al*, 2022; LIPSITZ, 2004). É interessante notar que o grupo com a forma moderada de COVID-19 se destacou nessas diferenças. Nossa hipótese é que este grupo deve conter exatamente aqueles indivíduos *borderline* em dois aspectos: 1) eles se encontram, do ponto de vista clínico, em um momento de transição entre obter uma resposta satisfatória às intervenções médicas e regredir para formas clínicas mais leves ou, o contrário, progredir para formas mais graves da doença; 2) do ponto de vista imunológicos, notamos em análises subsequentes do perfil inflamatório e de outros parâmetros (Fig. 14) que eles são o grupo que apresenta um perfil inflamatório acentuado, mas que contam ainda com a produção de mediadores anti-inflamatórios capazes de controlar a progressão da inflamação que é parte da patogênese do quadro grave da COVID-19.

A



B

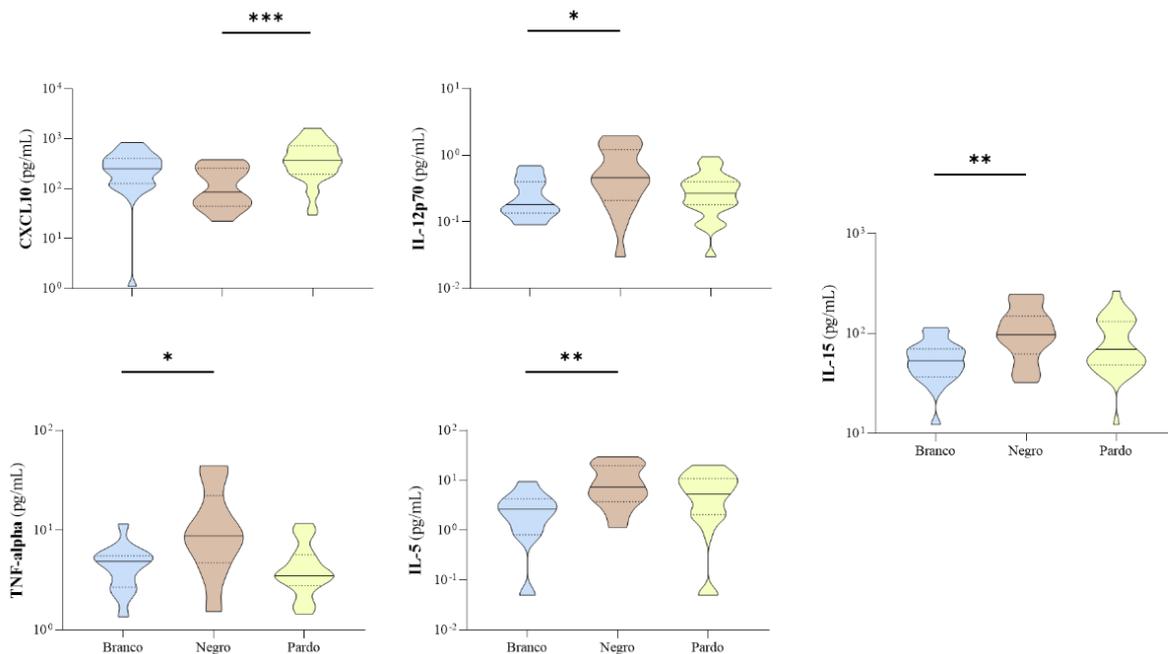


Figura 13: Influência da Raça/Etnia dos Voluntários no Seu Perfil Inflamatório. (A) Análise comparativa da frequência de altos produtores dos mediadores plasmáticos entre indivíduos com COVID-19 da raça branca (n=28), negra (n= 17) e parda (n=30) em cada um dos grupos clínicos, utilizando apenas a população de Belo Horizonte. Os dados foram apresentados em gráficos de radar e expressos em percentual. **(B)** Análise comparativa entre indivíduos com COVID-19 das raças branca, negra e parda. Nos gráficos de violino, a mediana separa os quartis e o formato de cada violino é diretamente proporcional aos valores dos dados. As amostras foram previamente normalizadas e com *outliers* excluídos do *n* amostral, foi realizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. As linhas representam quais grupos foram comparados e os asteriscos representar a significância estatística (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ ou **** $p < 0,0001$).

O Brasil é um país complexo com grande extensão territorial, diferenças regionais importantes e diversidade étnica e cultural. Assim a etnia/raça dos indivíduos é parte da complexidade inerente ao estudo da nossa população. Decidimos explorar mais essas diferenças neste estudo, pois existem poucos trabalhos publicados analisando a

associação entre raças/etnias com a COVID-19 ou com outras patologias em geral. Alguns trabalhos mostram muitos fatores que podem se relacionar à uma maior predisposição a doenças circulatórias, por exemplo (DRIES *et al*, 1999; VASAN *et al*, 2021; PRENDERGAST, 2014). Uma limitação do nosso estudo é que, além da miscigenação brasileira que torna difícil a classificação de etnia e raça, esse tipo de informação é obtida do próprio voluntário, sem auxílio de qualquer avaliação mais precisa.

Mesmo com tais limitações, comparamos o perfil inflamatório de indivíduos que se consideram brancos, pardos e negros (Fig. 13), sendo importante ressaltar que é uma análise preliminar e que seria necessário realizar estudos mais direcionados e aprofundados para se chegar a uma conclusão concreta sobre os resultados. Originalmente havia as opções “indígena” e “amarela” no questionário, mas em função do baixo *n* amostral, a análise foi realizada sem essas duas raças. Sendo assim, nota-se que o perfil inflamatório em cada grupo é bastante semelhante, sobretudo nas análises globais (Fig. 13A). Nas análises dos mediadores individuais, o VEGF destaca-se na população negra, onde se manifesta com a concentração um pouco mais aumentada na COVID-19 em relação às demais etnias, na literatura, este fenômeno já é observado. A população negra possui algumas diferenças das demais populações em se tratando de sistema circulatório, diferenças que podem tornar, esta população, mais susceptível ao desenvolvimento de certos distúrbios cardiovasculares (PRENDERGAST, 2014; VASAN *et al*, 2021). Como o processo inflamatório da COVID-19 pode favorecer a indução de distúrbios circulatórios e de coagulação (ESLAMIFAR *et al*, 2020), entende-se que seria coerente se esta população se mostrasse mais vulnerável a esta condição. Um estudo de meta-análise de 50 artigos publicado em 2021 mostra que, dentre um total de 4.318.929 indivíduos incluídos dos estudos utilizados, indivíduos que compõem as populações negra, asiática e hispânica nos Estados Unidos têm um risco maior de contrair a infecção por SARS-CoV-2 e de hospitalização uma vez infectados, quando comparados com indivíduos da população branca. Esse estudo foi importante porque, diferentemente de outros, ele ajustou (usando *relative risk ratio and odds ratio*) as populações pelas condições socioeconômicas e de saúde, fatores de confusão relevantes nesse tipo de análise (MAGESH *et al*, 2021). No nosso estudo, foi possível observar uma expressiva diminuição de IL-17A na população negra infectada com COVID-19 (no grupo hospitalizado) (Fig. 13A), entretanto, não detectamos diferença estatisticamente significativa quando comparamos os níveis dessa citocina entre as raças. A figura 13B

mostra as diferenças de concentração de cada mediador em cada etnia, sendo possível identificar 5 diferenças: CXCL10 que aumenta de concentração nos indivíduos pardos em relação aos negros, TNF- α , IL-12p70, IL-5 e IL-15 que têm a concentração aumentada nos indivíduos negros em relação aos brancos. Destas, apenas a quimiocina CXCL10 não apresenta níveis significativamente aumentados na população negra. Existem outros fatores, sobretudo sociodemográficos, que argumentam que a população negra, em geral, é mais vulnerável socialmente e, esta também poderia ser uma razão pela qual observamos tais diferenças nessa população em relação às demais (DRIES *et al*, 1999; PRENDERGAST, 2014). Para esclarecer melhor se estas diferenças são ligadas às diferenças raciais (por fatores genéticos, por exemplo), seriam necessárias outras análises levando-se em contato os fatores de confusão.

Muitos trabalhos mostraram que o aumento de alguns fatores presentes no plasma, como a proteína C reativa (PCR) e a ferritina, seriam biomarcadores da COVID-19 grave (SMILOWITZ *et al*, 2020; LIU *et al*, 2020; CHENG *et al*, 2020; MAHROUM *et al*, 2022). Além destes, algumas citocinas inflamatórias como a IL-6 também têm sido descritas em associação com uma inflamação mais intensa nos primeiros dias da infecção (LUCAS *et al*, 2020; LIU *et al*, 2020; HUANG *et al*, 2020). Sendo assim, procuramos estudar como estes parâmetros poderiam estar aumentados nas nossas 3 coortes (analisadas em conjunto) (Fig. 14).

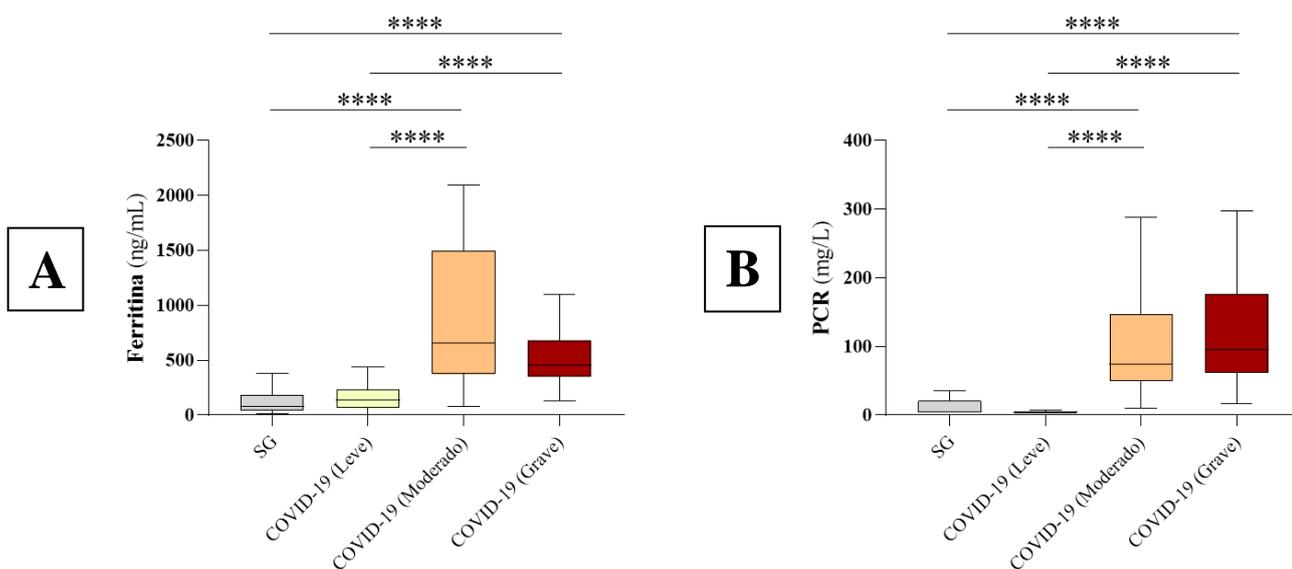
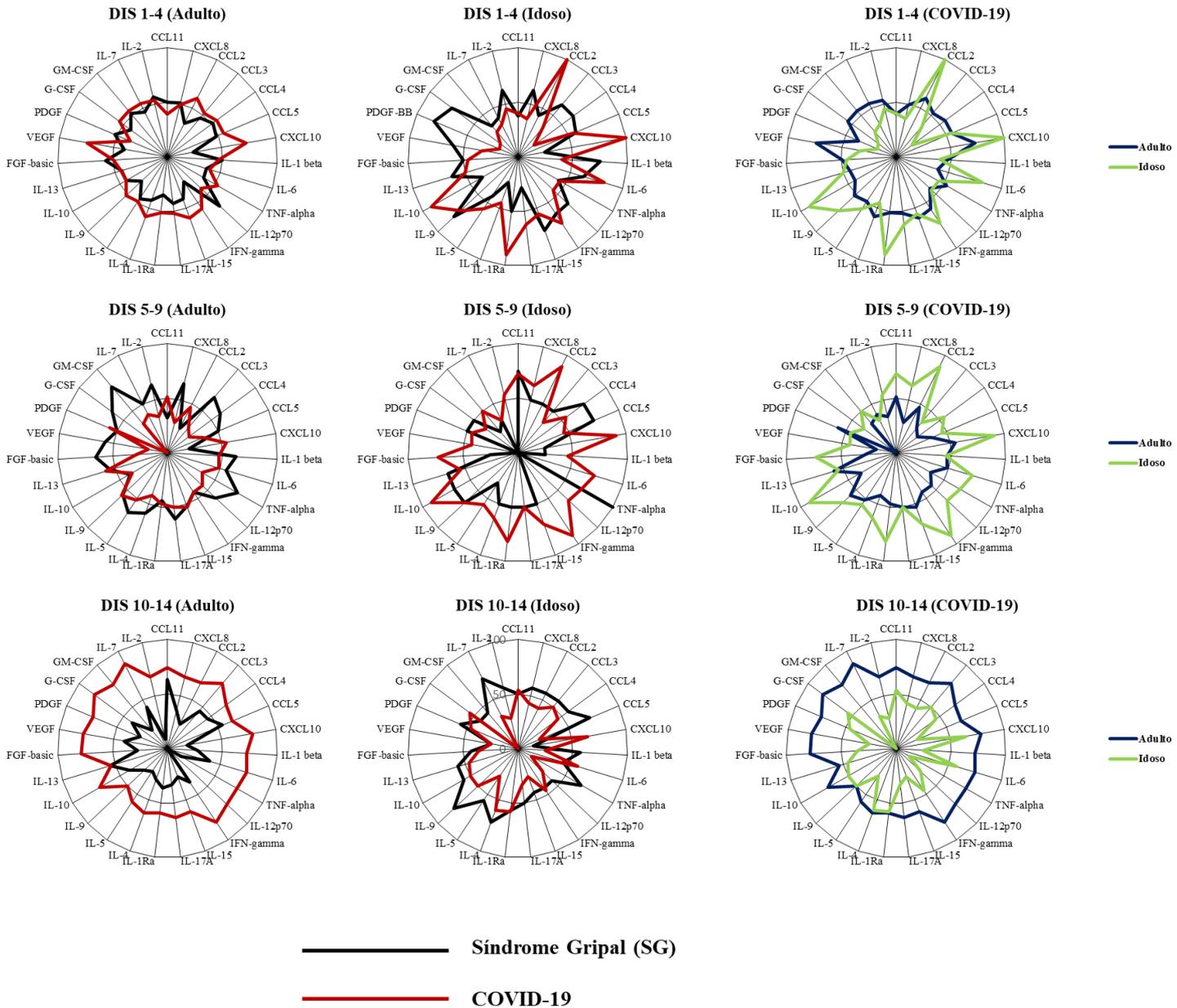


Figura 14: Influência de Biomarcadores Bioquímicos nas Formas Clínicas da COVID-19. Análise de significância estatística dos biomarcadores Ferritina (Figura 15A) e Proteína C-Reativa (PCR) (Figura 15B) de indivíduos infectados com diferentes formas clínicas da COVID-19, utilizando a população dos 3 centros de coletas. Os dados foram apresentados em gráfico *box-plot* considerando que a mediana separa os quartis. As amostras foram previamente normalizadas e com *outliers* excluídos do *n* amostral, foi realizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. As linhas foram utilizadas para representar quais grupos foram comparados e os asteriscos para representar a significância estatística (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ ou **** $p < 0,0001$). Não houve diferença nos níveis Vitamina D entre os grupos e, por essa razão, esta não foi representada na figura.

Observamos que, de fato, a PCR e a ferritina estão mais aumentados entre os grupos infectados com COVID-19 nas formas clínicas mais graves da doença, em concordância com os dados já publicados na literatura.

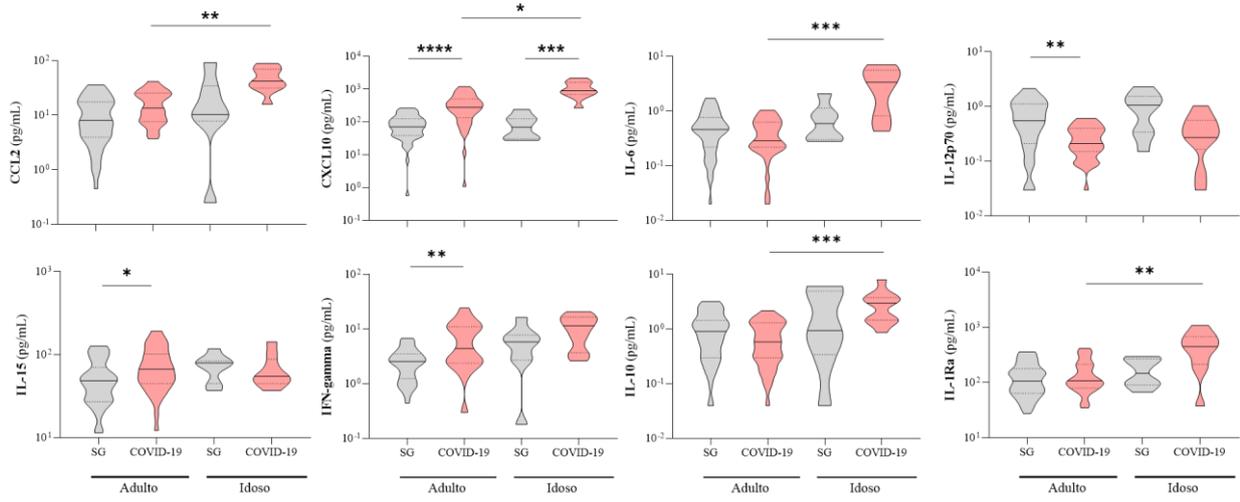
Uma das questões importantes abordadas no nosso estudo foi a relevância do tempo de início da infecção pelo SARS-CoV-2 nas análises de quaisquer fatores que eventualmente contribuiriam para determinar o quadro mais grave da COVID-19. Muitos trabalhos publicados com COVID-19 não observam o dia de início dos sintomas (DIS) como uma variável que pode ser muito importante a depender da hipótese a ser abordada. No presente estudo, entendemos que o perfil inflamatório do indivíduo no período inicial da doença seria crítico para investigar o impacto desse perfil no desfecho da COVID-19 já que é esta nossa hipótese de trabalho. Com o avanço do processo infeccioso, as alterações impostas pela resposta imune se somam a este perfil tornando a análise mais difusa e completa. Abordagem similar foi realizada em alguns trabalhos (LUCAS *et al*, 2020) que demonstram que os primeiros 5 a 7 dias de início dos sintomas são os mais adequados para avaliação da inflamação relacionada à infecção viral propriamente dita, uma vez que as alterações nos dias subsequentes ocorrem em função da participação mais ativa de outras células (principalmente linfócitos) e da concentração mais amplificada de determinadas moléculas (LUCAS *et al*, 2020). A própria tempestade de citocinas ou explosão inflamatória que é capaz de causar lesões ao organismo não tem uma relação direta com o vírus, mas é uma consequência da resposta imune (que pode ser determinada por um perfil imune prévio do indivíduo) à infecção viral (HUANG *et al*, 2020; MEDZHITOV, 2008; LUCAS *et al*, 2020; LIU *et al*, 2020). Diante dessas considerações, decidimos analisar 3 grupos distintos, com indivíduos infectados e não infectados, e vários tempos de infecção para orientar a escolha de qual seria o DIS ideal para o nosso estudo. Os dias de infecção seriam 1 a 4 dias, 5 a 9 dias e acima de 10 dias (contados a partir do início dos sintomas). Como o nosso objetivo é examinar o impacto de um perfil

inflamatório inicial relacionado àquele apresentado por indivíduos idosos (*inflammaging*) e avaliar o seu impacto no desfecho da doença, analisamos duas faixas etárias: adultos (20 a 59 anos) e idosos (acima de 60 anos).

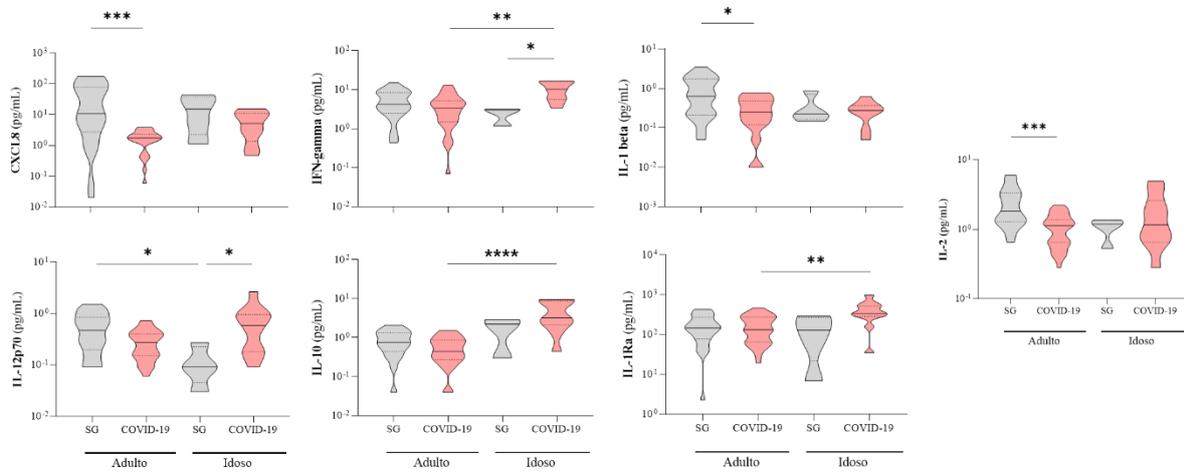


A

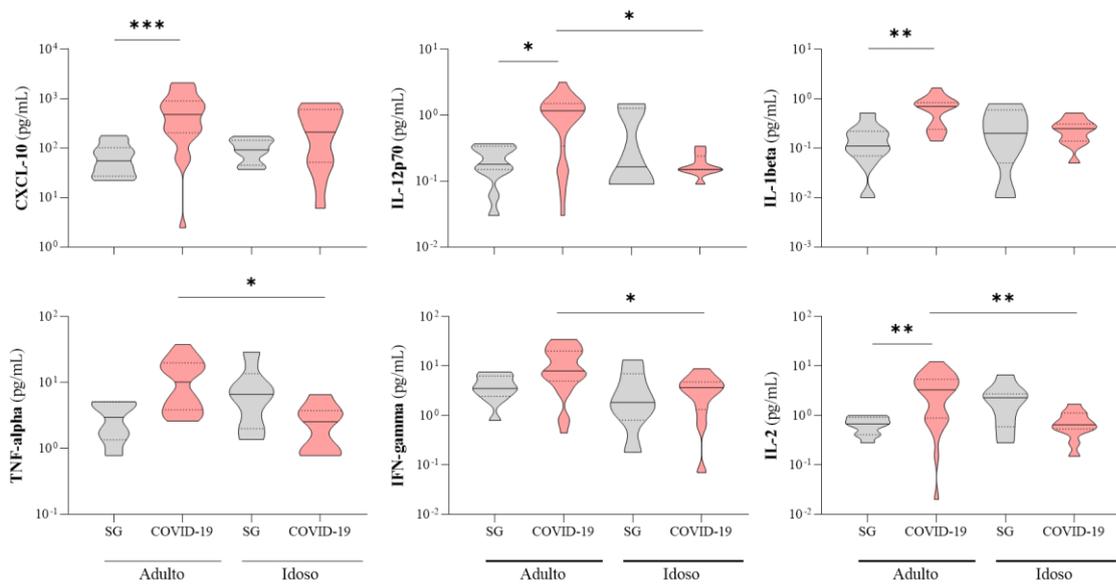
B



C



D



É importante salientar mais uma vez que o gráfico de radar entrega um resultado da complexidade dos biomarcadores que estão sendo analisados, sendo importante na observação global das frequências de alto produtores (todos que ultrapassarem o eixo interno que equivale a 50%) dentro de cada grupo. O gráfico de radar como está aqui apresentado, não é capaz de dar confirmação estatística das diferenças que demonstra. Ademais, as análises realizadas na figura 16 não expressam uma cinética entre os indivíduos e sim a comparação de indivíduos infectados em diferentes DIS.

Nossos resultados mostraram que, a partir de 10 dias do início dos sintomas, o perfil inflamatório altera-se drasticamente entre os grupos (Fig. 15A). Ocorrem várias diferenças entre os fatores de crescimento e perda de correlação com citocinas anti-inflamatórias e vários dos mediadores pró-inflamatórios (Fig. 15B), reforçando a conclusão de que nossas análises deveriam incluir indivíduos com 1 a 7 dias de infecção (Fig. 16). A partir desses resultados, padronizamos todas as análises para esse tempo de sintomas. É interessante observar como a expressão CXCL10, aumenta nos indivíduos infectados com 1 dia de sintomas e permanece aumentado até indivíduos infectados com 7 dias de sintoma (Fig. 16).

Além disto, observamos, na comparação dos indivíduos adultos e idosos com COVID-19 entre diferentes grupos de sintomas, que os idosos, mais vulneráveis à doença, exibem um perfil inflamatório específico e com baixa complexidade (Fig. 15A).

Uma outra questão relevante quando analisando os vários desfechos clínicos da COVID-19 é certamente se esses desfechos não foram determinados pela presença de cargas virais diferentes entre os indivíduos.

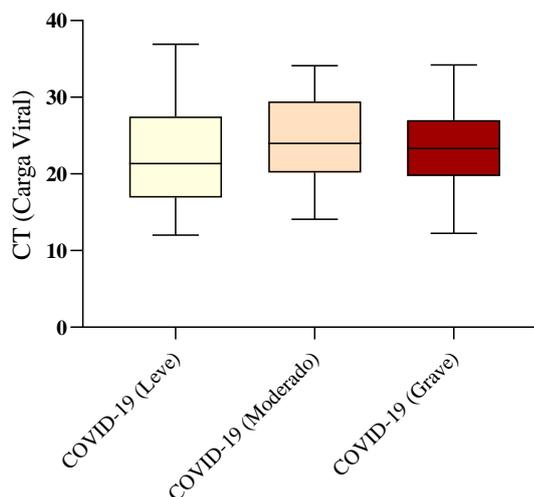


Figura 17: Influência da Carga Viral de Indivíduos Infectados no Desenvolvimento das Diferentes Formas Clínicas da COVID-19. Foram considerados os voluntários das 3 Cidades analisadas em conjunto. Os dados foram apresentados em gráfico *box-plot* considerando que a mediana separa os quartis. Cada *box-plot* representa o número de ciclos necessários (CT) para a detecção do vírus SARS-CoV-2 pela técnica de RT-PCR. O CT corresponde ao número de ciclos de PCR necessários para o início da amplificação, ou seja, o momento em que a fluorescência emitida ultrapassa a linha do limite. Dessa forma, o CT tem relação inversamente proporcional à quantidade de sequência alvo presente na amostra. As amostras foram previamente normalizadas e com *outliers* excluídos do n amostral, foi realizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. As linhas foram utilizadas para representar quais grupos foram comparados e os asteriscos para representar a significância estatística (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ ou **** $p < 0,0001$).

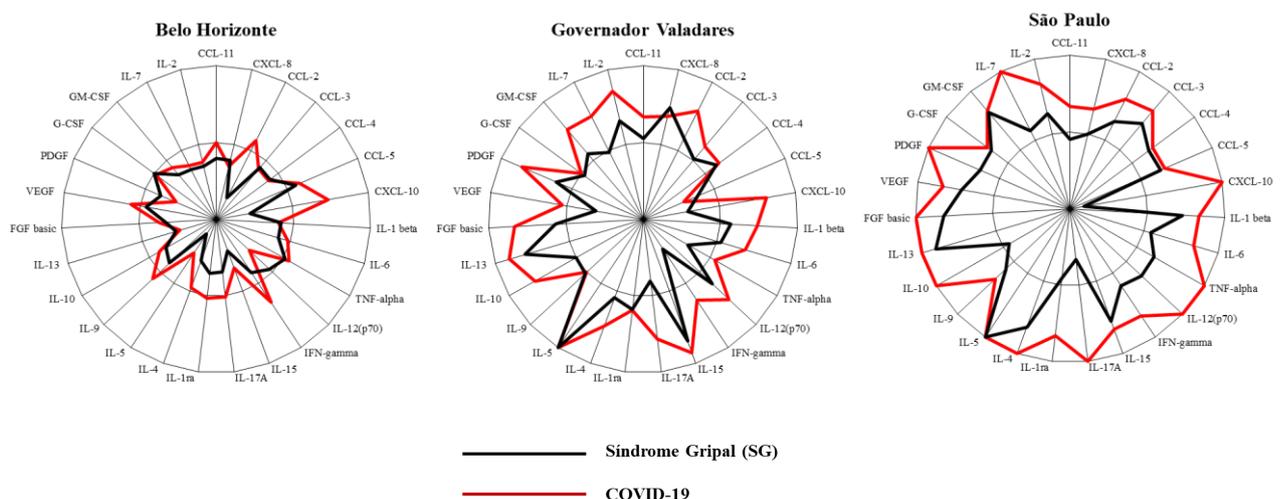
Para confirmar que os indivíduos que foram selecionados com 1 a 7 dias de sintomas não apresentam diferenças na concentração viral infectante do SARS-CoV-2 e, assim, garantir a homogeneidade dos grupos clínicos infectados com COVID-19, fizemos uma análise comparativa da carga viral presente nos *swabs* dos indivíduos infectados apresentando diferentes formas clínicas de COVID-19. Considerando que, quanto maior é a concentração do vírus menos ciclos de RT-PCR (CT) serão necessários para a amplificação dos genes virais, observamos que não houve diferenças significativas entre os grupos clínicos avaliados (Fig. 17), ou seja, não houve qualquer interferência da concentração viral infectante com a gravidade da doença nas análises desses pacientes com COVID-19 nos quais o início dos sintomas ocorreu entre 1 a 7 dias antes do teste. Portanto, esta não foi uma variável relevante para determinar o desfecho clínico da doença. Resultado semelhante ao que foi observado por Lucas e colaboradores, analisando indivíduos infectados de uma população nos Estados Unidos da América (EUA), mostrando que as cargas virais entre indivíduos com COVID-19 leve, moderada e grave não apresentaram diferenças significativas (LUCAS *et al*, 2020). Esses dados obtidos em indivíduos de países e cidades diferentes sugerem que outras variáveis, tais como aquelas ligadas ao perfil imunológico dos indivíduos, podem ser mais relevantes que a carga viral para determinar o desfecho da COVID-19.

Com a população caracterizada e o DIS ideal padronizado (1-7 dias) para os objetivos do nosso estudo definido, foi possível explorar com maior acurácia as populações coletadas em cada centro e compará-las entre si.

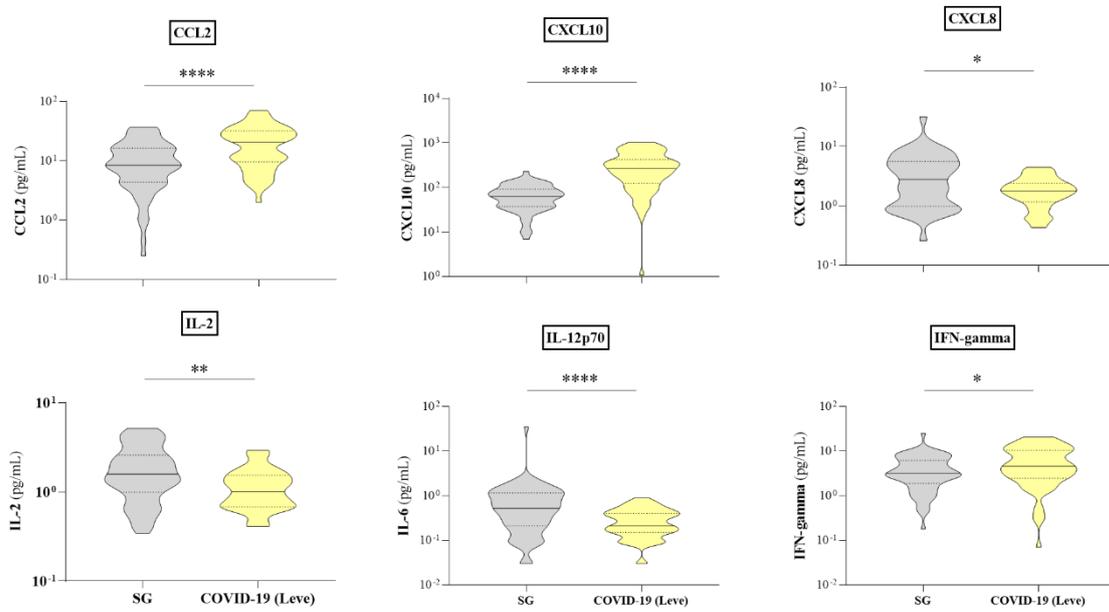
Como já discutido, a população brasileira se distribui em uma grande extensão territorial, formando áreas distintas que podem ser caracterizadas como endêmicas ou não endêmicas para determinadas doenças. Estudos prévios demonstraram que estas áreas configuram perfis imunológicos distintos em função da imunobiografia, que tornam estes indivíduos mais vulneráveis a determinadas condições, incluindo o *inflammaging* e o

envelhecimento biológico (SILVEIRA-NUNES *et al*, 2017; TORRES *et al*, 2018; BATISTA *et al*, 2020). A cidade de Governador Valadares, situada no estado de Minas Gerais, foi escolhida como um dos centros de coleta para realização deste estudo por ser considerada uma área endêmica para diversas doenças infecciosas (Esquistossomose, Leishmaniose, Hanseníase além de arboviroses como Dengue e Chikungunya) e pelos resultados anteriores do nosso grupo mostrando que os indivíduos que residem nessa cidade apresentam uma aceleração da senescência biológica medida pela metilação do DNA (DURSO *et al*, 2022). Nossa hipótese é que esses indivíduos, por estarem mais expostos a uma concentração maior e mais diversa de antígenos, teriam um perfil inflamatório mais acentuado, o que poderia torná-los mais susceptíveis à progressão clínica da COVID-19 para quadros mais graves. Ademais, os idosos dessas regiões endêmicas poderiam ser ainda mais vulneráveis. Sendo assim, comparamos os grupos clínicos em comum de cada cidade. Curiosamente, o grupo de indivíduos de São Paulo que integram o grupo COVID-19 (Leve), apresentou uma produção muito acentuada de mediadores quando comparado com as populações de Belo Horizonte e Governador Valadares. No entanto, é possível notar que a população de área endêmica também apresenta um grande aumento na produção dos mediadores (Fig. 18A). É importante ressaltar que não foi possível comparar grupos que apresentam uma forma clínica mais grave para COVID-19, porque não conseguimos coletar um n amostral suficiente na cidade de Governador Valadares.

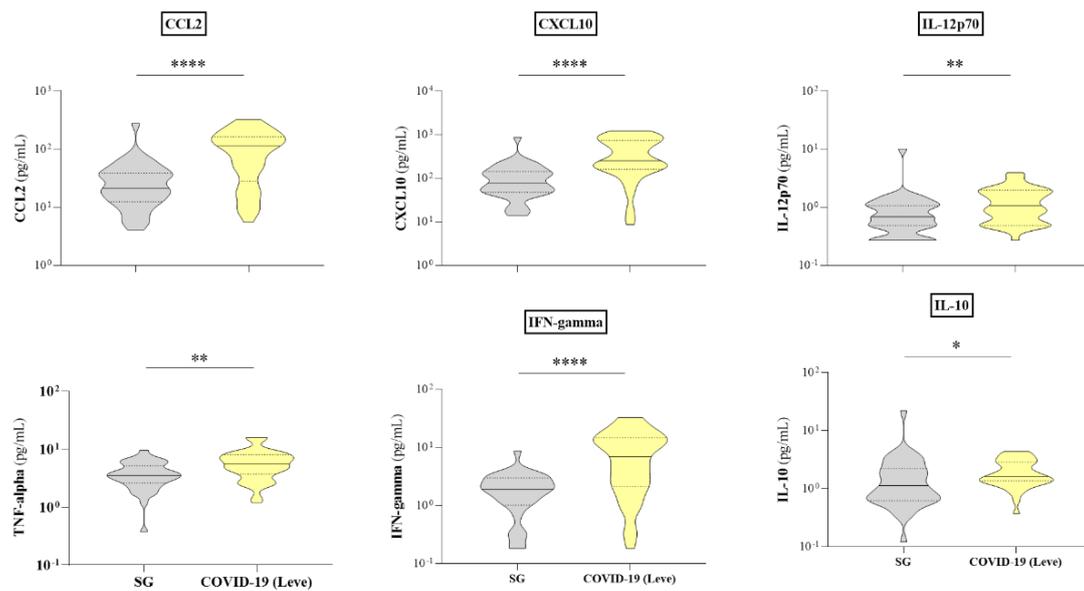
A



B



C



D

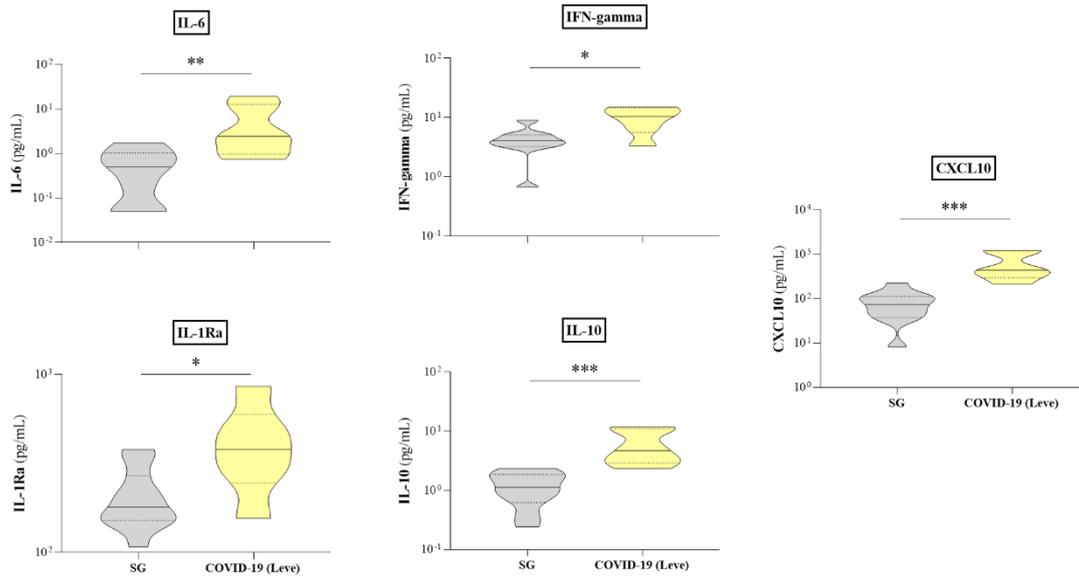


Figura 18: Comparação do Perfil Inflamatório dos Voluntários das 3 Cidades do Brasil. (A) Análise comparativa da frequência de altos produtores dos mediadores plasmáticos entre indivíduos com COVID-19 leve e síndrome gripal (SG) em Belo Horizonte ($n=155$, sendo SG $n=76$ e COVID-19 Leve $n=79$), Governador Valadares ($n=86$, sendo SG $n=44$ e COVID-19 Leve $n=42$) e São Paulo ($n=17$, sendo SG $n=11$ e COVID-19 Leve $n=6$). Os dados foram apresentados em gráficos de radar e expressos em percentual. (B) Análise das concentrações dos mediadores plasmáticos em indivíduos com COVID-19 e com síndrome gripal (SG) de Belo Horizonte divididos nos grupos SG ($n=76$) e COVID=19 Leve ($n=79$). (C) Análise das concentrações dos mediadores plasmáticos em indivíduos com COVID-19 e com síndrome gripal (SG) de Governador Valadares divididos nos grupos SG ($n=44$) e COVID=19 Leve ($n=42$). (D) Análise das concentrações dos mediadores plasmáticos em indivíduos com COVID-19 e com síndrome gripal (SG) de São Paulo divididos nos grupos SG ($n=11$) e COVID=19 Leve ($n=6$). Os dados foram apresentados em gráfico violino considerando que a mediana separa os quartis e o formato do violino é diretamente proporcional aos valores dos dados. As amostras foram previamente normalizadas e com *outliers* excluídos do n amostral, foi realizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. As linhas representam quais grupos foram comparados e asteriscos representam a significância estatística (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ ou **** $p < 0,0001$).

Alguns trabalhos propõem que a elevação nos níveis plasmáticos da quimiocina CXCL10 pode ser um preditor de gravidade da COVID-19, por esse mediador se mostrar bastante aumentado nos indivíduos com a doença grave (TAY *et al*, 2020; COPERCHINI *et al*, 2021^a; COPERCHINI *et al*, 2021^b; HUANG *et al*, 2020). No nosso estudo, observamos que a concentração de CXCL-10 está elevada no grupo COVID-19 quando comparada ao grupo SG (Fig. 17 e Fig. 18A). As análises estatísticas nas figuras 18B, 18C e 18D, demonstram que níveis plasmáticos elevados dessa quimiocina estão correlacionados com a COVID-19 em relação ao grupo não infectado, independente do centro de coleta. TAY e colaboradores relataram também a alta associação de determinados mediadores cuja concentração estaria elevada no plasma com a COVID-19: IL-6, IFN- γ , CCL2 e CXCL10, por exemplo (TAY *et al*, 2020; HUANG *et al*, 2020).

Onde observamos que a CXCL10 está presente nas 3 regiões e possui uma forte diferença estatística em cada região. Ademais, alguns trabalhos mostram ainda que outros mediadores, tais como IL-1Ra e IL-10 parecem apresentar a mesma associação (LUCAS *et al*, 2020; HUANG *et al*, 2020). Esse perfil “clássico” de alteração de mediadores plasmáticos na COVID-19 é observado nas populações das 3 cidades utilizadas como centros de recrutamento no nosso estudo (figuras 18B, 18C e 18D), entretanto, notamos alterações também nos níveis de CXCL8, molécula quimioatraente de neutrófilos. É importante destacar que TNF- α , muito relacionado com o perfil inflamatório do *inflammaging* (QINGWEI *et al*, 2013), está aumentado apenas na população que reside em área endêmica, assim como a IL-10. O papel da IL-10 na resposta imune contra infecções tem sido muito discutido na literatura. Alguns trabalhos mostram que sua elevação no plasma pode aumentar a susceptibilidade dos indivíduos para outras infecções, por se tratar de uma molécula com alto potencial anti-inflamatório (ARUNACHALAM *et al*, 2020; ZHAO *et al*. 2020). Em contrapartida, outros trabalhos discutem que a sua diminuição favorece o estabelecimento de um perfil inflamatório sendo esta uma característica ligada ao *inflammaging* e ao aumento da suscetibilidade à fragilidade em idosos (FRANCESCHI *et al*, 2018). Contudo, é possível concluir que a ação reguladora da IL-10 participa da modulação da inflamação e pode ser importante no controle da resposta imune evitando a evolução para quadros graves de doenças infecciosas. As análises dos grupos exibidos na figura 18 mostram um perfil inflamatório semelhante a este nos indivíduos com COVID-19, embora existam diferenças entre as 3 cidades.

A cidade de São Paulo tem certo destaque inflamatório nas 3 regiões, apresentando perfil mais intenso em comparação com as demais cidades, como já mencionado anteriormente. Além deste resultado demonstrar como a imunobiografia é diferente em 3 cidades de uma única região brasileira, esta diferença de perfil também poderia ser justificada pela maior interação dos indivíduos com poluentes (sobretudo do ar), maiores incidências de obesidade/sedentarismo e por determinados surtos infecciosos que acometeram esta população recentemente (GUARNIERI & BALMES, 2014).

Como nossa hipótese de trabalho é que o perfil mais inflamatório do idoso (*inflammaging*) estaria relacionado a desfechos clínicos mais graves da COVID-19, o próximo passo foi comparar os perfis de mediadores plasmáticos de indivíduos adultos (20-59 anos) e idosos (>60 anos). Considerando que houve o recrutamento de um *n*

amostral mais amplo de indivíduos idosos na população de Belo Horizonte e Governador Valadares, buscamos comparar os grupos clínicos distintos nessas duas cidades.

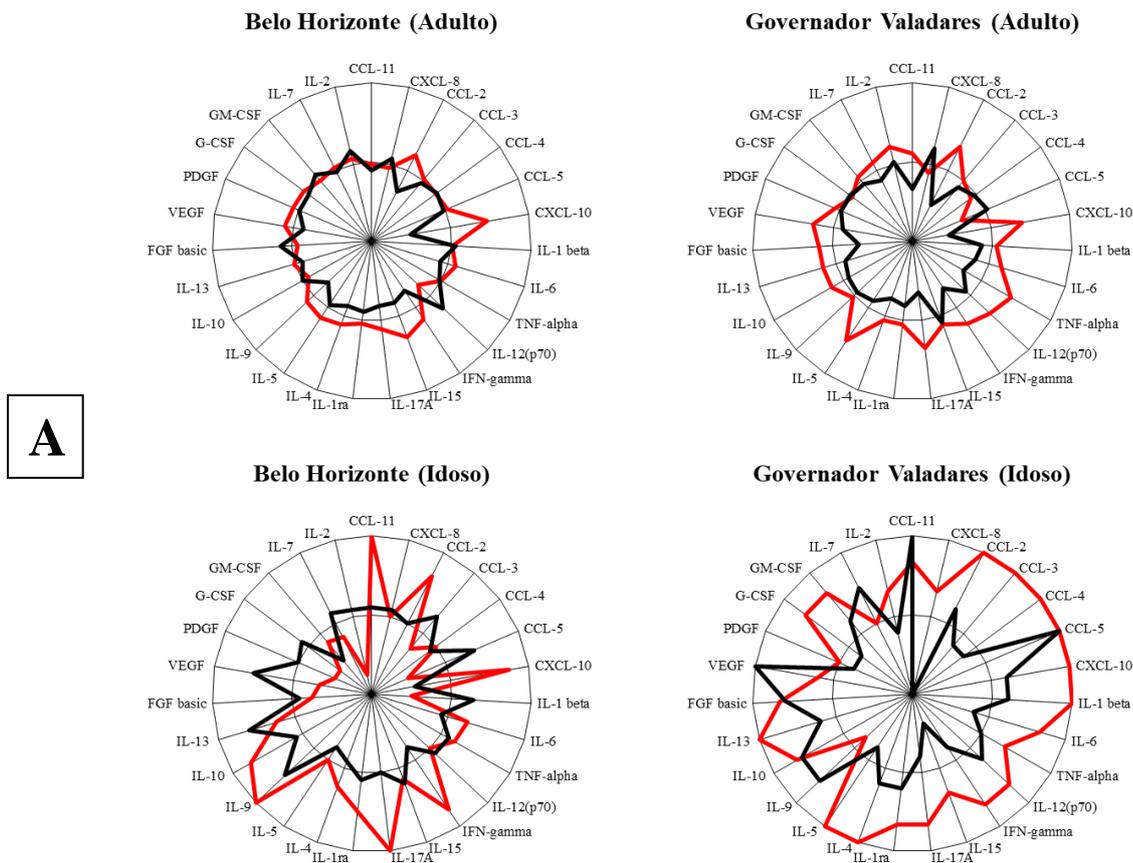


Figura 19: Comparação dos Indivíduos com COVID-19 de Área Endêmica (Governador Valadares) e Não Endêmica (Belo Horizonte) por Faixa Etária (Adultos e Idosos). (A) Análise comparativa da frequência de altos produtores dos mediadores entre indivíduos com COVID-19 em duas diferentes faixas etárias de indivíduos de Belo Horizonte (Adultos com $n=136$, sendo SG $n=65$ e COVID-19 Leve $n=71$ e idosos com $n=19$, sendo SG $n=11$ e $n=8$) e de Governador Valadares (Adultos com $n=75$, sendo SG $n=39$ e COVID-19 Leve $n=36$ e idosos com $n=11$, sendo SG $n=5$ e $n=6$) Os dados foram apresentados em gráficos de radar e expressos em percentual. As análises foram realizadas apenas estes dois centros em função do baixo número de indivíduos idosos coletados em São Paulo.

Observamos um perfil de baixa complexidade e maior especificidade nos indivíduos idosos (Fig. 19) e que os indivíduos não infectados de área endêmica apresentam um perfil inflamatório mais acentuado quando comparados com a população que não reside em área endêmica (Belo Horizonte). No grupo COVID-19 idoso, por sua vez, observamos a expressão de 100% de altos produtores em quase todas as quimiocinas e, também em IL-1 β , IL-4 e IL-13. Os idosos de Belo Horizonte também apresentam a expressão elevada de alguns mediadores tendo perfil de 100% de alto produtores, como

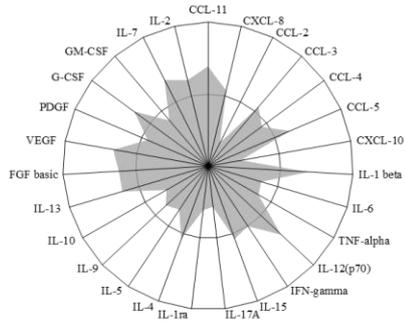
CCL11, IL-9 e IL-17A, porém apresentam um perfil bastante diferente dos idosos de área endêmica. Entretanto, fica evidente que os idosos parecem exibir um perfil mais inflamatório em relação aos adultos em ambas as cidades (Fig. 19).

Como os indivíduos de Governador Valadares apresentaram um perfil inflamatório muito mais exuberante (tanto no grupo adulto, quanto no idoso) quando comparados com aqueles de Belo Horizonte, concluímos que essa população representa um grupo com características bem distintas das demais analisadas neste estudo com relação ao seu *inflammaging*. De fato, em trabalho anterior realizado pelo nosso grupo comparando as idades biológicas versus a idade cronológica de coortes de Governador Valadares e São Paulo, mostramos que os indivíduos que residem nessa área endêmica para doenças infecciosas apresentam uma aceleração da idade epigenética quando comparados aos indivíduos de São Paulo. Além disto, o perfil de mediadores plasmáticos desses indivíduos também é distinto indicando que pode haver uma exacerbação do *inflammaging* nessa população (DURSO ET AL, 2022). Importante destacar que a CXCL10 é um alto produtor nos adultos e nos idosos que integram o grupo COVID-19 (Leve).

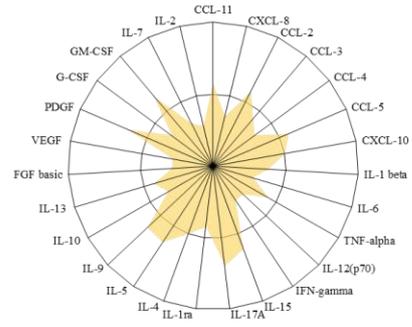
Infelizmente, não conseguimos um número amostral suficiente de indivíduos com as formas moderada e grave da COVID-19 em Governador Valadares para analisar o efeito do perfil inflamatório no desfecho clínico da COVID-19. Utilizamos as populações das áreas metropolitanas de Belo Horizonte e São Paulo para realizar esse tipo de análise (Fig. 20).

A

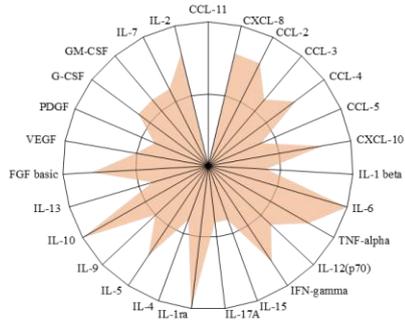
Síndrome Gripal - Belo Horizonte



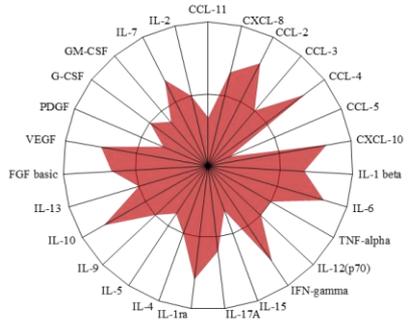
COVID-19 (Leve) - Belo Horizonte



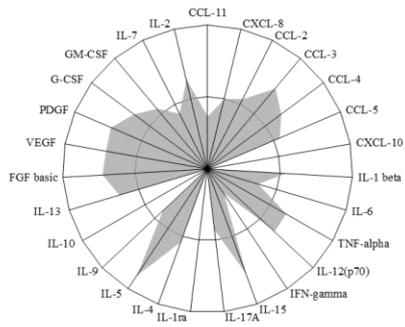
COVID-19 (Moderado) - Belo Horizonte



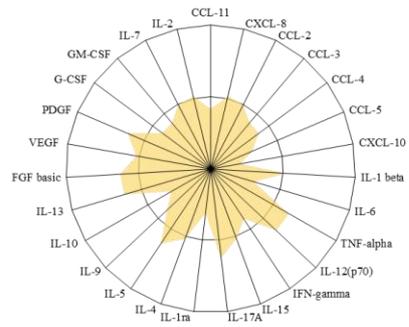
COVID-19 (Grave) - Belo Horizonte



Síndrome Gripal - São Paulo

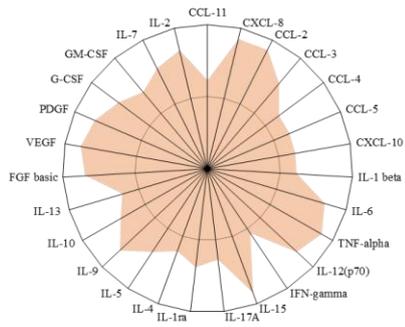


COVID-19 (Leve) - São Paulo

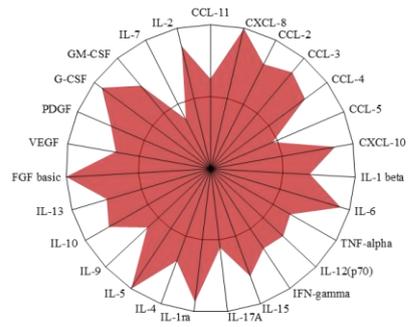


B

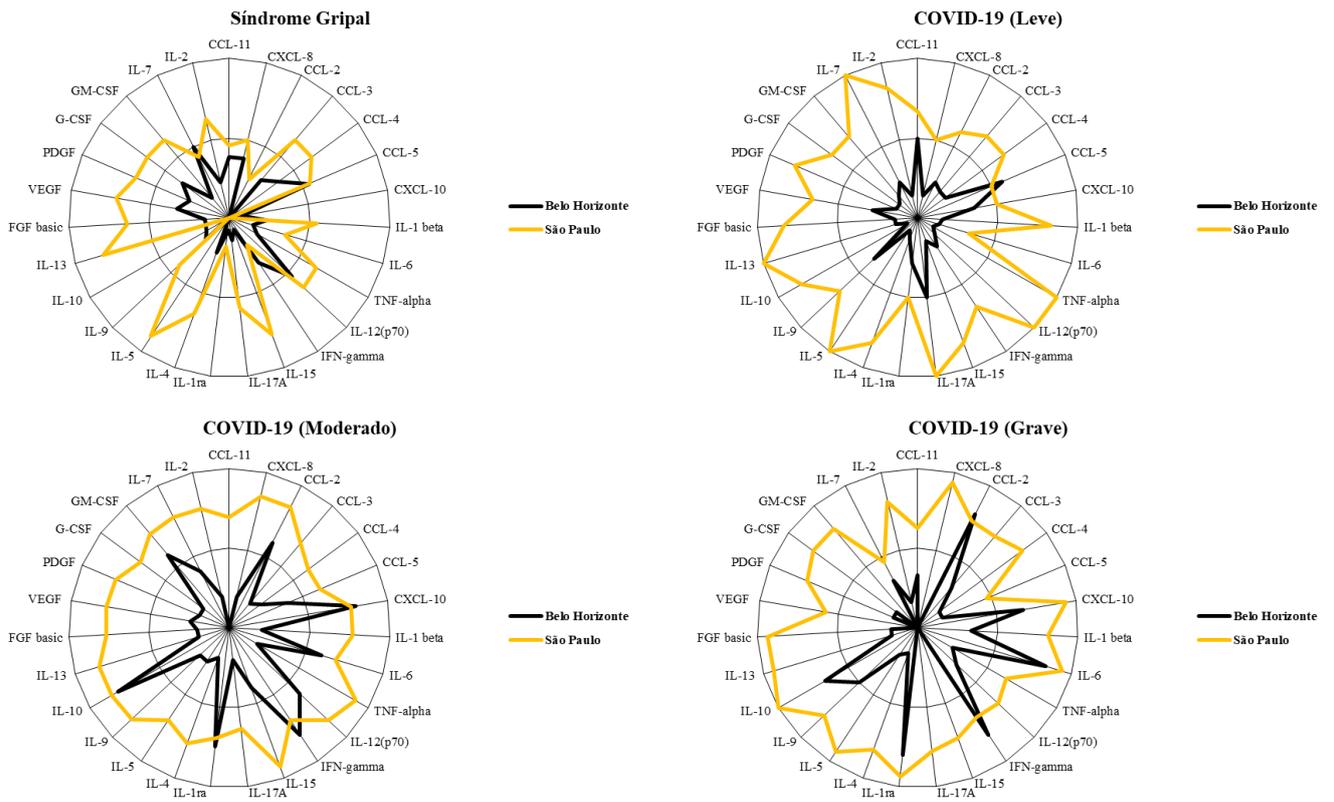
COVID-19 (Moderado) - São Paulo



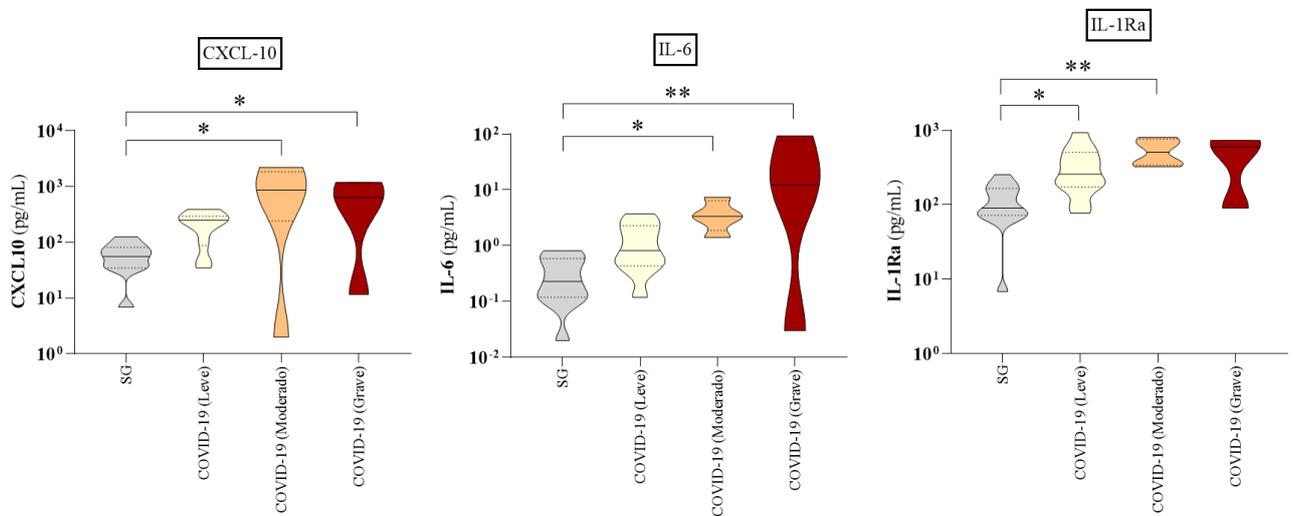
COVID-19 (Grave) - São Paulo



C



D



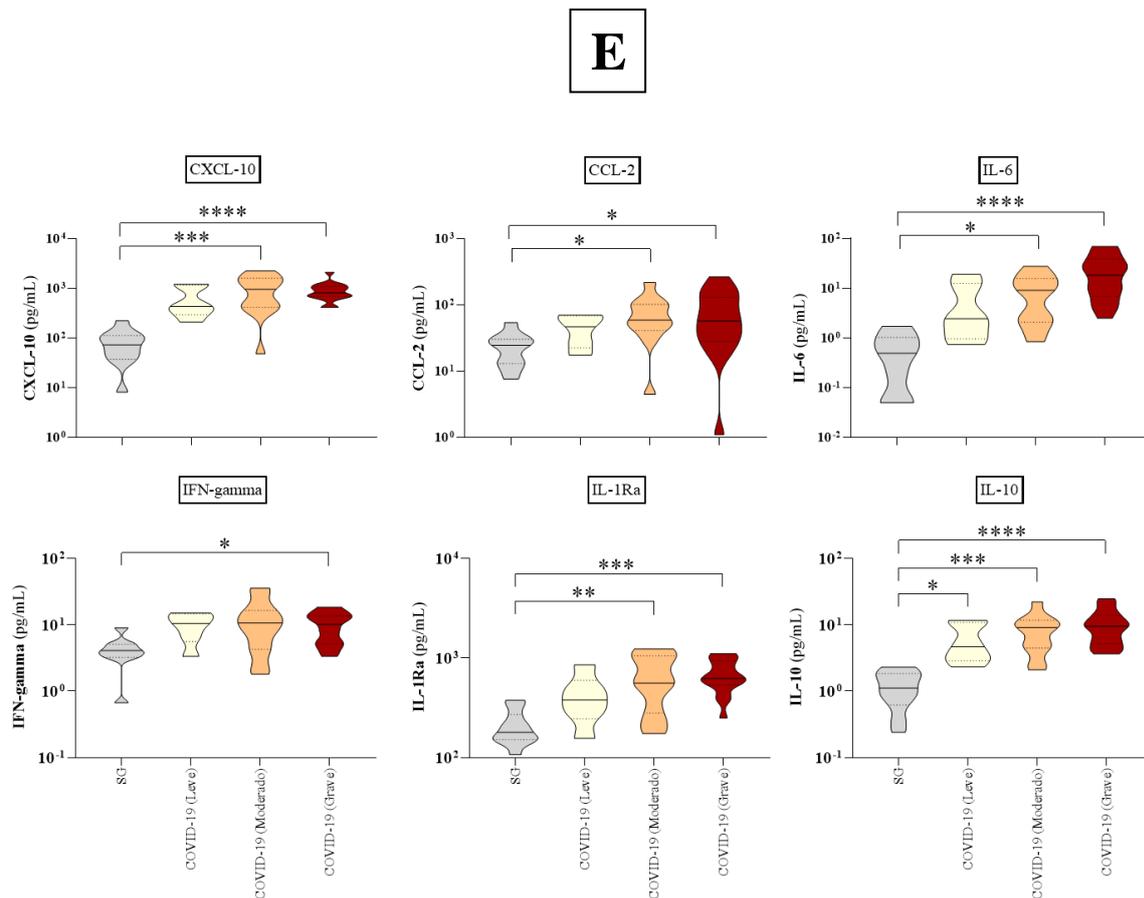


Figura 20: Relação do *Inflammaging* em Populações de Cidades Não Endêmicas (Belo Horizonte e São Paulo) no Desfecho da COVID-19. Todos os grupos foram devidamente pareados em sexo e idade para realização das análises. **(A)** Análise comparativa da frequência de altos produtores dos mediadores entre indivíduos infectados e não infectados com COVID-19, utilizando indivíduos de Belo Horizonte ($n=33$, sendo SG $n=12$ e COVID-19 Leve $n=12$, COVID-19 Moderado $n=5$ e COVID-19 Grave $n=4$). Os dados foram apresentados em gráficos de radar e expressos em percentual. **(B)** Análise comparativa da frequência de altos produtores dos mediadores entre indivíduos infectados e não infectados com COVID-19, utilizando indivíduos de São Paulo ($n=46$, sendo SG $n=11$ e COVID-19 Leve $n=6$, COVID-19 Moderado $n=13$ e COVID-19 Grave $n=16$). Os dados foram apresentados em gráficos de radar e expressos em percentual. **(C)** Análise comparativa da frequência de altos produtores dos mediadores entre indivíduos infectados e não infectados com COVID-19, utilizando indivíduos de Belo Horizonte (Mesma população da figura 20A) e de São Paulo (Mesma população da figura 20B). Os dados foram apresentados em gráficos de radar e expressos em percentual e demonstram as diferenças apresentadas entre as populações para cada grupo clínico. **(D)** Análise da concentração de mediadores plasmáticos em indivíduos com COVID-19 ou com síndrome gripal (SG). A população utilizada foi a população de Belo Horizonte, a mesma utilizada na figura 20A. **(E)** Análise das concentrações de mediadores plasmáticos em indivíduos com COVID-19 ou com síndrome gripal (SG). A população utilizada foi a população de São Paulo, a mesma utilizada na figura 20A. Os dados foram apresentados em gráfico violino considerando que a mediana separa os quartis e o formato do violino é diretamente proporcional aos valores dos dados. As amostras foram previamente normalizadas e com *outliers* excluídos do n amostral, foi realizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. As linhas foram utilizadas para representar quais grupos foram comparados e asteriscos para representar a significância estatística ($p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$ ou $**** p < 0,0001$).

Buscando relacionar a gravidade da doença, avaliamos apenas os grupos clínicos das cidades não endêmicas nos quais os indivíduos foram pareados por sexo e idade. Observamos que quanto mais grave é a forma clínica da doença, maior será a produção

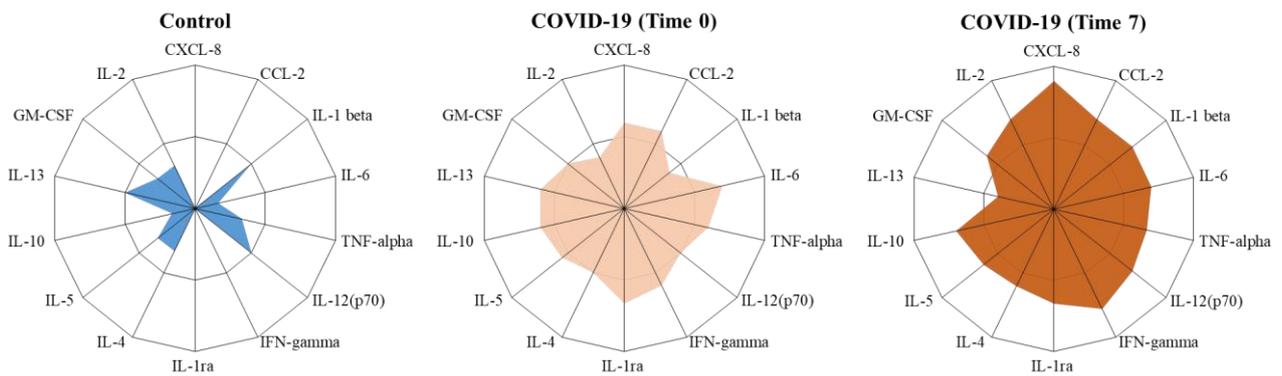
dos mediadores analisados, independentemente da cidade (Fig. 20A e Fig. 20B). Entretanto, quando a análise é feita comparando os grupos entre as cidades, a população analisada de São Paulo apresenta um perfil de produção de mediadores plasmáticos mais acentuado em todas as formas clínicas da COVID-19, mas não nos indivíduos com SG (Fig. 20C). Quando comparamos individualmente os mediadores plasmáticos, observamos que vários mediadores inflamatórios típicos do *inflammaging* e da inflamação que acompanha a COVID-19 se encontram significativamente mais aumentados nas formas moderada e grave da doença quando comparados com o grupo controle SG. Esses mediadores são: IL-6, IFN- γ , CCL2, CXCL10, IL-1Ra e IL-10 nos indivíduos de São Paulo e CXCL10, IL-6 e IL-1Ra nos indivíduos de Belo Horizonte (Fig. 20D e Fig. 20E), destaque para CXCL10 que, mais uma vez, tem forte destaque estatisticamente significativo em ambas as regiões e, parece acompanhar em proporção a gravidade da doença, intensificando nas formas mais graves da doença. A IL-1Ra, aparece mais uma vez alterando entre os grupos de maneira significativa, tendo em vista que o perfil inflamatório clássico da COVID-19 relatado na literatura inclui um aumento de IL-1 β , muito em função do aumento tardio de IL-1Ra o que contribuiria para o CS (LUCAS *et al*, 2020). Este aumento de IL-1Ra, poderia inclusive estar impedindo o aumento da expressão de IL-1 β na presente população. Entretanto, é importante ressaltar que o *n* amostral utilizado nestas análises não é capaz de confirmar uma influência do *inflammaging* com a COVID-19. Desta forma, é necessário que estudos com um *n* amostral mais significativo sejam realizados para que seja possível confirmar se de fato existe esta diferença e uma influência da doença com o *inflammaging*.

Ao todo, para o presente trabalho, 763 indivíduos foram recrutados. Entretanto, esses voluntários foram filtrados pela aplicação de critérios de inclusão e exclusão para garantir uma amostra mais homogênea e pareada por sexo e idade, por exemplo. Foi possível fazer algumas pequenas coortes que permitiram observações relevantes para complementar os dados sobre o perfil inflamatório da COVID-19.

Estudamos uma pequena coorte que coletamos de 10 pacientes que foram classificados como indivíduos moderados ou graves e que estavam hospitalizados no momento da coleta. Realizamos a coleta de sangue nesses indivíduos em dois tempos distintos, nos tempos 0 e 7 após admissão no hospital e recrutamento para o estudo. Vale ressaltar que essa coorte é uma exceção ao DIS entre 1 a 7 dias, apresentando uma maior variabilidade no DIS. Este estudo foi feito em colaboração com outro grupo que estudou apenas 14 mediadores diferentemente das demais análises que levaram em conta todos os

27 mediadores presentes no kit de Luminex. Observamos uma perda de correlação positiva da citocina IL-10 com a diminuição dos níveis dessa molécula no Tempo 7 (Fig. 21B). Esse dado, associado com a diminuição dos níveis de outras citocinas, sugere que está ocorrendo o controle ou resolução do processo inflamatório. A produção desse mediador anti-inflamatório pode também funcionar como um mecanismo de *feedback* para atenuar a inflamação impulsionada por moléculas inflamatórias como a IL-6, por exemplo. O trabalho já submetido que exhibe e discute os dados obtidos a partir deste estudo, correlacionando os dados obtidos com outros colaboradores se encontra presente no Anexo 10.

A



B



Figura 21: Análise Longitudinal da Produção de Mediadores Plasmáticos em Indivíduos com COVID-19 Hospitalizados em Belo Horizonte. Neste gráfico representamos uma coorte com 10

indivíduos com COVID-19 recrutados no Hospital Risoleta Tolentino Neves em Belo Horizonte que apresentavam dia de início de sintomas variável entre 4 a 14 dias, estavam hospitalizados e com sintomas moderados ou graves. O sangue foi coletado em 2 tempos (tempo 0 e tempo 7 após a o recrutamento e a admissão no hospital). O perfil inflamatório analisado foi composto de 14 mediadores dentro do painel de 27. **(A)** Análise comparativa da frequência de altos produtores dos mediadores entre indivíduos infectados e não infectados com COVID-19, utilizando indivíduos de Belo Horizonte ($n=12$, sendo Controle Negativo $n=5$ e COVID-19 $n=7$, nos tempos 0 e 7). Os dados foram apresentados em gráficos de radar e expressos em percentual. **(B)** Análise da correlação entre os mediadores do perfil. A força da correlação entre duas variáveis é representada pela cor do círculo na interseção dessas variáveis. As cores variam de azul escuro (forte correlação positiva, ou seja, $r^2 = 1,0$) a vermelho escuro (forte correlação negativa; ou seja, $r^2 = -1,0$). Os resultados não foram exibidos se $P < 0,05$.

Os pacientes com COVID-19 moderada/grave hospitalizados mostraram uma tendência de aumento genérico na produção de citocinas ao longo dos 7 dias (Fig. 21A), a exemplo da frequência de altos produtores de CXCL8 comumente elevada em pacientes com COVID-19 (COPERCHINI *et al.*, 2020; SALLENAVE & GUILLOT, 2020; HAZELDINE & LORD, 2021), sugerindo um aumento da resposta inflamatória ao longo de sete dias. Além disso, a matriz de correlação evidenciou maiores correlações entre os níveis de CCL2, IFN- γ e GM-CSF no tempo 7 (Fig. 21B). Esses mediadores estão implicados na resposta dos linfócitos T ao SARS-CoV-2, como: tráfego celular, produção de citocinas e replicação celular (COPERCHINI *et al.*, 2020; ARCANJO *et al.*, 2021). A perda do equilíbrio do corpo que leva ao adoecimento tem sido associada à perda de complexidade e dinâmica dos processos fisiológicos tais como a frequência cardíaca e respiratória e, a manutenção de um perfil equilibrado de mediadores inflamatórios no sangue (LIPSITZ, 2004). Observamos um processo semelhante de perda de complexidade na análise das correlações entre os mediadores examinados nesta coorte, com a redução de algumas correlações positivas e o surgimento de correlações negativas. Essas mudanças sugerem uma redução do equilíbrio e complexidade do balanço de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios produzidos por células imunes durante um processo infeccioso grave como a COVID-19.

Separamos outra coorte de pacientes infectados com COVID-19 com a forma leve da doença e que, durante o telemonitoramento, evoluíram para um estado mais grave e tiveram de ser hospitalizados. O n amostral foi de 10 pacientes com sintomas entre 1 a 7 dias pareados por sexo e idade. Este grupo nos chamou a atenção e esses indivíduos que evoluíram, denominados como EVO, foram comparados com o grupo de voluntários infectados com COVID-19 (Leve) (Fig. 22A). No início da doença, esses dois grupos de indivíduos poderiam ser semelhantes, sobretudo nos sinais e sintomas, entretanto, os pacientes EVO apresentaram, logo no início da COVID-19 (momento da coleta de

sangue), um perfil inflamatório semelhante ao dos indivíduos hospitalizados (Fig. 22A). As análises estatísticas demonstraram alterações em mediadores “clássicos” da COVID-19, como: IL-6, CXCL10 (mais uma vez se destaca tanto no grupo EVO, como no hospitalizado), IFN- γ e CCL2, com um aumento significativo destes nos grupos COVID-19 (Grave) e EVO em relação ao grupo SG. A única exceção foi IFN- γ cujos níveis estão aumentados apenas em relação ao grupo COVID-19 (Leve). A IL-12p70 foi o único mediador cujos níveis diminuíram em relação aos demais grupos (Fig. 22B). A diminuição da IL-12p70 é um resultado bastante interessante, tendo em vista que essa citocina é importante na indução da diferenciação de linfócitos T CD4⁺ (Th1) produtores de IFN- γ , sugerindo que a produção aumentada de IFN- γ estaria sendo proveniente de células inatas (HASAVAND, 2022). Essa semelhança corrobora na nossa hipótese de que o perfil inflamatório inicial dos indivíduos (provavelmente estabelecido antes da infecção pelo SARS-CoV-2) poderia ser fator determinante no desfecho da COVID-19. Ademais, no gráfico *heatmap* (Figura 22C) é possível observar mais uma vez como o CXCL10 se destaca nos grupos com COVID-19 (independente da forma clínica) e a IL-1Ra, que exhibe um aumento em todos os grupos, sobretudo nos indivíduos COVID-19 (Leve), indicando também uma possível regulação de IL-1 β no estágio inicial da doença, o que sugere um dos mecanismos de controle inflamatório que poderia estar fazendo estes indivíduos terem maior controle e resolverem a inflamação. Entretanto é importante ressaltar mais uma vez que o n amostral não é satisfatório para confirmarmos a veracidade da nossa hipótese.

C

	Síndrome Gripal	COVID-19 (Leve)	COVID-19 (Hospitalizado)	COVID-19 (EVO)
CCL-11				
CXCL-8				
CCL-2				
CCL-3				
CCL-4				
CCL-5				
CXCL-10				
IL-1 beta				
IL-6				
TNF-alpha				
IL-12(p70)				
IFN-gamma				
IL-15				
IL-17A				
IL-1ra				
IL-4				
IL-5				
IL-9				
IL-10				
IL-13				
FGF basic				
VEGF				
PDGF				
G-CSF				
GM-CSF				
IL-7				
IL-2				

Figura 22: Análise do Perfil Inflamatórios de Voluntários com COVID-19 Leve que Evoluíram Para a Forma Grave da Doença. Nesta análise foi utilizada uma coorte de pacientes infectados com COVID-19 que foram recrutados com 1 a 7 dias de sintomas apresentando sintomas leves durante a coleta de sangue; entretanto, tais pacientes evoluíram para o quadro grave da doença durante o telemonitoramento (14 dias) e foram hospitalizados. Os indivíduos selecionados para análise foram pareados por sexo e idade. **(A)** Análise comparativa da frequência de altos produtores dos mediadores plasmáticos de indivíduos de Belo Horizonte com COVID-19 ou com síndrome gripal (SG) ($n=46$, sendo SG $n=13$ e COVID-19 Leve $n=14$, COVID-19 Hospitalizado $n=12$ e COVID-19 EVO $n=7$). O grupo COVID-19 Hospitalizado é composto por indivíduos que foram hospitalizados com COVID-19 podendo ser moderados ou graves. Os dados foram apresentados em gráficos de radar e expressos em percentual e compararam os indivíduos EVO com o grupo COVID-19 Leve (Com quem este grupo em tese seria semelhante) e com o COVID-19 Hospitalizado (Com quem o grupo EVO, aparentemente, é mais semelhante). **(B)** Análise da concentração de mediadores plasmáticos dos indivíduos de Belo Horizonte com COVID-19 ou síndrome gripal (SG). Os dados foram apresentados em gráfico de violino considerando que a mediana separa os quartis e o formato do gráfico é diretamente proporcional aos valores dos dados. As amostras foram previamente normalizadas e com *outliers* excluídos do n amostral, foi realizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. As linhas foram utilizadas para representar quais grupos foram comparados e os asteriscos para representar a significância estatística ($*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$ ou $****p < 0,0001$). **(C)** O gráfico *heatmap* demonstra a mediana de cada mediador para cada grupo na escala de percentil (0 a 100%) a partir dos valores obtidos de cada mediador, onde quanto mais próximo a zero está representado em azul e quanto mais próximo de 100%, em vermelho. O branco representa 50%. É importante ressaltar que não há uma análise estatística entre os grupos.

B

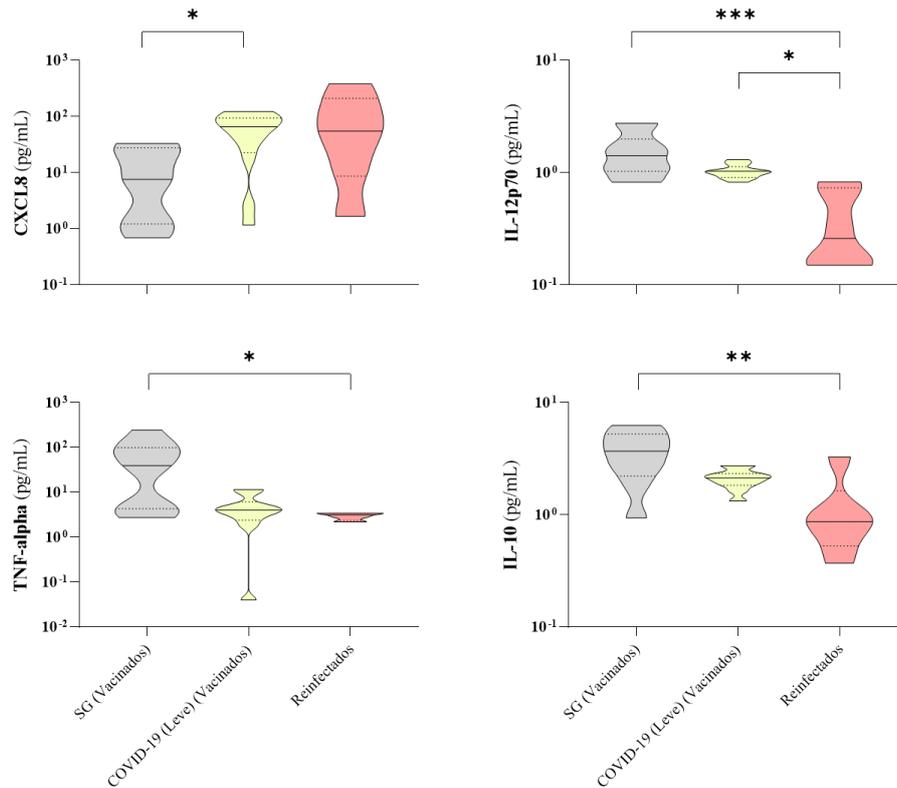


Figura 23: Comparação do Perfil Inflamatório de Indivíduos com COVID-19 e SG Vacinados e com COVID-19 Reinfectedados. Comparamos uma nova coorte de indivíduos de Belo Horizonte com síndrome gripal (SG) ou COVID-19 vacinados (com as vacinas Coronavac, Astrazeneca e Pfizer) com indivíduos com COVID-19 e que se apresentaram positivos nos ensaios sorológicos da doença, ou seja, que constituem um grupo de reinfectedados (não é possível dizer se seria a segunda infecção ou mais de duas). (A) Análise comparativa da frequência de altos produtores dos mediadores entre indivíduos infectados e não infectados com COVID-19, utilizando indivíduos de Belo Horizonte ($n=30$, sendo SG $n=11$ e COVID-19 Leve $n=13$, COVID-19 Reinfectedados $n=6$). Os dados foram apresentados em gráficos de radar e expressos em percentual. (B) Análise das concentrações de mediadores plasmáticos em indivíduos de Belo Horizonte com COVID-19 ou SG, seguindo os mesmos grupos da figura 23A. Os dados foram apresentados em gráfico de violino considerando que a mediana separa os quartis e o formato do violino é diretamente proporcional aos valores dos dados. As amostras foram previamente normalizadas e com *outliers* excluídos do n amostral, foi realizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. As linhas foram utilizadas para representar quais grupos foram comparados e os asteriscos para representar a significância estatística (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ ou **** $p < 0,0001$).

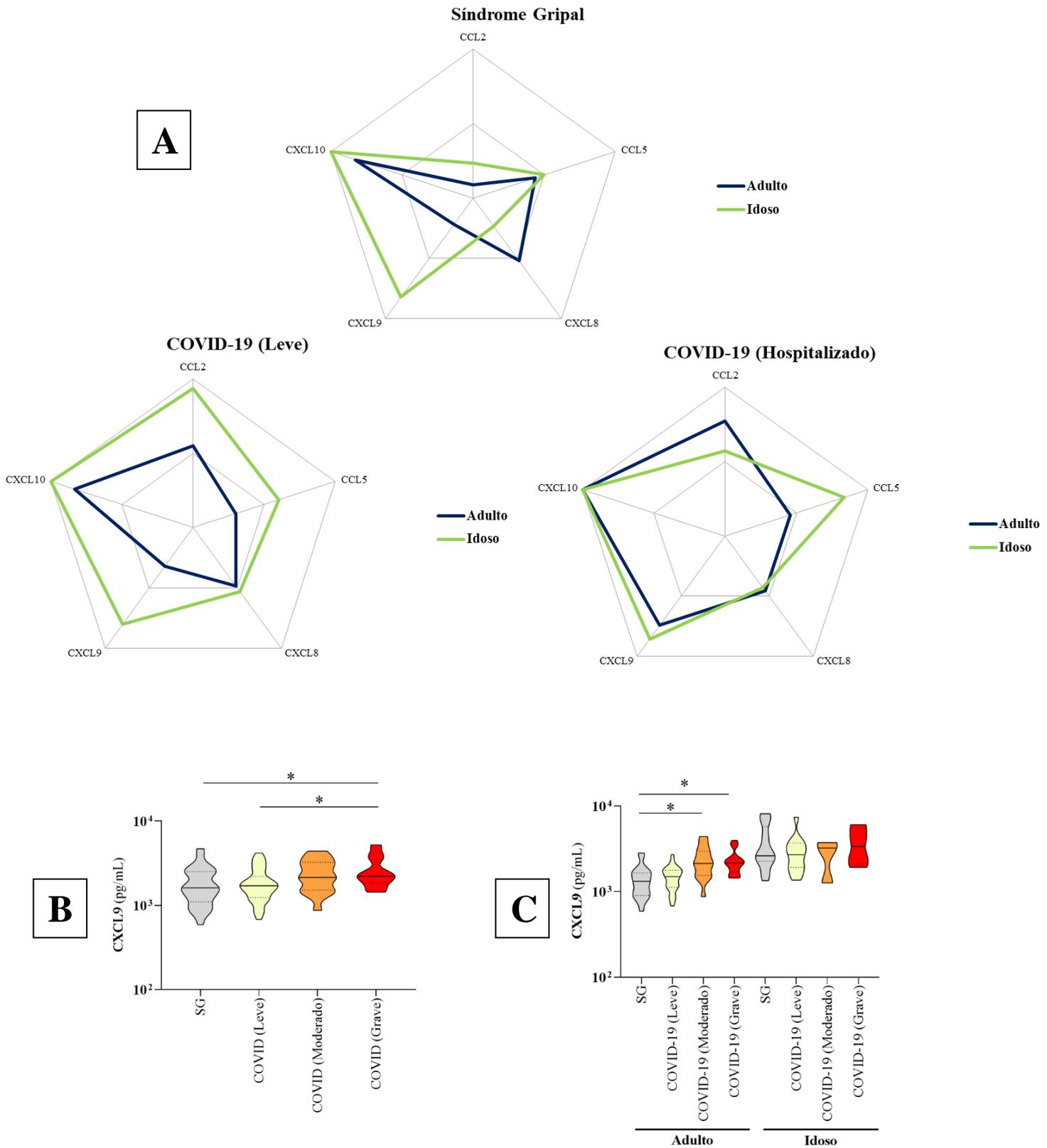


Figura 24: Análise das Concentrações de CXCL-9 em Indivíduos com COVID-19 de Belo Horizonte, São Paulo e Governador Valadares. (A) Análise comparativa da frequência de altos produtores das quimiocinas CCL2, CCL3, CXCL8, CXCL9, CXCL10 entre indivíduos infectados e não infectados com SARS-CoV-2 nas três cidades de recrutamento ($n=128$, sendo SG $n=40$ e COVID-19 Leve $n=46$, COVID-

19 Moderado $n=18$ e COVID-19 Grave $n=24$). Os dados foram apresentados em gráficos de radar e expressos em percentual. **(B)** Análise da concentração de CXCL9 em indivíduos infectados e não infectados com SARS-CoV-2 nas 3 cidades de recrutamento. Os dados foram apresentados em gráfico de violino considerando que a mediana separa os quartis e o formato do gráfico é diretamente proporcional aos valores dos dados. As amostras foram previamente normalizadas e com *outliers* excluídos do n amostral, foi realizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. As linhas foram utilizadas para representar quais grupos foram comparados e os asteriscos para representar a significância estatística (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ ou **** $p < 0,0001$). **(C)** Análise da concentração de CXCL9 em indivíduos infectados e não infectados com SARS-CoV-2 nas 3 cidades de recrutamento. Os indivíduos foram segregados em adultos (20 e 59 anos) e idosos (acima de 60 anos). Os dados foram apresentados em gráfico de violino considerando que a mediana separa os quartis e o formato do gráfico é diretamente proporcional aos valores dos dados. As amostras foram previamente normalizadas e com *outliers* excluídos do n amostral, foi realizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. As linhas foram utilizadas para representar quais grupos foram comparados e os asteriscos para representar a significância estatística (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ ou **** $p < 0,0001$).

Em 2021, Sayed e colaboradores publicaram um trabalho mostrando como alguns mediadores aumentavam significativamente com a idade e, que estes, poderiam funcionar como marcadores do envelhecimento. Entre estes, o CXCL9 foi o principal biomarcador da senescência. A partir desses mediadores que aumentavam no plasma gradativamente com o avançar da idade, esses autores constituíram um índice inflamatório que se correlacionava com a idade biológica dos indivíduos analisados (iAge) (SAYED *et al*, 2021). Interessantemente, outros trabalhos têm demonstrado que a quimiocina CXCL9 tem importância em diferentes perfis inflamatórios. Torres e colaboradores mostraram, em um estudo longitudinal com população brasileira residente na área endêmica de Bambuí, no estado de Minas Gerais, que os níveis da quimiocina CXCL9 também estavam significativamente aumentados com o envelhecimento (TORRES *et al*, 2018). Além disto, nessa mesma coorte, foi demonstrado que o aumento dos níveis de CXCL9 ocorria em todos os indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi* e que esse aumento era dependente da idade dos pacientes sendo maior nos idosos (DE ARAÚJO *et al*, 2020). Embora sejam dados que despertam interesse, pouco se sabe sobre a ação dessa quimiocina no processo inflamatório ou na rede de eventos que acompanha o envelhecimento. Decidimos investigar, então, se os níveis de CXCL9 estariam relacionados às formas clínicas da COVID-19 na nossa população. Observamos que tanto os níveis de CXCL9 como da CXCL10, estavam aumentados nos idosos independentemente do grupo ou da forma clínica da COVID-19 (Fig. 23A). Entretanto, os adultos hospitalizados com COVID-19 e que apresentam perfil mais grave da doença apresentaram aumento significativo de ambas as quimiocinas em níveis semelhantes àqueles encontrados nos idosos (Fig. 23A).

Observamos também que os indivíduos das 3 cidades não apresentaram diferenças significativas nos valores da CXCL9, porém, quando toda população estudada é analisada conjuntamente, existe um aumento de CXCL9 nos grupos COVID-19 moderado e grave em relação aos demais grupos (Fig. 23B). Quando analisamos essa mesma população de acordo com a faixa etária (dividida em adultos e idosos), a mesma diferença entre os grupos clínicos é observada apenas entre os adultos, provavelmente porque os idosos já apresentam níveis muito elevados de CXCL9 em todos os grupos clínicos em relação aos adultos, independentemente de estarem infectados ou não com SARS-CoV-2 (Fig. 23C). Estes dados estão em sintonia com os resultados publicados por Sayed *et al*, 2020 e nos permitem sugerir que o processo inflamatório associado ao envelhecimento (*inflammaging*), poderia contribuir para o processo inflamatório acentuado induzido pela COVID-19.

7 CONCLUSÕES

Podemos concluir que os mediadores CXCL8, CXCL10, CCL2, IL-6, IFN- γ , IL-12p70, IL-1Ra e IL-10 se destacaram como os mais importantes no quadro de inflamação “clássica” da COVID-19 nos indivíduos examinados no nosso estudo. A CXCL10, dentre todas, parece ser o biomarcador mais expressivo na doença, pelo menos na nossa população. Nossos dados também sugerem que os pacientes que evoluíram de uma forma clínica leve para a forma grave de COVID-19 apresentaram um perfil de mediadores plasmáticos diferenciado desde o início da doença, diferentemente de indivíduos infectados com a forma leve e que resolveram a inflamação. Isto sugere que esse perfil inflamatório inicial contribuiu para o desfecho grave da doença.

Apesar do *n* amostral pequeno de pacientes com as formas clínicas mais graves da COVID-19 em área endêmica (Governador Valadares), foi possível observar que esta população apresenta um perfil bem diferente das populações avaliadas em regiões não endêmicas (Belo Horizonte e São Paulo), tanto em adultos como em idosos.

Os idosos, assim como alguns grupos distintos, exibem um perfil inflamatório mais acentuado e relacionado ao *inflammaging*, o que poderia contribuir para o aumento na susceptibilidade desta população para a COVID-19.

O grupo síndrome gripal (SG), utilizado em nosso estudo como controle, nos permitiu observar que a COVID-19 tem diferenças importantes de outras síndromes

gripais. É interessante notar que os indivíduos com SG procuraram as unidades de saúde apresentando sintomas semelhantes aos indivíduos diagnosticados com COVID-19. No entanto, seu perfil inflamatório é bem distinto daqueles que foram positivos para a infecção por SARS-CoV-2. A inclusão deste grupo é um diferencial importante do nosso estudo. Infelizmente, não foi possível incluir um grupo controle negativo saudável, já que os indivíduos recrutados nesse grupo (sem a doença e não vacinados) se revelaram um grupo muito específico de indivíduos com características que não puderam ser pareadas com aquelas dos nossos grupos de estudo.

O aumento dos níveis plasmáticos de CXCL9 já foi descrito como biomarcador importante do envelhecimento. Nosso estudo confirmou esse dado em populações brasileiras e revelou, entretanto, que o aumento de CXCL10, além de estar muito associado com a gravidade da COVID-19, pode estar exibindo o mesmo comportamento da CXCL9 nos idosos. Entretanto, é necessário que mais estudos sejam realizados para entender as ações e atividades funcionais exercidas pela CXCL9 e CXCL-10 durante a infecção pelo SARS-CoV-2.

LIMITAÇÕES:

1. Não foi possível recrutar um número adequado de pacientes com a forma leve de COVID-19 em São Paulo e com as formas moderada/grave de COVID-19 em Governador Valadares;
2. Não foi possível recrutar indivíduos negativos para COVID-19 sem comorbidades para integrarem o grupo controle do estudo;
3. Para alguns voluntários (sobretudo os pacientes com a forma leve de COVID-19 que foram internados após piora da evolução clínica), não foi possível coletar os dados de prontuário, prejudicando a classificação clínica completa destes.

PERSPECTIVAS:

1. Avaliar a ação dos mediadores CXCL9 e CXCL10 em camundongos adultos (8 semanas de idade) e idosos (60 semanas de idade) portadores do receptor ACE2 humano nas células epiteliais infectados com SARS-CoV-2 e tratados com anticorpos monoclonais anti-CXCL9 e anti-CXCL10, em experimentos independentes;
2. Avaliar o perfil de senescência das células de pacientes com COVID-19 com formas clínicas distintas e residentes em Belo Horizonte-MG, Governador Valadares-MG e São Paulo-SP, assim como os perfis celulares predominantes de células B, T e NK;
3. Avaliar o grau de metilação do DNA de indivíduos de Belo Horizonte-MG, Governador Valadares-MG e São Paulo-SP com o intuito de se avaliar a senescência celular e o relógio biológico de Horvath destes indivíduos. Comparar o perfil inflamatório desses indivíduos com os resultados obtidos;
4. Realizar uma análise sorológica ampla de possíveis infecções prévias apresentadas pelos voluntários do estudo, com o intuito de caracterizar melhor tanto os indivíduos com COVID-19 quanto aqueles do grupo síndrome gripal;
5. Estudar, separadamente, o perfil inflamatório associado à COVID-19 nos indivíduos convivendo com HIV (que sabidamente sofrem um processo de aceleração da senescência), que foram excluídos do presente estudo, e comparar os resultados obtidos.

REFERÊNCIAS:

- Aiello A., Farzaneh F, Candore G, Caruso C, Davinelli S, Gambino CM, et al. Immunosenescence and its hallmarks: How to oppose aging strategically? A review of potential options for therapeutic intervention. *Front Immunol.* 2019;10:1-19.
- Ajay Handa, Sahajal Dhooria, Inderpaul Singh Sehgal, & Ritesh Agarwal. (2018). Primary cavitary sarcoidosis: A case report, systematic review, and proposal of new diagnostic criteria. *Lung India*, 35(1), 41–46. <https://doi.org/10.4103/lungindia.lungindia>
- Al., L. et. (2020). *Ann Oncol, January*, 19–21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8057862/>
- Al-samkari, H., Leaf, R. S. K., Dzik, W. H., Carlson, J. C. T., Fogerty, A. E., & Waheed, A (2020). COVID-19 and Coagulation: bleeding and Thrombotic Manifestations of SARS-CoV-2 Infection. *Blood*, 136 (4). <https://doi.org/10.1182/blood.2020006520>.
- Alturki, S. O., Alturki, S. O., Connors, J., Cusimano, G., Kutzler, M. A., Izmirly, A. M., & Haddad, E. K. (2020). The 2020 Pandemic: Current SARS-CoV-2 Vaccine Development. *Frontiers in Immunology*, 11(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01880>
- Annweiler, C., Beaudenon, M., Gautier, J., Simon, R., & Dubée, V. (2020). *COvid-19 and high-dose VITamin D supplementation TRIAL in high-risk older patients (COVIT-TRIAL): study protocol for a randomized controlled trial.* 1–10.
- Antonelli, A., Ferrari, S. M., Fallahi, P., Ghiri, E., Crescioli, C., Romagnani, P., Vitti, P., Serio, M., & Ferrannini, E. (2010). Interferon-alpha, -beta and -gamma induce CXCL9 and CXCL10 secretion by human thyrocytes: Modulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Cytokine*, 50(3), 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.01.009>
- Anvisa, & Organização Mundial de Saúde. (2009). *Regulamento Sanitário Internacional - RSI 2005. Versão em português aprovada pelo Congresso Nacional por meio do Decreto Legislativo 395/2009, publicado no DOU de 10/07/09, pág. 11.* 1–79.
- Araújo, F. F. De, Cecília, K., Torres, L., Peixoto, S. V., Luiz, A., Ribeiro, P., Vaz, J., Mambrini, M., Rezende, V. B., Luiza, M., Silva, L., Ignácio, A., Filho, L., Teixeira-carvalho, A., Lima-costa, M. F., & Martins-filho, O. A. (2020). *CXCL9 and CXCL10 display an age-dependent profile in Chagas patients: a cohort study of aging in Bambuí, Brazil.* 1–10.
- Arend, W. P. (2002). The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 13(4–5), 323–340. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(02\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(02)00020-5)
- Aspinall, R., Pitts, D., Lapenna, A., & Mitchell, W. (2010). Immunity in the Elderly: The Role of the Thymus. *Journal of Comparative Pathology*, 142(SUPPL. 1), S111–S115. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.10.022>
- Babcock, G. J., Eshaki, D. J., Thomas, W. D., & Ambrosino, D. M. (2004). Amino Acids 270 to 510 of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein Are Required for Interaction with Receptor. *Journal of Virology*, 78(9), 4552–4560. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.9.4552-4560.2004>
- Balkwill, F. (2006). TNF- α in promotion and progression of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(3), 409–416. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-9005-3>
- Bartholomeusz, A., & Locarnini, S. (2006). Associated With Antiviral Therapy. *Antiviral Therapy*, 55(November 2005), 52–55. <https://doi.org/10.1002/jmv>
- Basisty, N., Kale, A., Jeon, O. H., Kuehnemann, C., Payne, T., Rao, C., Holtz, A., Shah, S., Sharma, V., Ferrucci, L., Campisi, J., & Schilling, B. (2020). A proteomic atlas of senescence-associated

- secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biology*, 18(1), e3000599. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000599>
- Batista, M. A., Calvo-Fortes, F., Silveira-Nunes, G., Camatta, G. C., Speziali, E., Turrone, S., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O. A., Neretti, N., Maioli, T. U., Santos, R. R., Brigidi, P., Franceschi, C., & Faria, A. M. C. (2020). Inflammaging in Endemic Areas for Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*, 11(November), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.579972>
- Belkina, A. C., Starchenko, A., Drake, K. A., Proctor, E. A., Pihl, R. M. F., Olson, A., Lauffenburger, D. A., Lin, N., & Snyder-Cappione, J. E. (2018). Multivariate Computational Analysis of Gamma Delta T Cell Inhibitory Receptor Signatures Reveals the Divergence of Healthy and ART-Suppressed HIV+ Aging. *Frontiers in Immunology*, 9(December), 2783. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02783>
- Biagi, E., Franceschi, C., Rampelli, S., Severgnini, M., Ostan, R., Turrone, S., Consolandi, C., Quercia, S., Scurti, M., Monti, D., Capri, M., Brigidi, P., & Candela, M. (2016). Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Current Biology*, 26(11), 1480–1485. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.016>
- Birch, J., & Gil, J. (2020). Senescence and the SASP: Many therapeutic avenues. *Genes and Development*, 34(23–24), 1565–1576. <https://doi.org/10.1101/gad.343129.120>
- Boyman, O., & Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 12(3), 180–190. <https://doi.org/10.1038/nri3156>
- Brasil. Ministério da Saúde do Brasil, 2022. Site: <https://www.gov.br/saude/pt-br>
- Bridges, C. B., Lim, W., Hu-Primmer, J., Sims, L., Fukuda, K., Mak, K. H., Rowe, T., Thompson, W. W., Conn, L., Lu, X., Cox, N. J., & Katz, J. M. (2002). Risk of influenza A (H5N1) infection among poultry
- Bridges, C. B., Lim, W., Hu-Primmer, J., Sims, L., Fukuda, K., Mak, K. H., Rowe, T., Thompson, W. W., Conn, L., Lu, X., Cox, N. J., Katz, J. M., Scholtissek, C., Rohde, W., Von Hoyningen, V., & Rott, R. (1978). On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology*, 87(1), 13–20. <https://doi.org/10.1086/340044>
- Brown, M. A., & Hural, J. (2017). Functions of IL-4 and control of its expression. *Critical Reviews in Immunology*, 37(2–6), 181–212. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v37.i2-6.30>
- Brown, O. A., Sosa, Y. E., Dardenne, M., Pléau, J. M., & Goya, R. G. (1999). Growth hormone-releasing activity of thymulin on pituitary somatotropes is age dependent. *Neuroendocrinology*, 69(1), 20–27. <https://doi.org/10.1159/000054399>
- Candela, M., Biagi, E., Brigidi, P., O’Toole, P. W., & De Vos, W. M. (2014). Maintenance of a healthy trajectory of the intestinal microbiome during aging: A dietary approach. *Mechanisms of Ageing and Development*, 136–137, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.12.004>
- Cardano, M., Buscemi, G., & Zannini, L. (2022). iScience II Sex disparities in DNA damage response pathways : Novel determinants in cancer formation and therapy. *ISCIENCE*, 25(3), 103875. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103875>
- Cevenini, E., Invidia, L., Lescai, F., Salvioli, S., Tieri, P., Castellani, G., & Franceschi, C. (2008). Human models of aging and longevity. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8(9), 1393–1405. <https://doi.org/10.1517/14712598.8.9.1393>
- Chang, S., & Lee, H. (2019). ScienceDirect Vitamin D and health - The missing vitamin in humans. *Pediatrics and Neonatology*, xxx. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2019.04.007>

- Chen, Y., Qiao, S., Tuckermann, J., Okret, S., & Jondal, M. (2010). Thymus-derived glucocorticoids mediate androgen effects on thymocyte homeostasis. *The FASEB Journal*, 24(12), 5043–5051. <https://doi.org/10.1096/fj.10.168724>
- Cheng, L., Li, H., Li, L., Liu, C., Chen, H., & Li, Y. (2020). *Ferritin in the coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis*. September, 1–18. <https://doi.org/10.1002/jcla.23618>
- Chin, T. D., Foley, J. F., Doto, I. L., Gravelle, C. R., & Weston, J. (1960). Morbidity and mortality characteristics of Asian strain influenza. *Public Health Reports*, 75(2), 148–158. <https://doi.org/10.2307/4590751>
- Choi, K. E., Kim, J. M., Rhee, J., Park, A. K., Kim, E. J., & Kang, N. S. (2021). Molecular dynamics studies on the structural characteristics for the stability prediction of sars-cov-2. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22168714>
- Clark, I. A. (1982). Suggested importance of monokines in pathophysiology of endotoxin shock and malaria. *Klinische Wochenschrift*, 60(14), 756–758. <https://doi.org/10.1007/BF01716573>
- Clark, I. A., Virelizier, J. L., Carswell, E. A., & Wood, P. R. (1981). Possible importance of macrophage-derived mediators in acute malaria. *Infection and Immunity*, 32(3), 1058–1066. <https://doi.org/10.1128/iai.32.3.1058-1066.1981>
- Cockburn, W. C., Delon, P. J., & Ferreira, W. (1969). Origin and progress of the 1968-69 Hong Kong influenza epidemic. *Bulletin of the World Health Organization*, 41(3), 345–348.
- Cohen AA, Legault V, Fülöp T. What if there's no such thing as "aging"? Mech Ageing Dev. 2020 Dec; 192:111344. doi: 10.1016/j.mad.2020.111344. Epub 2020 Sep 16. PMID: 32949595.
- Coperchini, F., Chiovato, L., & Rotondi, M. (2021^a). Interleukin-6, CXCL10 and Infiltrating Macrophages in COVID-19-Related Cytokine Storm: Not One for All But All for One! *Frontiers in Immunology*, 12(April), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.668507>
- Coperchini, F., Chiovato, L., Ricci, G., Croce, L., & Magri, F. (2021^b) The cytokine storm in COVID-19: Further advances in our understanding the role of specific chemokines involved. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 58 (2021) 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.12.005>
- Cosar, B., Yagmur, Z., Unal, S., & Turan, A. (2020).. *Cytokine and Growth Factor Reviews SARS-CoV-2 Mutations and their Viral Variants*.
- Croce, M., Damonte, P., Morini, M., Pigozzi, S., Chiossone, L., Vacca, P., Bronte, V., Barbieri, O., & Astigiano, S. (2020). Increased Arginase 1 expression in tumor microenvironment promotes mammary carcinogenesis via multiple mechanisms. *Carcinogenesis*, 41(12), 1695–1702. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgaa063>
- Declercq, J., Damme, K. F. A. Van, Leeuw, E. De, Maes, B., Bosteels, C., Tavernier, S. J., & Buyser, S. De. (2020). Effect of anti-interleukin drugs in patients with COVID-19 and signs of cytokine release syndrome (COV-AID): a factorial, randomised, controlled trial. *The Lancet Respiratory Med*. 9(12):1427-1438. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00377-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00377-5).
- D Isaacson, J L Mueller, J. C. N. and S. S. (2006). NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.06.011>.Immune
- Davies, D. A., Adlimoghaddam, A., & Albeni, B. C. (2021). The Effect of COVID - 19 on NF - κB and Neurological Manifestations of Disease. *Molecular Neurobiology*, 4178–4187. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02438-2>

- De Martinis, M., Sirufo, M. M., & Ginaldi, L. (2017). Allergy and aging: An Old/new emerging health issue. *Aging and Disease*, 8(2), 162–175. <https://doi.org/10.14336/AD.2016.0831>
- De Martinis, M., Sirufo, M. M., Viscido, A., & Ginaldi, L. (2019). Food allergies and ageing. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms20225580>
- Deutsch, C. K., Shell, A. R., Francis, R. W., & Bird, B. D. (2012). The Farkas system of craniofacial anthropometry: Methodology and normative databases. *Handbook of Anthropometry: Physical Measures of Human Form in Health and Disease*, 561–573. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1788-1_29
- Dhillon, N. K., Peng, F., Ransohoff, R. M., & Buch, S. (2007). PDGF Synergistically Enhances IFN- γ -Induced Expression of CXCL10 in Blood-Derived Macrophages: Implications for HIV Dementia. *The Journal of Immunology*, 179(5), 2722–2730. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.2722>
- Dries D.L., Exner D.V., Gersh B. J., Cooper, H. A., Carson, P. E., Domanski, M. J. Domanski (1999). Racional diferences in the outcome of left ventricular dysfunction. 340 (8) 609–616. <https://doi.org/10.1056/NEJM199902253400804>.
- Dominguez-Cherit, G., Lapinsky, S. E., Macias, A. E., Torre, A. De, Poblano-morales, M., Baltazar-torres, J. A., Bautista, E., Martinez, M. A., Stewart, T. E., Fowler, R. A., & Epi, M. S. (2009). 2009 Influenza A (H1N1) in Mexico. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 302(17), 1880–1887.
- Dugan, H. L., Henry, C., & Wilson, P. C. (2020). Aging and influenza vaccine-induced immunity. *Cellular Immunology*, 348, 103998. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.103998>
- Eslamifar, Z., Behzadifard, M., Soleimani, M., & Behzadifard, S. (2020). *Coagulation abnormalities in SARS-CoV-2 infection : overexpression tissue factor*. 20–23.
- Elliott, M. L., Caspi, A., Houts, R. M., Ambler, A., Broadbent, J. M., Hancox, R. J., Harrington, H., Hogan, S., Keenan, R., Knodt, A., Leung, J. H., Melzer, T. R., Purdy, S. C., Ramrakha, S., Richmond-Rakerd, L. S., Righarts, A., Sugden, K., Thomson, W. M., Thorne, P. R., ... Moffitt, T. E. (2021). Disparities in the pace of biological aging among midlife adults of the same chronological age have implications for future frailty risk and policy. *Nature Aging*, 1(3), 295–308. <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00044-4>
- Forster, P., Forster, L., Renfrew, C., & Forster, M. (2020). Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(17), 9241–9243. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004999117>
- Fouchier, R. A. M., Kuiken, T., Schutten, M., Van Amerongen, G., Van Doornum, G. J. J., Van Den Hoogen, B. G., Peiris, M., Lim, W., Stöhr, K., & Osterhaus, A. D. M. E. (2003). Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature*, 423(6937), 240. <https://doi.org/10.1038/423240a>
- Fox, E. (2021). *Epidemiology of Heart Failure Stages Aged Black People in the Community : Prevalence and Prognosis in the Atherosclerosis Risk in Communities*. 1–13. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.016524>
- Franceschi, C. (1989). Cell proliferation, cell death and aging. *Aging Clinical and Experimental Research*, 1(1), 3–15. <https://doi.org/10.1007/BF03323871>
- Franceschi, C. (2007). Inflammaging as a Major Characteristic of Old People: Can It Be Prevented or Cured? *Nutrition Reviews*, 65(SUPPL.3), 12–15. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00358.x>
- Franceschi, C., & Bonafè, M. (2003). Centenarians as a model for healthy aging. *Biochemical Society Transactions*, 31(2), 457–461. <https://doi.org/10.1042/BST0310457>

- Franceschi, C., & Campisi, J. (2014). Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 69, S4–S9. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu057>
- Franceschi, C., & Campisi, J. (2014). Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 69, S4–S9. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu057>
- Franceschi, C., & Cossarizza, A. (1995). Introduction: The reshaping of the immune system with age. *International Reviews of Immunology*, 12(1), 1–4. <https://doi.org/10.3109/08830189509056697>
- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., & De Benedictis, G. (2000). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908, 244–254. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>
- Franceschi, C., Garagnani, P., Morsiani, C., Conte, M., Santoro, A., Grignolio, A., Monti, D., Capri, M., & Salvioli, S. (2018). The continuum of aging and age-related diseases: Common mechanisms but different rates. *Frontiers in Medicine*, 5(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00061>
- Franceschi, C., Garagnani, P., Parini, P., Giuliani, C., & Santoro, A. (2018). Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(10), 576–590. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0059-4>
- Franceschi^a, C., Monti, D., Barbieri, D., Grassilli, E., Troiano, L., Salvioli, S., Negro, P., Capri, M., Guido, M., Azzi, R., Sansoni, P., Paganelli, R., Fagiolo, U., Baggio, G., Donazzan, S., Mariotti, S., D’addato, S., Gaddi, A., Ortolani, C., & Cossarizza, A. (1995). Immunosenescence in humans: Deterioration or remodelling? *International Reviews of Immunology*, 12(1), 57–74. <https://doi.org/10.3109/08830189509056702>
- Franceschi^b, C., Monti, D., Sansoni, P., & Cossarizza, A. (1995). The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunology Today*, 16(1), 12–16. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80064-6](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80064-6)
- Franceschi, C., Salvioli, S., Garagnani, P., de Eguileor, M., Monti, D., & Capri, M. (2017). Immunobiography and the heterogeneity of immune responses in the elderly: A focus on inflammaging and trained immunity. *Frontiers in Immunology*, 8(AUG), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00982>
- Franceschi, C., Valensin, S., Bonafè, M., Paolisso, G., Yashin, A. I., Monti, D., & De Benedictis, G. (2000). The network and the remodeling theories of aging: Historical background and new perspectives. *Experimental Gerontology*, 35(6–7), 879–896. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00172-8](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00172-8)
- Franceschi, C., Zaikin, A., Gordleeva, S., Ivanchenko, M., Bonifazi, F., Storci, G., & Bonafè, M. (2018). Inflammaging 2018: An update and a model. *Seminars in Immunology*, 40(November), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.10.008>
- Fülöp T, Witkowski JM, Olivieri F, Larbi A. The integration of inflammaging in age-related diseases. *Semin Immunol*. 2018a;40:17-35.
- Fulop, T., Larbi, A., Dupuis, G., Page, A. Le, Frost, E. H., Cohen, A. A., Witkowski, J. M., & Franceschi, C. (2018). Immunosenescence and inflamm-aging as two sides of the same coin: Friends or Foes? *Frontiers in Immunology*, 8(JAN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01960>
- Garmani, A., Yamada, S. & Terzic, A. Longevity leap: mind the healthspan gap. *npj Regen Med* 6, 57 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00169-5>.

- Gerashchenko, B. I. (2002). Philosophy of aging. *Medical Hypotheses*, 58(2), 157–158. <https://doi.org/10.1054/mehy.2001.1500>
- Granowitz, E. V., Poutsiaka, D. D., Cannon, J. G., Wolff, S. M., Dinarello, C. A., Santos, A. A., & Wilmore, D. W. (1991). Production of interleukin-1-receptor antagonist during experimental endotoxaemia. *The Lancet*, 338(8780), 1423–1424. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)92725-H](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)92725-H)
- Grasselli, G., Cattaneo, E., & Scaravilli, V. (2021). Ventilation of coronavirus disease 2019 patients. *Current Opinion in Critical Care*, 27(1), 6–12. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000793>
- Grayson, M. (2012). Ageing. *Nature*, 492(7427), 40. <https://doi.org/10.1038/492S1a>
- Guan, W., Ni, Z., Hu, Y., Liang, W., Ou, C., He, J., Liu, L., Shan, H., Lei, C., Hui, D. S. C., Du, B., Li, L., Zeng, G., Yuen, K.-Y., Chen, R., Tang, C., Wang, T., Chen, P., Xiang, J., ... Zhong, N. (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*, 382(18), 1708–1720. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2002032>
- Guarnieri, M., Balmes, J. R., & Francisco, S. (2014). *HHS Public Access*. 383(9928), 1581–1592. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60617-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60617-6).Outdoor
- Halpin, D. M. G., Criner, G. J., Papi, A., Singh, D., Anzueto, A., Martinez, F. J., Agusti, A. A., & Vogelmeier, C. F. (2021). Global Initiative for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 203(1), 24–36. <https://doi.org/10.1164/rccm.202009-3533SO>
- Hariharan, A., Rahman, A., Subathra, H., Mettu, R., & Reddy, S. (2021). The Role and Therapeutic Potential of NF - kappa - B Pathway in Severe COVID - 19 Patients. *Inflammopharmacology*, 29(1), 91–100. <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00773-9>
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37, 614–36.
- Haynes, B. F., Sempowski, G. D., Wells, A. F., & Hale, L. P. (2000). The human thymus during aging. *Immunologic Research*, 22(2–3), 253–261. <https://doi.org/10.1385/IR:22:2-3:253>
- He, J. F., Peng, G. W., Min, J., Yu, D. W., Liang, W. J., Zhang, S. Y., Xu, R. H., Zheng, H. Y., Wu, X. W., Xu, J., Wang, Z. H., Fang, L., Zhang, X., Li, H., Yan, X. G., Lu, J. H., Hu, Z. H., Huang, J. C., Wan, Z. Y., ... Lo, Y. M. D. (2004). Molecular Evolution of the SARS Coronavirus, during the Course of the SARS Epidemic in China. *Science*, 303(5664), 1666–1669. <https://doi.org/10.1126/science.1092002>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Horvath, S., & Levine, A. J. (2015). HIV-1 infection accelerates age according to the epigenetic clock. *Journal of Infectious Diseases*, 212(10), 1563–1573. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv277>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Hunter, T. M., Boytsov, N. N., Zhang, X., Schroeder, K., Michaud, K., & Araujo, A. B. (2017). Prevalence of rheumatoid arthritis in the United States adult population in healthcare claims databases, 2004–2014. *Rheumatology International*, 37(9), 1551–1557. <https://doi.org/10.1007/s00296-017-3726-1>

- Ilieva, K. M., Fazekas-Singer, J., Achkova, D. Y., Dodev, T. S., Mele, S., Crescioli, S., Bax, H. J., Cheung, A., Karagiannis, P., Correa, I., Figini, M., Marlow, R., Josephs, D. H., Beavil, A. J., Maher, J., Spicer, J. F., Jensen-Jarolim, E., Tutt, A. N., & Karagiannis, S. N. (2017). Functionally active Fc Mutant antibodies recognizing cancer antigens generated rapidly at high Yields. *Frontiers in Immunology*, 8(SEP). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01122>
- Iruela-Arispe, M. L. (2021). An inflammatory clock for healthy aging. *Nature Aging*, 1(7), 574–575. <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00085-9>
- Jang, D. I., Lee, A. H., Shin, H. Y., Song, H. R., Park, J. H., Kang, T. B., Lee, S. R., & Yang, S. H. (2021). The role of tumor necrosis factor alpha (Tnf- α) in autoimmune disease and current tnf- α inhibitors in therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>
- Jia, H. P., Look, D. C., Shi, L., Hickey, M., Pewe, L., Netland, J., Farzan, M., Wohlford-Lenane, C., Perlman, S., & McCray, P. B. (2005). ACE2 Receptor Expression and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Depend on Differentiation of Human Airway Epithelia. *Journal of Virology*, 79(23), 14614–14621. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.23.14614-14621.2005>
- Johnson, M. (2020). Wuhan 2019 Novel Coronavirus - 2019-nCoV. *Materials and Methods*, 10 (January), 1–5. *World Health Organization*. Situation Report – 101. <http://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports>. 2020
- Johnson, N. P. A. S., & Mueller, J. (2002). Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 “Spanish” influenza pandemic. *Bulletin of the History of Medicine*, 76(1), 105–115. <https://doi.org/10.1353/bhm.2002.0022>
- Joosten, H. F. P., Acker, F. A. A. Van, Dobbela, D. J. Van Den, Horbach, G. J. M. J., & Krajinac, E. I. (2004). *Genotoxicity of hormonal steroids*. 151, 113–134. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.01.018>
- Kawaoka, Y., Krauss, S., & Webster, R. G. (1989). Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *Journal of Virology*, 63(11), 4603–4608. <https://doi.org/10.1128/jvi.63.11.4603-4608.1989>
- Kim, J. Y., Ko, J. H., Kim, Y., Kim, Y. J., Kim, J. M., Chung, Y. S., Kim, H. M., Han, M. G., Kim, S. Y., & Chin, B. S. (2020). Viral load kinetics of SARS-CoV-2 infection in first two patients in Korea. *Journal of Korean Medical Science*, 35(7), 1–7. <https://doi.org/10.3346/jkms.2020.35.e86>
- Kirkwood, T. B. L., & Franceschi, C. (1992). Is Aging As Complex As It Would Appear? New Perspectives in Aging Research. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 663(1), 412–417. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb38685.x>
- Kirkwood, T. B. L., & Holliday, R. (1979). The evolution of ageing and longevity. *Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences*, 205(1161), 531–546. <https://doi.org/10.1098/rspb.1979.0083>
- Knovich, M. A., Storey, J. A., Coffman, L. G., & Torti, S. V. (2010). *Ferritin for the Clinician*. 23(3), 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2008.08.001.Ferritin>
- Kumar, A., Gupta, R., Ghosh, A., & Misra, A. (2020). *Diabetes in COVID-19*. January. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7195120/pdf/main.pdf>
- Lam, T. T. Y., Jia, N., Zhang, Y. W., Shum, M. H. H., Jiang, J. F., Zhu, H. C., Tong, Y. G., Shi, Y. X., Ni, X. B., Liao, Y. S., Li, W. J., Jiang, B. G., Wei, W., Yuan, T. T., Zheng, K., Cui, X. M., Li, J., Pei, G. Q., Qiang, X., ... Cao, W. C. (2020). Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*, 583(7815), 282–285. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2169-0>

- Lam, T. T. Y., Shum, M. H. H., Zhu, H. C., Tong, Y. G., Ni, X. B., Liao, Y. S., Wei, W., Cheung, W. Y. M., Li, W. J., Li, L. F., Leung, G. M., Holmes, E. C., Hu, Y. L., & Guan, Y. (2020). Identification of 2019-nCoV related coronaviruses in malayan pangolins in southern China. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.02.13.945485>
- Lauer, S. A., Grantz, K. H., Bi, Q., Jones, F. K., Zheng, Q., Meredith, H. R., Azman, A. S., Reich, N. G., & Lessler, J. (2020). The incubation period of coronavirus disease 2019 (CoVID-19) from publicly reported confirmed cases: Estimation and application. *Annals of Internal Medicine*, *172*(9), 577–582. <https://doi.org/10.7326/M20-0504>
- Lei, J., Yin, X., Shang, H., & Jiang, Y. (2019). IP-10 is highly involved in HIV infection. *Cytokine*, *115*(155), 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.11.018>
- Li, K. S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G. J. D., Xu, K. M., Duan, L., Rahardjo, A. P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T. D., Estoepongastie, A. T. S., Chaisingh, A., Auewarakui, P., Long, H. T., Hanh, N. T. H., Webby, R. J., Poon, L. L. M., Chen, H., Shortridge, K. F., ... Peiris, J. S. M. (2004). Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*, *430*(6996), 209–213. <https://doi.org/10.1038/nature02746>
- Licastro, F., Candore, G., Lio, D., Porcellini, E., Colonna-Romano, G., Franceschi, C., & Caruso, C. (2005). Innate immunity and inflammation in ageing: A key for understanding age-related diseases. *Immunity and Ageing*, *2*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-2-8>
- Ligthart, G. J., Corberand, J. X., Fournier, C., Galanaud, P., Hijmans, W., Kennes, B., Müller-Hermelink, H. K., & Steinmann, G. G. (1984). Admission criteria for immunogerontological studies in man: The senieur protocol. *Mechanisms of Ageing and Development*, *28*(1), 47–55. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(84\)90152-0](https://doi.org/10.1016/0047-6374(84)90152-0)
- Lim, J. H., Jung, H. Y., Choi, J. Y., Park, S. H., Kim, C. D., Kim, Y. L., & Cho, J. H. (2020). Hypertension and electrolyte disorders in patients with COVID-19. *Electrolyte and Blood Pressure*, *18*(2), 23–30. <https://doi.org/10.5049/EBP.2020.18.2.23>
- Lipsitz, L.A., 2004. Physiological complexity, aging, and the path to frailty. *Sci. Aging Knowl. Environ.*: SAGE KE 2004 (16), pe16. <http://doi.org/10.1126/seake.2004.16.pe16>.
- Liu, Y. C., Kuo, R. L., & Shih, S. R. (2020). COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. *Biomedical Journal*, *43*(4), 328–333. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.04.007>
- Lucas, C., Wong, P., Klein, J., Castro, T. B. R., Silva, J., Ellingson, M. K., Mao, T., Oh, J. E., Israelow, B., Takahashi, T., Tokuyama, M., Lu, P., Venkataraman, A., Park, A., Mohanty, S., Wang, H., Wyllie, A. L., Vogels, C. B. F., Lapidus, S., ... Omer, S. B. (2021). *HHS Public Access*. *584*(7821), 463–469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2588-y>. Longitudinal
- Lucas, C., Wong, P., Klein, J., Castro, T. B. R., Silva, J., Sundaram, M., Ellingson, M. K., Mao, T., Oh, J. E., Israelow, B., Takahashi, T., Tokuyama, M., Lu, P., Venkataraman, A., Park, A., Mohanty, S., Wang, H., Wyllie, A. L., Vogels, C. B. F., ... Iwasaki, A. (2020). Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*, *584*(7821), 463–469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2588-y>
- Lujambio, A., Akkari, L., Simon, J., Grace, D., Tschaharganeh, D. F., Bolden, J. E., Zhao, Z., Thapar, V., Joyce, J. A., Krizhanovsky, V., & Lowe, S. W. (2013). Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell*, *153*(2), 449–460. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.020>
- Lunardi, S., Lim, S. Y., Muschel, R. J., & Brunner, T. B. (2015). IP-10/CXCL10 attracts regulatory T cells: Implication for pancreatic cancer. *OncoImmunology*, *4*(9), 1–3. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1027473>
- MaCkay, I. R. (1972). Ageing and immunological function in man. *Gerontology*, *18*(5–6), 285–304. <https://doi.org/10.1159/000211941>

- Madariaga, A. G., Santos Palacios, S., Guillén-Grima, F., & Galofré, J. C. (2014). The incidence and prevalence of thyroid dysfunction in Europe: A meta-analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(3), 923–931. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2409>
- Magesh, S., John, D., Li, W. T., Li, Y., Mattingly-app, A., Jain, S., Chang, E. Y., & Ongkeko, W. M. (2021). *Disparities in COVID-19 Outcomes by Race , Ethnicity , and Socioeconomic Status A Systematic Review and Meta-analysis*. 1–16. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.34147>
- Mahroum, N., Alghory, A., Kiyak, Z., Alwani, A., & Seida, R. (2020). Ferritin – from iron, through inflammation and autoimmunity, to COVID-19. *Journal of Autoimmunity*. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2021.102778>
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436–444. <https://doi.org/10.1038/nature07205>
- Manuto, L., Grazioli, M., Spitaleri, A., Fontana, P., Bianco, L., Bertolotti, L., Bado, M., Mazzotti, G., Bianca, F., Onelia, F., Lorenzin, G., Simeoni, F., Lazarevic, D., Franchin, E., Vecchio, C. Del, Dorigatti, I., Tonon, G., Cirillo, D. M., Lavezzo, E., ... Toppo, S. (2022). *Emergence of Novel Haplotypes*. 1–14.
- Marchetti, M. C., Di Marco, B., Cifone, G., Migliorati, G., & Riccardi, C. (2003). Dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes: Role of glucocorticoid receptor-associated Src kinase and caspase-8 activation. *Blood*, 101(2), 585–593. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1779>
- Marshall, J. C., Murthy, S., Diaz, J., Adhikari, N., Angus, D. C., Arabi, Y. M., Baillie, K., Bauer, M., Berry, S., Blackwood, B., Bonten, M., Bozza, F., Brunkhorst, F., Cheng, A., Clarke, M., Dat, V. Q., de Jong, M., Denholm, J., Derde, L., ... Zhang, J. (2020). A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(8), e192–e197. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30483-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30483-7)
- Martineau, A. R., Timms, P. M., Bothamley, G. H., Hanifa, Y., Islam, K., Claxton, A. P., Packe, G. E., Moore-gillon, J. C., Darmalingam, M., Davidson, R. N., Milburn, H. J., Baker, L. V., Barker, R. D., Woodward, N. J., Wilkinson, R. J., Nikolayevskyy, V., Drobniewski, F. A., Eldridge, S. M., & Griffi, C. J. (2011). *High-dose vitamin D 3 during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis : a double-blind randomised controlled trial*. 377, 14–17. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61889-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61889-2)
- Matyushenko, V., Isakova-Sivak, I., Kudryavtsev, I., Goshina, A., Chistyakova, A., Stepanova, E., Prokopenko, P., Sychev, I., & Rudenko, L. (2021). Detection of ifn γ -secreting cd4+ and cd8+ memory t cells in covid-19 convalescents after stimulation of peripheral blood mononuclear cells with live sars-cov-2. *Viruses*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/v13081490>
- Mbbs, V. G. H., Solera, J. T., Mbbs, G. A., Mbbs, T. M., Cardinal, H., Poirier, C., Huard, G., Mbbs, G. V. R. P., Serres, S. A. De, Isaac, D., Mainra, R., Lamarche, C., & Sapir-pichhadze, R. (2022). *Severity of COVID-19 among solid organ transplant recipients in Canada , 2020 – 2021 : a prospective , multicentre cohort study*. 194(33), 2020–2021. <https://doi.org/10.1503/cmaj.220620>
- Medzhitov & Janeway. Innate, S. O. F., & Recognition, I. (1975). Immune Recognition. *Annals of Internal Medicine*, 83(3), 445. https://doi.org/10.7326/0003-4819-83-3-445_2
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- Mhandire, K., Mlambo, T., Zijenah, L. S., Duri, K., Mateveke, K., Tshabalala, M., Mhandire, D. Z., Musarurwa, C., Wekare, P. T., Mazengera, L. R., Matarira, H. T., & Stray-Pedersen, B. (2017). Plasma IP-10 Concentrations Correlate Positively with Viraemia and Inversely with CD4 Counts in Untreated HIV Infection. *The Open AIDS Journal*, 11(1), 24–31. <https://doi.org/10.2174/1874613601711010024>

- Milgrom, H., & Huang, H. (2014). Allergic disorders at a venerable age: A mini-review. *Gerontology*, *60*(2), 99–107. <https://doi.org/10.1159/000355307>
- Moelants, E. A. V., Mortier, A., Van Damme, J., & Proost, P. (2013). Regulation of TNF- α with a focus on rheumatoid arthritis. *Immunology and Cell Biology*, *91*(6), 393–401. <https://doi.org/10.1038/icb.2013.15>
- Montecino-Rodriguez, E., Min, H., & Dorshkind, K. (2005). Reevaluating current models of thymic involution. *Seminars in Immunology*, *17*(5), 356–361. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2005.05.006>
- Morens, D. M., & Fauci, A. S. (2007). The 1918 influenza pandemic: Insights for the 21st century. *Journal of Infectious Diseases*, *195*(7), 1018–1028. <https://doi.org/10.1086/511989>
- Morens, D. M., Folkers, G. K., & Fauci, A. S. (2009). What is a pandemic? *Journal of Infectious Diseases*, *200*(7), 1018–1021. <https://doi.org/10.1086/644537>
- Mueller. (2016). HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, *176*(1), 139–148. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500082>.Thymic
- Müller, L., & Pawelec, G. (2015). As we age: Does slippage of quality control in the immune system lead to collateral damage? *Ageing Research Reviews*, *23*(PA), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.01.005>
- Murphy, Kennedy. *Imunobiologia de Janeway*. tradução: Denise C. Machado, Gaby Renard, Lucien Peroni Gualdi; revisão técnica: Denise C. Machado. -8. ed. - Dados eletrônicos. -Porto Alegre : Artmed, 2014.
- Muzio, M., Natoli, G., Saccani, S., Levrero, M., & Mantovani, A. (1998). The human toll signaling pathway: Divergence of nuclear factor κ b and jnk/sapk activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *Journal of Experimental Medicine*, *187*(12), 2097–2101. <https://doi.org/10.1084/jem.187.12.2097>
- Ng Chee Ping. (2013). NIH Public Access. *Bone*, *23*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/nri3132>.The
- Nickel, O., Rockstroh, A., Wolf, J., Landgraf, S., Kalbitz, S., Kellner, N., Borte, M., Id, C. P., Fertey, J., Ulbert, S., & Id, S. B. (2022). *PLOS ONE Evaluation of the systemic and mucosal immune response induced by COVID-19 and the BNT162b2 mRNA vaccine for SARS-CoV-2*. 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263861>
- Olshansky SJ. From Lifespan to Healthspan. *JAMA*. 2018 Oct 2;320(13):1323-1324. doi: 10.1001/jama.2018.12621. PMID: 30242384.
- Palareti, G., Legnani, C., Cosmi, B., Antonucci, E., Erba, N., Poli, D., Testa, S., & Tosetto, A. (2016). Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. *International Journal of Laboratory Hematology*, *38*(1), 42–49. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Palareti, G., Legnani, C., Cosmi, B., Antonucci, E., Erba, N., Poli, D., Testa, S., & Tosetto, A. (2016). Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. *International Journal of Laboratory Hematology*, *38*(1), 42–49. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Palomino, D. C. arolin. T., & Marti, L. C. avalheir. (2015). Chemokines and immunity. *Einstein (São Paulo, Brazil)*, *13*(3), 469–473. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RB3438>
- Pan, Y., Zhang, D., Yang, P., Poon, L. L. M., & Wang, Q. (2020). Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *The Lancet Infectious Diseases*, *20*(4), 411–412. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30113-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30113-4)

- Partridge, L., Deelen, J., & Slagboom, P. E. (2018). Facing up to the global challenges of ageing. *Nature*, *561*(7721), 45–56. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0457-8>
- Pawelec, G. (2020). The human immunosenescence phenotype: does it exist? *Seminars in Immunopathology*, *42*(5), 537–544. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00810-3>
- Pons-Estel, G. J., Alarcón, G. S., Scofield, L., Reinlib, L., & Cooper, G. S. (2010). Understanding the Epidemiology and Progression of Systemic Lupus Erythematosus. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, *39*(4), 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2008.10.007>
- Prendergast, H. M. (2016). *HHS Public Access*. *21*(3), 205–211. <https://doi.org/10.1007/s40292-013-0031-2>. Progression
- Qin, S., Rottman, J. B., Myers, P., Kassam, N., Weinblatt, M., Loetscher, M., Koch, A. E., Moser, B., & Mackay, C. R. (1998). The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *Journal of Clinical Investigation*, *101*(4), 746–754. <https://doi.org/10.1172/JCI1422>
- Qingwei, Q., Bao, Z., & Yu, Z. (2013). The anti-inflamm-aging and hepatoprotective effects of huperzine A in D-galactose-treated rats. *Mechanisms of Ageing and Development*. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2012.12.005>
- Rao, A. N., Sivasankar, B., & Sadasivam, V. (2010). Photo-oxidative degradation of an azo dye direct red 31 in the presence of ZnS catalyst. *Indian Journal of Chemistry - Section A Inorganic, Physical, Theoretical and Analytical Chemistry*, *49*(7), 901–905.
- Rennick D, Moore JG, Thomson-Snipes L. IL-4 and hematopoiesis. In: Spits H, editors. IL-4 Structure and Function. Boca Raton (FL): CRC Press; 1992. 47.
- Rota, P. A., Oberste, M. S., Monroe, S. S., Nix, W. A., Campagnoli, R., Icenogle, J. P., Peñaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M. Hsin, Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J. L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D. D., Peret, T. C. T., ... Bellini, W. J. (2003). Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, *300*(5624), 1394–1399. <https://doi.org/10.1126/science.1085952>
- Sansoni, P., Cossarizza, A., Brianti, V., Fagnoni, F., Snelli, G., Monti, D., Marcato, A., Passeri, G., Ortolani, C., Forti, E., Fagiolo, U., Passeri, M., & Franceschi, C. (1993). Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians. *Blood*, *82*(9), 2767–2773. <https://doi.org/10.1182/blood.v82.9.2767.bloodjournal8292767>
- Santoro, A., Martucci, M., Conte, M., Capri, M., Franceschi, C., & Salvioli, S. (2020). Inflammaging , hormesis and the rationale for anti-aging strategies. *Ageing Research Reviews*, *June*, 101142. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101142>
- Sayed, N., Huang, Y., Nguyen, K., Krejciowa-Rajaniemi, Z., Grawe, A. P., Gao, T., Tibshirani, R., Hastie, T., Alpert, A., Cui, L., Kuznetsova, T., Rosenberg-Hasson, Y., Ostan, R., Monti, D., Lehallier, B., Shen-Orr, S. S., Maecker, H. T., Dekker, C. L., Wyss-Coray, T., ... Furman, D. (2021). Author Correction: An inflammatory aging clock (iAge) based on deep learning tracks multimorbidity, immunosenescence, frailty and cardiovascular aging. In *Nature Aging* (Vol. 1, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00102-x>
- Scholtissek, C., Rohde, W., Von Hoyningen, V., & Rott, R. (1978). On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology*, *87*(1), 13–20. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90153-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90153-8)
- Silveira-Nunes, G., Speziali, E., Teixeira-Carvalho, A., Vitelli-Avelar, D. M., Sathler-Avelar, R., Figueiredo-Soares, T., Silva, M. L., Peruhype-Magalhães, V., Chaves, D. G., Brito-Melo, G. E., Cardoso, G. M., Soares, E. B., Elói-Santos, S. M., Teixeira, R., Queiroz, D. M., Corrêa-Oliveira, R., Faria, A. M. C., & Martins-Filho, O. A. (2017). Lifewide profile of cytokine production by innate

- and adaptive immune cells from Brazilian individuals. *Immunity and Ageing*, 14(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1186/s12979-017-0084-5>
- Simmons, G., Gosalia, D. N., Rennekamp, A. J., Reeves, J. D., Diamond, S. L., & Bates, P. (2005). Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(33), 11876–11881.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0505577102>
- Smith, J., Tho, L. M., & Xu, N. (2010). The ATM – Chk2 and ATR – Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer. In *Advances in Cancer Research* (1st ed., Vol. 108, Issue 10). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0>
- Skevaki, C., Karsonova, A., Karaulov, A., & Xie, M. (2020).
- Smadja, D. M., Mentzer, S. J., Fontenay, M., Laffan, M. A., Ackermann, M., Helms, J., Jonigk, D., Chocron, R., Pier, G. B., Gendron, N., Pons, S., Diehl, J. L., Margadant, C., Guerin, C., Huijbers, E. J. M., Philippe, A., Chapuis, N., Nowak-Sliwinska, P., Karagiannidis, C., ... Griffioen, A. W. (2021). COVID-19 is a systemic vascular hemopathy: insight for mechanistic and clinical aspects. In *Angiogenesis* (Vol. 24, Issue 4). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10456-021-09805-6>
- Smilowitz, N. R., Kunichoff, D., Garshick, M., Shah, B., Pillinger, M., Hochman, J. S., & Berger, J. S. (2021). *C-reactive protein and clinical outcomes in patients with COVID-19*. 2270–2279.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab169>
- Smith, J., Tho, L. M., & Xu, N. (2010). The ATM – Chk2 and ATR – Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer. In *Advances in Cancer Research* (1st ed., Vol. 108, Issue 10). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0>
- Sonoda Y. Interleukin-4—a dual regulatory factor in hematopoiesis. *Leuk Lymph*. 1994;14:231.
- Sproston, N. R., & Ashworth, J. J. (2018). *Role of C-Reactive Protein at Sites of inflammation and infection*. 9(April), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00754>
- Starr, I. (2006). Influenza in 1918: Recollections of the epidemic in Philadelphia. *Annals of Internal Medicine*, 145(2), 138–140. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-145-2-200607180-00132>
- Sternberg, A., & Naujokat, C. (2020). *Life Sciences*, 257 (January).
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118056>
- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K., & Cox, N. (1998). Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 279(5349), 393–396. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.393>
- Takahashi, T., Ellingson, M. K., Wong, P., Israelow, B., Lucas, C., Klein, J., Silva, J., Mao, T., Oh, J. E., Lu, P., Venkataraman, A., Park, A., Liu, F., Meir, A., Sun, J., Wang, E. Y., Casanovas-massana, A., Wyllie, A. L., Chantal, B. F., ... Albert, I. (2021). *HHS Public Access disease outcomes* (Vol. 588, Issue 7837). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2700-3>.Sex
- Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A., & Ng, L. F. P. (2020). The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*, 20(6), 363–374.
<https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
- Thomas, S. Y., Hou, R., Boyson, J. E., Means, T. K., Hess, C., Olson, D. P., Strominger, J. L., Brenner, M. B., Gumperz, J. E., Wilson, S. B., & Luster, A. D. (2003). CD1d-Restricted NKT Cells Express a Chemokine Receptor Profile Indicative of Th1-Type Inflammatory Homing Cells. *The Journal of Immunology*, 171(5), 2571–2580. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.5.2571>

- Torres, K. C. L., Rezende, V. B. de, Lima-Silva, M. L., Santos, L. J. de S., Costa, C. G., Mambrini, J. V. de M., Peixoto, S. V., Tarazona-Santos, E., Martins Filho, O. A., Lima-Costa, M. F., & Teixeira-Carvalho, A. (2018). Immune senescence and biomarkers profile of Bambuí aged population-based cohort. *Experimental Gerontology*, *103*(December 2017), 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.12.006>
- Tzanavari, T., Giannogonas, P., & Karalis, K. P. (2010). TNF-alpha and obesity. *Current Directions in Autoimmunity*, *11*, 145–156.
- Valverde-Villegas, J. M., de Medeiros, R. M., Ellwanger, J. H., Santos, B. R., Melo, M. G. de, Almeida, S. E. de M., & Chies, J. A. B. (2018). High CXCL10/IP-10 levels are a hallmark in the clinical evolution of the HIV infection. *Infection, Genetics and Evolution*, *57*, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.11.002>
- Van Kerkhove, M. D., Vandemaële, K. A. H., Shinde, V., Jaramillo-Gutierrez, G., Koukounari, A., Donnelly, C. A., Carlino, L. O., Owen, R., Paterson, B., Pelletier, L., Vachon, J., Gonzalez, C., Hongjie, Y., Zijian, F., Chuang, S. K., Au, A., Buda, S., Krause, G., Haas, W., ... Mounts, A. W. (2011). Risk factors for severe outcomes following 2009 influenza A (H1N1) infection: A global pooled analysis. *PLoS Medicine*, *8*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001053>
- Vasan R S, Musani S K, Matsushita K, Beard W, Obafemi O B, Butler K R, Chang P P, Mosley T H, Fox E, (2021) Epidemiology of Heart Failure Stages in Middle-Aged Black People in the Community: Prevalence and Prognosis in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Journal of the American Heart Association*. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.016524>
- Walford, R. L. (1969). The Immunologic Theory of Aging. *Immunological Reviews*, *2*(1), 171–171. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1969.tb00210.x>
- Wang, Z., Wu, T., Ma, M., Zhang, Z., Fu, Y., Liu, J., Xu, J., Ding, H., Han, X., Chu, Z., Wu, Y., Shang, H., & Jiang, Y. (2017). Elevated interferon- γ -induced protein 10 and its receptor CXCR3 impair NK cell function during HIV infection. *Journal of Leukocyte Biology*, *102*(1), 163–170. <https://doi.org/10.1189/jlb.5a1016-444r>
- Wertheimer, A. M., Bennett, M. S., Park, B., Uhrlaub, J. L., Martinez, C., Pulko, V., Currier, N. L., Nikolich-Zugich, D., Kaye, J., & Nikolich-Zugich, J. (2014). Aging and Cytomegalovirus Infection Differentially and Jointly Affect Distinct Circulating T Cell Subsets in Humans. *The Journal of Immunology*, *192*(5), 2143–2155. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301721>
- Who. World Health Organization (2019) https://www.who.int/ageing/publications/global_health.pdf
- Williams, B., Jalilianhasanpour, R., Matin, N., Fricchione, G. L., Sepulcre, J., Keshavan, M. S., ... & Perez, D. L. (2018). Individual differences in corticolimbic structural profiles linked to insecure attachment and coping styles in motor functional ne, 230-237. (2019). HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, *176*(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.049.SILAC>
- Wu, J., Song, S., Cao, H. C., & Li, L. J. (2020). Liver diseases in COVID-19: Etiology, treatment and prognosis. *World Journal of Gastroenterology*, *26*(19), 2286–2293. <https://doi.org/10.3748/WJG.V26.I19.2286>
- Xiao, K., Zhai, J., Feng, Y., Zhou, N., Zhang, X., Zou, J.-J., Li, N., Guo, Y., Li, X., Shen, X., Zhang, Z., Shu, F., Huang, W., Li, Y., Zhang, Z., Chen, R.-A., Wu, Y.-J., Peng, S.-M., Huang, M., ... Shen, Y. (2020). Isolation and Characterization of 2019-nCoV-like Coronavirus from Malayan Pangolins. <https://doi.org/10.1101/2020.02.17.951335>
- Xu, H., Zhong, L., Deng, J., Peng, J., Dan, H., Zeng, X., Li, T., & Chen, Q. (2020). High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *International Journal of Oral Science*, *12*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>

- Xuefeng Chen, et al, 2011. (2011). HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(10), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.104024>.Aging
- Yager, E. J., Ahmed, M., Lanzer, K., Randall, T. D., Woodland, D. L., & Blackman, M. A. (2008). Age-associated decline in T cell repertoire diversity leads to holes in the repertoire and impaired immunity to influenza virus. *Journal of Experimental Medicine*, 205(3), 711–723. <https://doi.org/10.1084/jem.20071140>
- Yuan, S., Jiang, S. C., Zhang, Z. W., Fu, Y. F., Hu, J., & Li, Z. L. (2021). Quantification of Cytokine Storms During Virus Infections. *Frontiers in Immunology*, 12(May), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.659419>
- Zhang, T., Wu, Q., & Zhang, Z. (2020). Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Current Biology*, 30(8), 1578. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.063>
- Zhou, P., Yang, X. Lou, Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. Di, Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., ... Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Zhou, X., Li, Z., & Zhou, J. (2017). Tumor necrosis factor α in the onset and progression of leukemia. *Experimental Hematology*, 45, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.10.005>

ANEXOS

ANEXO 01: Fotografias Históricas da “Gripe Espanhola”



Fotografia de 1918: Vista das vítimas dos casos de gripe espanhola enquanto estão deitadas em um hospital do quartel no campus do Colorado Agricultural College, Fort Collins, Colorado, Estados Unidos.



Fotografia de ano desconhecido: Hospital militar de emergência montado no Kansas, Estados Unidos, para tratar as vítimas locais da pandemia de gripe espanhola.



Fotografia de 1918: Voluntários da Cruz Vermelha no combate à gripe espanhola.



Fotografia de 1918: Mulheres trabalhando para Cruz Vermelha durante gripe pandêmica. Arquivo Bettmann.



Fotografia de 1918: Homens em barbearias americanas cortando o cabelo com algumas precauções adotadas durante a epidemia da influenza. Arquivo Bettmann.

ANEXO 02: Projeto Aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Impacto da imunossenescência no desfecho da COVID19.

Pesquisador: Ana Maria Caetano de Faria

Área Temática: Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

Versão: 3

CAAE: 40208320.3.1001.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: MERCK SHARP & DOHME FARMACEUTICA LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.522.282

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1537837.pdf, de 29/01/2021).

RESUMO

A atual pandemia de COVID19 é um grande desafio para a ciência por vários motivos. Um deles é o padrão dos grupos de risco que atinge indivíduos com co-morbidades (diabetes, doenças cardiovasculares, obesidade) e idosos. De fato, doenças inflamatórias crônicas podem comprometer a resposta imune e o envelhecimento é associado a várias alterações imunológicas que tornam os idosos mais suscetíveis a infecções. No entanto, no Brasil, 25% das mortes por COVID19 ocorrem em indivíduos < 60 anos e sem as doenças listadas como de risco em outros países. Por outro lado, nem todos os idosos desenvolvem a forma grave da doença. Nossa hipótese a ser estudada nesse projeto é que alguns defeitos imunes típicos da imunossenescência podem ocorrer em idosos e em adultos e eles seriam importantes para o desfecho grave da COVID19:

a) a inflamação crônica de baixa intensidade associada ao envelhecimento (inflamm-aging) pode potencializar a tempestade de citocinas que leva às lesões da microcirculação e do pulmão observada nos casos graves de COVID19;

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.522.282

- b) a senescência/exaustão de linfócitos T CD8+ pode comprometer a função dessas células na imunidade anti-viral;
- c) a redução na função de células T e B imunorreguladoras (tregs e Bregs) pode comprometer o controle da inflamação pulmonar;
- d) a redução da diversidade de repertório das imunoglobulinas (Ig) de células B típica da imunossenescência pode comprometer o controle da infecção;
- e) indivíduos de áreas endêmicas como Governador Valadares (GV) teriam um padrão acentuado de imunossenescência devida à exposição crônica a infecções que aceleraria a senescência imunológica;
- f) outros fatores inflamatórios sistêmicos como a disbiose da microbiota intestinal e a obesidade, poderiam atuar potenciando os danos pulmonares na COVID19 grave. Para testar essa hipótese pretendemos avaliar em coortes de adultos (20-60 anos) e idosos (>60) com COVID19 de Belo Horizonte, Governador Valadares, São Paulo e Salvador:

- 1) perfil inflamatório sistêmico (27 citocinas/quimiocinas no plasma);
- 2) fenótipo de senescência em linfócitos T e B no sangue (PBMC);
- 3) repertório de Imunoglobulinas produzidas por linfócitos B ativados;
- 4) outros fatores inflamatórios (obesidade, microbiota, nutrição, co-morbidades);
- 5) a idade biológica medida pela metilação do DNA extraído de leucócitos (em comparação com a idade cronológica) dos indivíduos estudados. A intenção é relacionar o perfil de imunossenescência desses indivíduos com o desfecho clínico da doença procurando identificar biomarcadores da forma grave da COVID19.

HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que o declínio na função imunológica observado em idosos (inflamação resultante do aumento da secreção de citocinas inatas, declínio na função de células TCD4+ reguladoras aumento da frequência de células TCD8+ e T CD4+ exaustas/senescentes, disbiose da microbiota intestinal e alterações no repertório de anticorpos) têm um papel crítico no desencadeamento da hiper-inflamação que resulta em danos nos pulmões e na microcirculação com o desencadeamento síndrome respiratória grave (SARS) e da COVID-19 grave nessa população. Além disso, propomos que indivíduos residentes em uma área endêmica de várias doenças infecciosas crônicas (Governador Valadares, MG, Brasil) teriam aumentado a suscetibilidade ao desenvolvimento de formas graves de COVID-19 em idade mais precoce devido a um fenótipo de envelhecimento acelerado observado nessa área. Indivíduos com o perfil de

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.522.282

senescência acelerada, em geral, teriam uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento da forma grave da doença.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo transversal, no qual serão recrutados 150 indivíduos positivos para SARS-Cov-2 (os negativos serão o nosso grupo controle) de ambos os sexos de duas faixas etárias (adultos de 20 a 60 anos e idosos > 60 anos), residentes na área urbana de Governador Valadares e nas cidades de Belo Horizonte e São Paulo. Serão selecionados os indivíduos que forem positivos para o teste molecular (RT-PCR) para SARS-Cov2 e estes serão divididos em 4 grupos de estudo: adultos ou idosos com as formas leve/moderada ou grave da COVID-19. Os indivíduos que aceitarem participar da pesquisa deverão assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após a assinatura do TCLE, os indivíduos responderão o questionário de anamnese clínica, socioeconômica e nutricional aplicados pelos médicos e nutricionistas da equipe. Posteriormente o indivíduo passará para a coleta de medidas antropométricas e coleta de 40mL de sangue periférico e receberá vasilhame e instruções para colher uma amostra de fezes em casa e entregá-la no retorno para receber o resultado. O sangue será processado tendo a porção celular (células mononucleares) será separada e utilizada para: 1) avaliação das características fenotípicas dos linfócitos T e B (perfil de imunossenescência e de imunorregulação) descritas nos objetivos pela técnica de citometria de fluxo; extração do RNA para avaliação do repertório de imunoglobulinas; 2) extração do DNA para avaliação da metilação (determinação da idade epigenética). O soro será utilizado para medida de anticorpos para SARSCov2 e para testes bioquímicos, o plasma será utilizado para medida do perfil de citocinas/quimiocinas inflamatórias e anti-inflamatórias (inflammaging) pela técnica de Luminex. Exames bioquímicos como hemograma, leucograma, medida de Proteína C Reativa, Dímero D também serão realizados. As fezes serão utilizadas para os testes parasitológicos e para a microbiota intestinal (por sequenciamento do DNA extraído). Serão utilizados métodos de estatística de análise multivariada e ferramentas de bioinformática para determinar as correlações entre essas análises e o desfecho da COVID-19 (leve/moderado versus grave) nas duas faixas etárias examinadas.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Serão incluídos todos os indivíduos maiores de 20 anos atendidos nas unidades parceiras do projeto que apresentarem confirmação para a presença do Cov-2 e que aceitarem participar do estudo por meio da assinatura do TCLE. Alguns indivíduos que foram negativos no teste de PCR

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.522.282

para SARS-Cov2 serão também incluídos como controle do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVOS PRIMÁRIOS

Avaliar como o perfil imunológico relacionado ao envelhecimento impacta no desfecho da COVID19 de modo a tornar essa população mais susceptível ao agravamento da doença para poder identificar biomarcadores que possam permitir um diagnóstico precoce dessa forma grave da doença. Para isso serão avaliados os seguintes parâmetros na população estudada:

- 1) o perfil de ativação linfócitos T e B, identificar se essas células apresentam maior grau de envelhecimento/ exaustão celular, se mantem a capacidade de proliferação e de diferenciação em células reguladoras, bem como na atividade das células reguladoras;
- 2) o perfil de citocinas/quimiocinas inflamatórias (inflammaging) no plasma dos pacientes infectados, e o balanço com as citocinas anti-inflamatórias;
- 3) o repertório de imunoglobulinas nos indivíduos em diferentes faixas etárias e com diferentes desfechos da doença;
- 4) as diferenças no perfil de composição da microbiota intestinal entre os diferentes grupos;
- 5) as comorbidades inflamatórias associadas ao perfil de imunossenescência e sua correlação com o desfecho da COVID-19.
- 6) Por fim, tentar encontrar um biomarcador de resposta imune que possa ser utilizado como critério de diagnóstico e prognóstico da doença.

OBJETIVO SECUNDÁRIO

Produzir um banco de dados com os resultados de todas as análises realizadas no projeto para facilitar a interpretação dos resultados globais e auxiliar em pesquisas futuras envolvendo a imunossenescência e os perfis imunológicos relacionados a ela e correlacionados com infecções virais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

O sangue será coletado por profissional treinado que usará jaleco, luvas e máscara. Todo o material utilizado para a coleta é estéril e descartável. A coleta de sangue pode causar leve dor local podendo, em alguns casos, levar a formação de pequenos hematomas locais e discreto sangramento. Poderão ocorrer outros tipos de desconforto como tonturas e desmaios, ou desconfortos psíquicos como ansiedade e medo. Isto será levado em conta no momento da coleta e, caso seja necessário, será providenciada uma coleta na posição deitada para evitar qualquer tipo

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.719-040
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3315-5877 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.522.282

de desconforto, constrangimento ou aborrecimento. Medidas de biossegurança serão adotadas em todos os procedimentos realizados neste projeto visando salvaguardar o coletor de qualquer possibilidade de contaminação e também evitar injúria ao paciente no ato da coleta de sangue por punção venosa. Serão observadas medidas de segurança também para acidentes cortantes ou perfurantes e os riscos de contaminação são minimizados com a realização de antisepsia do ponto de punção, assepsia das mãos entre o atendimento dos pacientes e imunização ativa contra tétano, difteria e hepatite B para todos os profissionais de saúde envolvidos neste projeto.

BENEFÍCIOS

A participação da pessoa como voluntária não será remunerada. Um benefício imediato da participação será a realização gratuita do teste diagnóstico por RT-PCR para SARS-Cov2 com resultado a ser informado em 2 -3 dias. Para os indivíduos de Governador Valadares, será fornecido gratuitamente o resultado do exame parasitológico de fezes. Além disto, todas as avaliações realizadas inclusive o perfil inflamatório do plasma, o perfil celular de imunossenescência, o perfil da microbiota intestinal e a predição da idade biológica (epigenética) dos indivíduos analisados serão disponibilizadas ao final do estudo, mediante solicitação de quem se interessar, para o informar ao indivíduo sobre seu estado de saúde. Além disto, a participação de cada um será fundamental para descobrirmos os fatores de risco relacionados à infecção pelo SARS-Cov-2 e para a busca de novas medidas de controle dessa pandemia e de outras infecções.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo transversal, no qual serão recrutados indivíduos suspeitos de infecção pelo Cov-2 de ambos os sexos nas seguintes faixas etárias: a) 25-60 anos e b) > 60 anos, residentes nos municípios de Governador Valadares, Belo Horizonte e São Paulo. Esses dois grupos etários serão subdividido em 2 grupos de acordo com o desfecho da COVID-19 (forma leve-moderada e forma grave). Os dados clínicos dos voluntários incluindo anamnese completa contendo a história pregressa de saúde, comorbidades e uso de medicamentos serão coletados do prontuário médico disponível nos locais de recrutamento e a coleta desses dados assim como o acompanhamento clínico dos pacientes estarão a cargo dos médicos responsáveis pelo atendimento em cada um dos hospitais parceiros do estudo.

Braços do estudo:

- 20-60 anos (coleta de secreção oronasal, fezes e sangue).

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conepe@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.522.282

- Acima de 60 anos (coleta de secreção oronasal, fezes e sangue).

Patrocinador: MERCK SHARP & DOHME FARMACÊUTICA LTDA

Número de participantes incluídos no Brasil: 150

Participarão os seguintes centros de pesquisa no Brasil: Instituição Instituto René Rachou/FIOCRUZ Minas, Hospital Universitário Risoleta Tolentino Neves, Universidade Federal de Juiz de Fora UFJF, Universidade de São Paulo, Instituto de Infectologia Emílio Ribas.

Haverá armazenamento de amostras: O material biológico constituinte do Biorrepositório será mantido em freezer -80° C (plasma, fezes e células mononucleares do sangue periférico PBMC) no Laboratório de Imunobiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG), sob a coordenação da Profa. Dra. Ana Maria Caetano de Faria, até sua utilização. Isso ocorrerá com as amostras coletadas em Belo Horizonte, Governador Valadares e São Paulo que serão armazenadas até o momento de análise dos parâmetros imunológicos e genéticos como proposto no protocolo de pesquisa. O prazo de armazenamento do Biorrepositório será de, no máximo, 10 anos para todas as amostras biológicas.

Previsão de início do estudo: 01/02/2021

Previsão de encerramento do estudo: 01/09/2022.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise de respostas ao parecer pendente nº 4.515.190 emitido pela Conep em 29/01/2021:

1. Em relação ao projeto de pesquisa detalhado (arquivo intitulado "Protocolo_de_pesquisa_17_Nov_20.pdf"):

1.1. O projeto de pesquisa não é claro em definir o local onde os voluntários serão abordados para recrutamento, sendo incerto se esta etapa ocorrerá na unidade de emergência, unidade ambulatorial ou unidade de internação das instituições participantes. Solicitam-se esclarecimentos e adequação do protocolo.

RESPOSTA: No Protocolo de Pesquisa, página 16, esclarecemos o local onde os participantes serão

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF **Município:** BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.522.282

abordados e onde ocorrerá a coleta de sangue: "O local de abordagem dos futuros participantes da pesquisa serão as unidades ambulatoriais, de internação e de emergência onde eles serão atendidos. Equipes distintas do projeto de pesquisa estarão preparados para a abordagem dos indivíduos nesses locais. Para os indivíduos que procurem o atendimento com sintomas de "síndrome gripal", os locais de atendimento e recrutamento serão os ambulatórios das instituições participantes. Para os indivíduos com sintomas respiratórios graves, os locais de atendimento e recrutamento serão as unidades de emergência e de internação das instituições participantes".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Em relação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (documento intitulado "TCLE_Projeto_COVID_Imunossenescencia_V2"):

2.1. Lê-se na página 1 de 4: "O tempo de duração desta pesquisa será de 22 meses, sendo que a coleta de dados terá início em Fevereiro de 2021 e término em Novembro de 2022". O trecho, tal qual disposto, pode induzir o participante a erro, fazendo-o acreditar que sua participação no estudo será de 22 meses, quando, na verdade, o tempo refere-se ao estudo como um todo. Solicita-se adequação do trecho, tornando claro o tempo em que o participante permanecerá no estudo.

RESPOSTA: Na página 1 (item 1) foi acrescentada uma frase explicando qual o tempo de participação do voluntário na pesquisa: "A sua participação no estudo ocorrerá no período do atendimento até o desaparecimento dos sintomas da doença caso a infecção pelo SARS-CoV2 seja confirmada. Se o resultado do teste para o SARS-CoV2 for negativo, sua participação se encerrará depois da coleta do material biológico (sangue e fezes)."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.2. Lê-se na página 1 de 4: "As fezes serão coletadas por você mesmo(a) em sua casa e trazidas na próxima consulta". Levando-se em consideração que nem todos os participantes da pesquisa atendidos por suspeita de COVID-19 nas unidades de emergência terão seguimento ambulatorial (sobretudo aqueles com doenças mais leves), entende-se que o retorno ao hospital para a entrega do material biológico não faz parte da rotina assistencial, mas do protocolo de pesquisa, havendo necessidade de ressarcir os gastos relacionados. Diante do exposto, solicita-se que o pesquisador assegure o direito de ressarcimento ao participante da pesquisa (e ao acompanhante, quando for necessário) de todos os gastos decorrentes da pesquisa.

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.522.282

abordados e onde ocorrerá a coleta de sangue: "O local de abordagem dos futuros participantes da pesquisa serão as unidades ambulatoriais, de internação e de emergência onde eles serão atendidos. Equipes distintas do projeto de pesquisa estarão preparados para a abordagem dos indivíduos nesses locais. Para os indivíduos que procurem o atendimento com sintomas de "síndrome gripal", os locais de atendimento e recrutamento serão os ambulatórios das instituições participantes. Para os indivíduos com sintomas respiratórios graves, os locais de atendimento e recrutamento serão as unidades de emergência e de internação das instituições participantes".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Em relação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (documento intitulado "TCLE_Projeto_COVID_Imunossenescencia_V2"):

2.1. Lê-se na página 1 de 4: "O tempo de duração desta pesquisa será de 22 meses, sendo que a coleta de dados terá início em Fevereiro de 2021 e término em Novembro de 2022". O trecho, tal qual disposto, pode induzir o participante a erro, fazendo-o acreditar que sua participação no estudo será de 22 meses, quando, na verdade, o tempo refere-se ao estudo como um todo. Solicita-se adequação do trecho, tornando claro o tempo em que o participante permanecerá no estudo.

RESPOSTA: Na página 1 (item 1) foi acrescentada uma frase explicando qual o tempo de participação do voluntário na pesquisa: "A sua participação no estudo ocorrerá no período do atendimento até o desaparecimento dos sintomas da doença caso a infecção pelo SARS-CoV2 seja confirmada. Se o resultado do teste para o SARS-CoV2 for negativo, sua participação se encerrará depois da coleta do material biológico (sangue e fezes)."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.2. Lê-se na página 1 de 4: "As fezes serão coletadas por você mesmo(a) em sua casa e trazidas na próxima consulta". Levando-se em consideração que nem todos os participantes da pesquisa atendidos por suspeita de COVID-19 nas unidades de emergência terão seguimento ambulatorial (sobretudo aqueles com doenças mais leves), entende-se que o retorno ao hospital para a entrega do material biológico não faz parte da rotina assistencial, mas do protocolo de pesquisa, havendo necessidade de ressarcir os gastos relacionados. Diante do exposto, solicita-se que o pesquisador assegure o direito de ressarcimento ao participante da pesquisa (e ao acompanhante, quando for necessário) de todos os gastos decorrentes da pesquisa.

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.522.282

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1537837.pdf	29/01/2021 16:35:49		Aceito
Outros	Carta_CONEP_Jan_2021.pdf	29/01/2021 16:34:01	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_COVID_Imunossenescencia_V3.pdf	29/01/2021 16:32:21	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
Brochura Pesquisa	Protocolo_de_pesquisa_CONEP_29_Jan_21.pdf	29/01/2021 16:31:27	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
Outros	Termo_Biorrepositorio.pdf	18/11/2020 15:14:36	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Anuencia_Unimed.pdf	18/11/2020 15:12:03	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	18/11/2020 15:11:33	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Anuencia_IIER.pdf	17/11/2020 16:46:00	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Parecer_Projeto_Pesquisa_Ana_Faria_2020.pdf	17/11/2020 16:43:29	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Anuencia_UFJF.pdf	17/11/2020 16:33:45	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Parecer_Risoleta_Impacto_Imunossenescencia.pdf	17/11/2020 16:33:02	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
Declaração do Patrocinador	Patrocinador_60383_Faria_Committee_Decision_Letter.pdf	17/11/2020 16:30:28	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_Anuencia_FIOCRUZ_BH.pdf	17/11/2020 16:28:04	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCDU_Projeto_COVID_Nov_2020.pdf	17/11/2020 16:25:04	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito
Declaração de concordância	Termo_Anuencia_USP.pdf	17/11/2020 16:16:16	Ana Maria Caetano de Faria	Aceito

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.522.282

Situação do Parecer:
Aprovado

BRASILIA, 03 de Fevereiro de 2021

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador(a))

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

ANEXO 03: Protocolo de Coleta de *Swab* para Detecção do SARS-CoV-2



PROCEDIMENTO PARA COLETA DE AMOSTRAS

- 1 - Serão enviados pelo CT Vacinas aos locais de coleta tubos tipo "Falcon" de 15ml contendo 1,0 ml de Meio de Transporte Viral.
- 2 - O responsável pela coleta das amostras dos pacientes deverá seguir os seguintes procedimentos:
 - 1º) Após higienização das mãos abra a embalagem do Coletor Swab na ponta oposta ao algodão;
 - 2º) Faça uma coleta na nasofaringe com indicada na Figura 1 abaixo;
 - 3º) Insira o Swab submergindo totalmente na solução do tubo de Meio de Transporte Viral e aguarde 30 segundos. Após 30 segundos retire o Swab pressionando-o na parede interna do tubo (para retirar o excesso de líquido) e descarte o Swab em um local adequado;



Figura 1

- 4º) Lacre bem o tubo de Meio de Transporte Viral após coleta e identifique o tubo com a etiqueta referente ao paciente.
- 4 - Enviar as amostras para o CT Vacinas com os tubos devidamente lacrados e com a identificação de cada amostra/paciente, mantendo os tubos em posição vertical durante o transporte.
- 5 - Todo envio de amostras deverá estar acompanhado de um Formulário de Cadastro de Amostras, a ser disponibilizado com os tubos e etiquetas, no qual deverá constar as mesmas identificações descritas nos tubos de coleta e o código de barras para conferência dos dados.
- 6 - Caso não haja o envio das amostras dentro do período de 1 hora até o CT Vacinas, deverão ser armazenadas sob refrigeração entre 2 a 4°C por até 48h.

Endereço para Envio:

CT Vacinas
 Rua Professor José Vieira de Mendonça, 770,
 BH-Tec, Sala 205
 Bairro Engenho Nogueira, Belo Horizonte, MG
 CEP: 31.310-260
 Telefone: (31) 3401-1083
 E-mail: ctvacinas@gmail.com

Horário de Entrega:

Segunda a Sexta 09:00 às 17:00
 Sábados, Domingos e Feriados, a combinar.

ANEXO 04: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**1 - Identificação da pesquisa:****Título do Projeto:** Impacto do perfil de imunossenescência no desfecho da COVID19.**2 - Informações ao participante ou responsável:**

1. Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa intitulada “*Impacto da imunossenescência no desfecho da COVID-19*”. O tempo de duração desta pesquisa será de 22 meses, sendo que a coleta de dados terá início em Fevereiro de 2021 e término em Novembro de 2022. A sua participação no estudo ocorrerá no período do atendimento até o desaparecimento dos sintomas da doença caso a infecção pelo SARS-CoV2 seja confirmada. Se o resultado do teste para o SARS-CoV2 for negativo, sua participação se encerrará depois da coleta do material biológico (sangue e fezes). Caso concorde em participar desta pesquisa, ao final da leitura deste termo de consentimento você deverá assiná-lo em duas vias, sendo que uma delas ficará com os pesquisadores responsáveis e a outra via com o participante da pesquisa.

2. Essa pesquisa tem como objetivo entender quais os fatores relacionados ao envelhecimento podem contribuir para determinar a forma clínica da COVID-19 leve, moderada ou grave.

3. O envelhecimento está geralmente associado ao aparecimento de doenças inflamatórias crônicas, ao aumento da suscetibilidade a infecções e à redução na capacidade de realizar várias atividades físicas e mentais. No entanto, algumas pessoas envelhecem sem doenças e preservam muitas dessas capacidades. Chamamos esse processo de “envelhecimento saudável” e essas pessoas podem desenvolver uma forma assintomática ou leve da COVID-19 se forem infectados.

4. O médico fará perguntas a respeito da sua saúde, dos seus hábitos, da sua moradia e da sua família como parte do exame clínico a que você será submetido como rotina de atendimento. Um pesquisador também fará algumas perguntas, através de um pequeno questionário, sobre a sua alimentação. Você poderá se recusar a responder qualquer pergunta que por ventura lhe causar algum constrangimento. Um tempo de aproximadamente 15 minutos será necessário para você responder a essas perguntas e ao questionário.

5. Além do exame clínico, serão necessários alguns testes para verificar o seu estado de saúde. Esses testes serão feitos a partir da coleta de materiais biológicos: fezes (avaliação da microbiota intestinal e da presença de parasitoses intestinais), secreção nasal (para detecção do vírus Cov-2) e de sangue. As fezes serão coletadas por você mesmo(a) em sua casa e trazidas na próxima consulta. Serão fornecidas instruções do profissional da saúde sobre como coletar esse material. Todos os gastos decorrentes da coleta e entrega da amostra de fezes serão ressarcidos a você e ao seu acompanhante (quando necessário) pela equipe da pesquisa. A análise parasitológica e da microbiota serão feitas por empresas brasileiras que fazem esses tipos de análise.

Rubricas (pesquisador/participante ou responsável)

Ana Maria Otaria

O sangue será coletado do seu braço e será utilizado para a realização de outros testes como, por exemplo, o hemograma (que mostra a contagem dos glóbulos vermelhos e brancos), o teste de ELISA para medir anticorpos e outras substâncias presentes no sangue como as citocinas que irão mostrar como o seu organismo se defende de infecções, por exemplo. Será necessário coletar cerca de 40 mL do seu sangue.

Para o exame que detecta a presença do coronavírus, um membro da equipe irá coletar secreção de ambas as narinas ou da faringe utilizando um cotonete (*swab*). Esse cotonete será introduzido com cuidado e por um tempo curto, mas o processo causa algum desconforto. Depois o cotonete contendo o material coletado será introduzido em um tubo contendo solução de inativação do vírus e todo o material será enviado para o teste.

6. Haverá coleta, transporte, armazenamento e utilização desse material biológico coletado somente para fins de pesquisa sendo que esse material será destruído após a utilização ou o fim da pesquisa. Caso haja intenção de uso do seu sangue/fezes em pesquisas futuras ou compartilhamento com outras instituições você será consultado antes.

7. O sangue será coletado por profissional treinado que usará jaleco, máscara, óculos de proteção e luvas. Todo o material utilizado para a coleta é estéril e descartável. A coleta de sangue pode causar leve dor local podendo, em alguns casos, levar à formação de pequenos hematomas locais e discreto sangramento. Poderão ocorrer outros tipos de desconforto a você como tonturas e desmaios, ou desconfortos psíquicos como ansiedade e medo. Isto será levado em conta no momento da coleta e, caso seja necessário, será providenciada uma coleta na posição deitada para evitar qualquer tipo de desconforto, constrangimento ou aborrecimento. A coleta da secreção nasal ou da faringe será feita por cotonetes (*swabs*) e ela causa algum desconforto. O profissional responsável pela coleta é treinado para realizar o procedimento, a fará de maneira cuidadosa e por um tempo curto para minimizar esse desconforto. A coleta das fezes será realizada em casa por você mesmo e o material será trazido ao hospital. Essa coleta não apresenta nenhum risco para a sua saúde, mas pode lhe causar constrangimento.

8. Medidas de biossegurança são adotadas em todos os procedimentos realizados neste projeto visando salvaguardar o coletor de qualquer possibilidade de contaminação e também evitar injúria ao paciente no ato da coleta de sangue por punção venosa. Serão observadas medidas de segurança também para acidentes cortantes ou perfurantes e os riscos de contaminação são minimizados com a realização de antissepsia do ponto de punção, assepsia das mãos entre o atendimento dos pacientes e imunização ativa contra tétano, difteria e hepatite B para todos os profissionais de saúde envolvidos neste projeto. Com relação à coleta das fezes, ela não apresenta nenhum risco para a sua saúde e será realizada em sua casa para evitar qualquer tipo de constrangimento.

9. Caso os resultados dos exames laboratoriais sejam positivos para SARS-Cov2 você será informado em poucos dias. Se o exame for positivo para parasitoses, você será orientado adequadamente e encaminhado para tratamento gratuito. Os resultados relativos ao seu hemograma (contagem de células no sangue) também serão entregues a você e fornecidas explicações com relação a esses resultados.

Rubricas (pesquisador/participante ou responsável)

Anomalia@Ania

10. Você não é obrigado a fazer os exames ou a doar seu sangue. A recusa não lhe causará nenhum prejuízo, nenhum gasto e não irá alterar a forma como você será atendido na unidade de saúde ou hospital.

11. Suas amostras de sangue e fezes serão processadas no Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (em Belo Horizonte), na Universidade Federal de Juiz de Fora (em Governador Valadares) e na Universidade de São Paulo (em São Paulo) e transferidas posteriormente para armazenamento no Laboratório de Imunobiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (em Belo Horizonte), por um período máximo de 10 anos, sendo utilizadas para análises desta pesquisa. Essas amostras também poderão ser utilizadas em outras pesquisas, mas você será consultado(a) antes de isso ocorrer. As amostras serão destruídas após a realização da atual pesquisa ou, com seu consentimento, em pesquisas futuras.

12. A sua participação como voluntário não será remunerada. Será oferecido, ao participante da pesquisa, o resultado do exame de PCR para SARS-Cov2 em poucos dias e também o acesso a todas as informações sobre a sua saúde imunológica (que será examinada pelos testes que faremos ao longo do projeto). Esses resultados serão entregues a você ao final do estudo, caso você queira requisitá-los à equipe da pesquisa. O contato com a equipe e o prazo para essa requisição serão entregues a você após o atendimento. Serão garantidos também todos os cuidados necessários para sua participação de acordo com seus direitos individuais e respeito ao seu bem-estar físico e psicológico e você poderá retirar-se desta pesquisa em qualquer momento, sem que isto lhe cause qualquer prejuízo ou constrangimento. Todos os participantes terão direito a receber indenização por quaisquer danos à sua saúde comprovadamente provenientes dos procedimentos relacionados à pesquisa.

13. Este estudo contribuirá para a identificação de fatores biológicos responsáveis pelas formas leves ou graves da doença causada pelo vírus SARS-Cov-2.

14. Serão garantidos o sigilo e a privacidade das informações, sendo reservado a você o direito de não se identificar.

15. Na apresentação dos resultados, seu nome não será citado, nem daquele pelo qual você é responsável. Sua identificação será mantida em sigilo durante todo o estudo e apenas a coordenadora do projeto manterá essa informação guardada em arquivo seguro.

16. A sua participação é importante, pois auxiliará na busca dos fatores envolvidos no desenvolvimento das formas leves ou graves da COVID-19 e na elaboração de medidas que ajudem a identificar os indivíduos que desenvolverão a forma grave de forma rápida. Isto possibilitará o tratamento da doença no seu início melhorando as chances de boa recuperação.

17. Caso queira, você também pode tirar dúvidas sobre o projeto com as pesquisadoras responsáveis Dra. Ana Maria Caetano de Faria (coordenadora geral do projeto e professora da UFMG) no telefone/whatsapp (31) 99741-0793 Dra. Gabriela Silveira Nunes Abreu (coordenadora do projeto em Governador Valadares e professora da UFJF) no telefone/whatsapp (33)99180-0050; ou Dra. Rosana Richtmann (médica infectologista responsável pelo atendimento no Instituto de Infectologia Emilio Ribas em São Paulo) no telefone/whatsapp (11) 99944-4507.

Rubricas (pesquisador/participante ou responsável)

Ana Maria Caetano

Nome do Participante: _____

Eu _____, concordo em participar da pesquisa, sob a responsabilidade dos coordenadores deste projeto, de forma livre e voluntária. Declaro que fui devidamente informado (a) sobre a pesquisa, assim como sobre os possíveis riscos e benefícios da mesma. O sigilo e a possibilidade de retirada do estudo também me foram devidamente informados.

Consentimentos Opcionais:

- Eu concordo que meu material biológico seja utilizado apenas para esta pesquisa.
- Eu concordo que meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisas também, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro TCLE, que dará explicações sobre como e para que o meu material biológico será utilizado.
- Eu autorizo os pesquisadores envolvidos na pesquisa a consultarem os dados do meu prontuário médico para obter informações referentes à minha saúde. Essas informações permanecerão sigilosas e sob a guarda do pesquisador responsável pelo estudo.

Governador Valadares/Belo Horizonte/São Paulo, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do Participante ou Responsável

Ana Maria Caetano de Faria

Assinatura do Coordenador do Projeto de Pesquisa

Identificação do Responsável pela Pesquisa

<p>Pesquisador Responsável: Profª. Dra. Ana Maria Caetano de Faria</p>
<p>Instituição de Origem da Pesquisa: Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG Instituto de Ciências Biológicas Departamento de Bioquímica e Imunologia Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG Tel: 31-3409-2630 / 2640 Fax: 31- 3409-2640</p>
<p>Comitê de Ética em Pesquisa: Comitê de Ética da UFMG Av. Pres. Antonio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 - CEP: 31270-901 - Belo Horizonte - MG Telefax: (031) 3409-4592 - e-mail: coep@prpq.ufmg.br</p>

Ana Maria Caetano de Faria

ANEXO 05: Questionário Clínico e Sociodemográfico

QUESTIONÁRIO CADASTRAL E CLÍNICO – PROJETO COVID-19 E ENVELHECIMENTO

Nº do atendimento _____

- 1) Código da pesquisa: _____
- 2) Nome: _____
- 3) Telefones: () _____ () _____ () _____
- 4) Endereço: _____ Nº: _____
Complemento: _____ Bairro/Cidade: _____
- 5) Sexo: () Masculino () Feminino
- 6) Idade ou data de nascimento: _____ ou ____/____/____
- 7) Como você se classifica em termos de cor ou raça?
() Preta () Parda () Branca () Amarela () indígena
- 8) Pessoa em situação de rua? () Não () Sim
- 9) Profissão: _____
- 10) Além de você, quantas pessoas moram na sua casa? _____
- 11) Quantos cômodos tem na sua casa? _____
- 12) Escolaridade (estudou até que série)?
() sem escolaridade
() ensino fundamental incompleto () ensino fundamental completo
() ensino médio incompleto () ensino médio completo
() superior incompleto () superior completo
() pós-graduação incompleta () pós-graduação completa
- Nas últimas duas semanas você teve:
- 13) Febre? () Sim. Há quantos dias? _____ () Não
- 14) Dor nos olhos? () Sim. Há quantos dias? _____ () Não
- 15) Dor de cabeça? () Sim. Há quantos dias? _____ () Não
- 16) Dor de garganta? () Sim. Há quantos dias? _____ () Não
- 17) Tosse? () Sim. Há quantos dias? _____ Com catarro? () Sim ou () Não () Não
- 18) Dificuldade para respirar? () Sim. Há quantos dias? _____ () Não
- 19) Sentiu menos cheiro? () Sim. Há quantos dias? _____ () Não
- 20) Nariz escorrendo/coriza? () Sim. Há quantos dias? _____ () Não
- 21) Nariz entupido/congestão nasal? () Sim. Há quantos dias? _____ () Não
- 22) Sentiu menos gosto? () Sim. Há quantos dias? _____ () Não
- 23) Perda de apetite? () Sim. Há quantos dias? _____ () Não
- 24) Náusea/enjoo? () Sim. Há quantos dias? _____ () Não
- 25) Vômito? () Sim. Há quantos dias? _____ () Não
- 26) Diarreia? () Sim. Há quantos dias? _____ () Não
- 27) Dor no peito ou costas? () Sim. Há quantos dias? _____ () Não
- 28) Coração acelerou/disparou, palpitação ou bateteira? () Sim. Há quantos dias? _____ () Não
- 29) Fadiga/cansaço? () Sim. Há quantos dias? _____ () Não
- 30) Dor muscular? () Sim. Há quantos dias? _____ Qual(is) local(is)? _____ () Não
- 31) Dor nas articulações? () Sim. Há quantos dias? _____ Qual(is) local(is)? _____ () Não

Você tem?

- 32) Hipertensão/pressão alto? () Sim () Não
- 33) Outra doença no coração? () Sim () Não
- 34) Diabetes/açúcar no sangue? () Sim () Não
- 35) Asma? () Sim () Não
- 36) Bronquite? () Sim () Não
- 37) Enfisema? () Sim () Não
- 38) DPOC? () Sim () Não
- 39) Câncer (qualquer tipo)? () Sim () Não
- 40) Insuficiência renal crônica/doença crônica nos rins? () Sim () Não
- 41) Outra doença crônica? () Sim () Não

42) Como tem sido sua rotina de atividades nas últimas duas semanas?

- () Fica em casa o tempo todo
- () Sai apenas para coisas essenciais, como comprar comida
- () Sai de vez em quando para diversas compras e outras atividades
- () Sai todos os dias para trabalhar ou outra atividade regular ou convive na rua

43) Além das pessoas que moram com você, mais alguém te visitou na sua casa nas últimas duas semanas? () Sim () Não

44) Conhece alguém que teve COVID-19? () Sim () Não

45) Teve contato com alguém que teve COVID-19? () Sim () Não

46) Ao sair de casa você usa máscara de forma correta (tampando boca e nariz):

- () Todas as vezes () A maioria das vezes () Mais ou menos () Poucas vezes () Não uso máscara

47) Como ficou a situação de trabalho e remuneração durante a pandemia?

- () Não teve alteração
- () Redução de carga horária sem prejuízo no salário
- () Redução de carga horária com prejuízo no salário
- () Antecipação de férias
- () Demissão
- () Aposentado
- () Pensionista
- () Recebeu benefício do governo
- () Já estava desempregado
- () Outro _____

48) Faz uso de qual tipo de transporte?

- () Ônibus/Van
- () Carro ou moto pessoal
- () A pé
- () Outros _____

52) CPF: _____
53) ID: _____ 54) Estado Civil: _____
55) Possui filhos? () Sim, quantos? _____ () Não
56) Renda: _____
57) Onde já morou? _____

58) Faz uso de alguma medicação? _____

59) Possui casa própria? () Sim () Não
60) Possui saneamento básico? () Sim () Não
61) Parto ao nascer: () Cesária () Normal () Não sabe
62) Peso: _____ kg 63) Alt.: _____ m IMC: _____
64) Escala de fragilidade _____
65) Está em jejum? () Sim () Não 66) Instituição: _____

49) Alguma pessoa que mora na mesma casa testou positivo e participou a pesquisa? () Sim () Não

50) Qual nome? _____

51) Tomou a vacina contra COVID-19? () Sim Dose? _____ () Não Qual? _____

ANEXO 06: Questionário Clínico e Sociodemográfico (Versão Resumida)



**PROJETO ENVELHECIMENTO E COVID-
19 FICHA DE COLETA**

Dados Pessoais

Data: ____/____/____ **CPF:** _____

Nome: _____

Telefone: _____

Data de nascimento: ____/____/____ **Idade:** _____

Sexo: () Masculino () Feminino

Tipo sanguíneo: () Não sei () Sim, qual: _____

Nascimento: () Parto normal () Parto cesariana () Não sabe

Residência:

() Governador Valadares () Outro: _____

Morou em outros locais?:

() Não () sim; onde _____

Peso: _____ **Altura:** _____

PA: _____ **SatO2:** _____ **Temperatura:** _____

Sintomas: _____

Início dos sintomas: _____

Histórico prévio de Covid: () Não () Sim: Quando: _____

Tomou algum medicação de tratamento precoce para covid (cloroquina/ivermectina ou outros):

() não () sim;

Se sim, quais: _____

Comorbidades Gerais:

- Diabetes Doença autoimune (Lupus, esclerose múltipla, etc)
- Doenças neurológicas (Parkinson, etc) Demência
- Outras

Arboviroses

- Dengue Quantas vezes já pegou? _____
- Zika
- Chikungunya
- Febre Amarela Está vacinado? Sim Não

Doenças cardiovasculares:

- Angina Batimentos cardíacos irregulares
- Hipertensão Insuficiência cardíaca
- Outra _____

Se sim: tratada? sim não

Doenças respiratórias crônicas:

- DPOC Asma Outra

Se sim: tratada? sim não

Histórico de medicações

Medicação regular (diariamente):

- não sim;

Se sim, quais: _____

Estilo de vida

Fumante: não sim quanto _____

Etilista: não sim; quanto _____

Atividade física: não sim; quanto _____

Escolaridade:

- Nunca estudou
- Ensino fundamental incompleto Ensino fundamental completo
- Ensino médio incompleto Ensino médio completo
- Ensino superior incompleto Ensino superior completo

Renda:

- Até R\$ 800,00
- De R\$ 800,00 a R\$ 2.000,00
- De R\$ 2.000,00 a R\$ 5.000,00
- Acima de R\$ 5.000,00

ANEXO 07: Questionário Telemonitoramento Clínico

Nome/código: _____

Data: __/__/____ Dia do telemonitoramento: _____

1 Nas últimas 24h você apresentou alguns dos sinais e sintomas ou teve alguma melhora ou piora?

- a) **Tosse** () Não apresentou () Apresentou - 1ª vez [] sim [] não - () Melhorou () Piorou
a. () Com secreção () Sem secreção
- b) **Dor na garganta** () Não apresentou () Apresentou - 1ª vez [] sim [] não - () Melhorou () Piorou
- c) **Dificuldade para respirar** () Não apresentou () Apresentou - 1ª vez [] sim [] não - () Melhorou () Piorou
- d) **Dor no peito/Dor no tórax** () Não apresentou () Apresentou - 1ª vez [] sim [] não - () Melhorou () Piorou
- e) **Coriza** () Não apresentou () Apresentou - 1ª vez [] sim [] não - () Melhorou () Piorou
- f) **Sentiu menos o cheiro das coisas** () Não apresentou () Apresentou - 1ª vez [] sim [] não - () Melhorou () Piorou
- g) **Congestão nasal/nariz entupido**() Não apresentou () Apresentou - 1ª vez [] sim [] não - () Melhorou () Piorou
- h) **Sentiu menos o gosto das coisas** () Não apresentou () Apresentou - 1ª vez [] sim [] não - () Melhorou () Piorou
- i) **Teve enjojo** () Não apresentou () Apresentou - 1ª vez [] sim [] não - () Melhorou () Piorou
- j) **Vomitou** () Não apresentou () Apresentou - 1ª vez [] sim [] não - () Melhorou () Piorou
- k) **Teve diarreia** () Não apresentou () Apresentou - 1ª vez [] sim [] não - () Melhorou () Piorou
- l) **Dor de cabeça** () Não apresentou () Apresentou - 1ª vez [] sim [] não - () Melhorou () Piorou
- m) **Febre** () Não apresentou () Apresentou - 1ª vez [] sim [] não - () Melhorou () Piorou
- n) **Cansaço/fadiga** () Não apresentou () Apresentou - 1ª vez [] sim [] não - () Melhorou () Piorou
- o) **Dor nos olhos?**() Não apresentou () Apresentou - 1ª vez [] sim [] não - () Melhorou () Piorou

- p) **Dor muscular?** () Não apresentou () Apresentou - 1ª vez [] sim [] não - () Melhorou () Piorou
- q) **Coração acelerou** () Não apresentou () Apresentou - 1ª vez [] sim [] não - () Melhorou () Piorou

2 Tem alguma(s) doença(s) crônica que faz uso diário de medicação?

() Não () Sim

- a) **Se sim, qual(ais) doença?** _____
- b) **Está tomando os remédios?** () Sim () Não
- a. **Se não, explique o motivo**
- 2.b.a () Acabaram os remédios
- 2.b.b () Não tem dinheiro para comprar os remédios
- 2.b.c () a Farmácia da Unidade Básica de Saúde não estão entregando
- c) **Se sim, quais remédios você toma?**

- d) **Está tomando algum medicamento fora da rotina?** () Não () Sim, qual?

3 Saiu de casa após o atendimento na UPA e/ou confirmação do teste PCR?

() Sim () Não

Se sim, explique o motivo da saída da casa.

- a) () Foi ao supermercado
- b) () Foi a farmácia
- c) () Foi à igreja
- d) () Foi ao banco ou lotérica
- e) () Foi ao salão/barbearia
- f) () Foi ao restaurante ou lanchonete
- g) () Foi à loja de roupa ou calçado
- h) () Foi ao hospital ou unidade básica de saúde ou UPA
- i) () Foi casa de algum familiar, amigo ou colega
- j) () Outra opção, qual? _____

3.1 Se saiu de casa por algum motivo você:

- a) () Usou máscara
- b) () Usou álcool em gel

c) Manteve distanciamento de no mínimo 2 metros

4 Como você classifica seu estado emocional?

Bom Regular Ruim

5 Como você classifica seu estado geral?

Bom estado geral Regular estado geral Mal estado geral

6 Alguém que mora com você, na mesma casa, teve COVID antes de você?

Não Sim - Se sim, quantas pessoas? _____

a) Eles fizeram algum exame?

Não Sim - Se sim, qual exame? teste rápido Swab/RT-PCR De sangue/Sorologia

7 Alguém que mora com você, na mesma casa, apresentou algum sinal ou sintoma da COVID depois de você?

Não Sim - Se sim, quantas pessoas?

a) Eles fizeram algum exame?

Não Sim - Se sim, qual exame? teste rápido Swab/RT-PCR De sangue/Sorologia

8 De maneira geral, você diria que sua saúde esteve na última semana (perguntar uma vez por semana):

Muito boa Boa Razoável Ruim Muito ruim

ANEXO 08: Protocolo de Coleta de Sangue

	LABORATÓRIO DE IMUNOBIOLOGIA DA UFMG	POP: 02-VERSÃO: 01
TEMA: COLETA DE SANGUE PARA PBMC		CRIADO EM: 10/01/21
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		
<p>1 DEFINIÇÕES</p> <p>A coleta de sangue é um procedimento pouco invasivo feito por profissionais qualificados, porque além das questões técnicas do procedimento, é necessário entender o processo de análise daquele material para que a coleta seja adequada.</p> <p>2 OBJETIVO</p> <p>Instruir de forma correta e padronizada as coletas de sangue que visam a obtenção de PBMC (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>), Plasma e Soro.</p> <p>3 PROCEDIMENTO</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Preencher a etiqueta do tubo com os dados do paciente. 2. Verificar e apalpar as veias do paciente em ambos os braços, analisando qual estaria mais adequada para realização da coleta. 3. Após escolher a veia, encaixar a agulha no adaptador (canhão) sem remover a tampa da agulha. 4. Colocar o garrote, sempre atento ao tempo de garroteamento (no máximo 1 minuto). 5. Desinfetar o local da punção, fazendo uso de um algodão embebido em álcool 70%. De preferências, fazer movimentos paralelos verticais. 6. Retirar a tampa da agulha. 7. Realizar a punção, sempre seguindo a direção que a veia está no braço. 8. Inserir os tubos à vácuo na seguinte ordem: 1)- HEPARINA (TAMPA VERDE), 2)- HEPARINA (TAMPA VERDE), 3)- HEPARINA (TAMPA VERDE), 4)- ATIVADOR DE COÁGULO (TAMPA VERMELHO) e 5)- CITRATO (TAMPA AZUL). 9. A cada tubo coletado, invertê-lo de 5 a 6 vezes para que se misture ao anticoagulante. 10. Retirar o escalpe. 11. Retirar o último tubo antes de retirar a agulha do braço do paciente. 12. Retirar a agulha. 13. Pressionar por 1 minuto o local da coleta com um algodão seco. 14. Colocar um curativo (<i>Blood-Stop</i>) no local onde a punção foi realizada. 		
CRIADO POR: LUCAS HANIEL A. VENTURA.		1
CORRIGIDO POR: LUCAS HANIEL A. VENTURA		

**LABORATÓRIO DE IMUNOBIOLOGIA DA UFMG****POP: 02-VERSÃO: 01****TEMA: COLETA DE SANGUE PARA PBMC****CRIADO EM: 10/01/21****PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO**

É muito importante ressaltar:

- O profissional que fará a coleta do sangue precisa obrigatoriamente fazer uso de EPIs (Equipamentos de Proteção Individual).
- Precisa coletar o máximo de material nos tubos de heparina (tampa verde).
- Caso não tenha conseguido coletar algum tubo de heparina (tampa verde), tente fazer uma nova punção. Caso mesmo com uma nova punção não tenha conseguido coletar, finalize.
- Cada material coletado é muito importante, porém coloque sempre o paciente em primeiro lugar.
- Caso o volume de sangue seja insuficiente no último tubo (citrato – tampa azul), descarte-o e finalize.

4 REFERÊNCIAS

BECTON AND DICKINSON BRASIL (BD), 2021;

OLEN - Análises Clínicas. Tubos para Coleta de Sangue A Vácuo – Ativador de Coágulo. 2021.

CRIADO POR: LUCAS HANIEL A. VENTURA.**CORRIGIDO POR: LUCAS HANIEL A. VENTURA**

2

ANEXO 09: Protocolo para Obtenção de Soro/Plasma

	LABORATÓRIO DE IMUNOBIOLOGIA DA UFMG	POP: 04-VERSÃO: 01
	TEMA: OBTENÇÃO DE SORO/PLASMA	CRIADO EM: 14/01/21

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

1 DEFINIÇÕES

O plasma é caracterizado como a parte líquida do sangue contendo principalmente proteínas, sais minerais e gases em sua composição. A única diferença do plasma para soro são os chamados fatores de coagulação, que estão presentes no soro. A escolha do anticoagulante para obtenção do plasma é muito importante para a fase analítica, tendo impactos diretos nos resultados do processamento das amostras.

2 OBJETIVO

Separar e obter o soro/plasma de forma correta, cuidadosa e padronizada.

3 PROCEDIMENTO

1. Pesar os tubos com as caçapas.
2. Centrifugar a 3000 RPMs, por 10 minutos, a 20°C, com 9 de aceleração e 4 de desaceleração.
3. Retirar as amostras da centrífuga e levar para o fluxo laminar.
4. Retirar o plasma e o soro fazendo o maior número de alíquotas possível.

- O soro originado do tubo com ativador de coágulo (tampa vermelha), é dividido em 2 alíquotas que variam, em média, 1mL por alíquota. **Ao retirar o soro ou plasma, JAMAIS misture-os com os sedimentos do sangue, isso poderá prejudicar a fase analítica e conseqüentemente os resultados.** (1 tubo de 4mL coletado).

O plasma originado do tubo com anticoagulante heparina (tampa verde), é dividido 6 alíquotas de 2mL cada, portanto cerca de 2 alíquotas por tubo de 10mL. (3 tubos de 10mL coletados).

O plasma originado do anticoagulante citrato (tampa azul), é dividido em 3 alíquotas de no mínimo 600µL cada. (1 tubo de 4mL coletado).

5. Armazenar as alíquotas de soro e plasma em freezer -80°C.

As amostras podem ficar acondicionadas em geladeira (2°C - 8°C) por até 24h. Depois precisam ser armazenadas a -80°C.

CRIADO POR: LUCAS HANIEL A. VENTURA.

CORRIGIDO POR: LUCAS HANIEL A. VENTURA

**LABORATÓRIO DE IMUNOBIOLOGIA DA UFMG**

POP: 04-VERSÃO: 01

TEMA: OBTENÇÃO DE SORO/PLASMA

CRIADO EM: 14/01/21

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO**Observações:**

- Sempre identificar os eppendorfs com as amostras, assim como a caixa para seu armazenamento.
- Sempre abrir e manusear as amostras dentro do fluxo laminar.
- Realizar o descarte correto do material biológico.
- Sempre fazer uso de EPIs.

4 REFERÊNCIAS

Laboratório de Biomarcadores (GIPB). IRR – Instituto René Rachou FIOCRUZ-MG.

CRIADO POR: LUCAS HANIEL A. VENTURA.**CORRIGIDO POR:** LUCAS HANIEL A. VENTURA

ANEXO 10 – Artigo Submetido com Dados Presentes Neste Estudo**COVID-19 INDUCES SENESCENCE AND EXHAUSTION OF T CELLS IN PATIENTS WITH MILD/MODERATE AND SEVERE DISEASE DURING A SEVEN-DAY INTERVAL**

RODRIGO BALSINHA PEDROSO¹, LUCAS HANIEL ARAÚJO VENTURA²,
LÍCIA TORRES², GIOVANNA CALIMAN CAMATTA², FELIPE CAIXETA²,
LEANDRO SOUZA NASCIMENTO², CATARINA MOTA¹, ANA CATARINA
MENDES¹, FILIPA RIBEIRO¹, HENRIQUE CERQUEIRA GUIMARÃES⁴, RAFAEL
CALVÃO BARBUTO⁴, GABRIELA SILVEIRA-NUNES³, ANDREA TEIXEIRA-
CARVALHO⁵, LUIS GRAÇA^{1*}, ANA MARIA CAETANO FARIA^{2*}.

¹ Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina (IMM), Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

² Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

³ Departamento de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares (UFJF-GV), MG, Brazil.

⁴ Hospital Risoleta Tolentino Neves, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁵ Instituto de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-MG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

* Joint senior authors.

Corresponding authors: Luis Graca (lgraca@medicina.ulisboa.pt) and Ana M.C. Faria (anacaetanofaria@gmail.com)

Abstract

Risk factors for the development of severe COVID-19 include several comorbidities, but age was the most striking one since elderly people were disproportionately affected by SARS-Cov-2. Major drivers that can explain this markedly unfavourable response in the elderly are inflammaging and immunosenescence. Recent reports have shown that the relationship between immunosenescence and COVID-19 can be bidirectional, since hospitalized patients with severe COVID-19 have an accumulation of senescent T cells suggesting that immunosenescence can be also exacerbated by SARS-CoV-2 infection. Therefore, the present work was designed to examine the emergence of immunosenescence in a longitudinal study in two distinct cohorts of COVID-19

35 patients, and to determine whether the senescence alterations were restricted to severe
36 cases of the disease. Our data, with patients from Portugal and Brazil, identified their
37 distinctive inflammatory profile and provided evidence of increased frequencies of
38 senescent and exhausted T cells within a seven-day period in patients with mild to
39 severe COVID-19. These results support the view that SARS-CoV2 infection can
40 accelerate immunosenescence in both CD4 and CD8 T cell compartments in a short
41 period of time.

42

43 **Key words:** COVID-19, immunosenescence, T cell exhaustion, T cell senescence,
44 inflammatory cytokines, inflammaging

45

46 **Running Title:** COVID-19 induces rapid T cell senescence.

47

48 **Introduction**

49 Since 2019 when it first started in China, the Corona Virus Disease-2019 (COVID-19)
50 pandemic caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-Cov-
51 2) has been responsible for the death of more than 6 million people worldwide (WHO,
52 2020a). Clinical manifestations of COVID-19 range from asymptomatic to severe
53 pneumonia associated with extensive immune-inflammatory response, a clinical
54 condition that can lead to multiorgan failure and prolonged complications (Osuchowski
55 et al, 2021).

56 Risk factors for the development of severe COVID-19 include obesity, diabetes, high
57 blood pressure, male sex, and age, with the latter being the most striking, since elderly
58 people were disproportionately affected by SARS-Cov-2 (Li et al, 2020; Guo et al,
59 2020; Rahman & Sathi, 2020; Xu & Chen, 2020; Wu et al, 2020; Zhou et al, 2020).
60 Among the reasons for this markedly unfavourable response in the elderly,
61 immunosenescence and *inflammaging* are major drivers of this outcome (Mueller,
62 McNamara, Sinclair, 2020; Camell et al, 2021). Immunosenescence is the aging of the
63 immune system and is mainly characterized by a decrease in naïve T cell numbers
64 together with an accumulation of CD4⁺ and CD8⁺ memory and terminal effector T cells,
65 resulting in increased vulnerability to infections and impaired response to vaccination
66 (Hassoueneh et al, 2016; Fulop et al, 2018; Aiello et al, 2019). Moreover, aging T
67 lymphocytes like other senescent cells tend to develop a secretory-associated senescent
68 phenotype (SASP), characterized by the production and secretion of IL-6, IL-1, IL-8,

69 IL-18, and TNF along with other inflammatory mediators. Senescent cell accumulation
70 as well as other aging-related disturbances (mitochondrial dysfunction, dysbiosis of
71 microbiota, innate immune responses) lead to a chronic low grade inflammatory state
72 known as *inflammaging* (Fulop et al, 2018; Batista et al, 2020; Heath and Grant, 2020).
73 Continuous immune dysregulation induced by prolonged exposure to infectious and
74 non-infectious antigens can also drive immune cell aging, since the accumulation of
75 inflammatory mediators secreted in response to consecutive infections further
76 contributes for the impairment of the adaptive immune response, boosting
77 immunosenescence and *inflammaging* (Fulop et al, 2018; Goronzy & Weyand, 2019;
78 Elyahu & Monsonego, 2021). Chronic infections, including those caused by the human
79 cytomegalovirus (CMV), HIV, hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus
80 (HPV), are sources of constant stimulation to the immune system, resulting in the
81 accumulation of terminally differentiated senescent T cell populations and,
82 consequently, immunosenescence (Solana et al, 2012; Fulop, Larbi, Pawelec, 2013).
83 Similarly, although it is not a persistent infection, SARS-Cov-2 can also trigger the
84 accumulation of exhausted and senescent T cell phenotypes due to its extensive
85 activation and clonal expansion (Diao et al, 2020; Zheng et al, 2020b). Recent
86 publications have shown that severe COVID-19 patients presented an increased
87 frequency of terminally differentiated CD4 and CD8 T cells when compared to controls
88 matched for sex and age (Zheng et al, 2020a; Arcanjo et al, 2021). However, there is no
89 longitudinal study clearly demonstrating that SARS-CoV-2 infection leads to
90 accelerated immunosenescence in distinct populations and in different forms of
91 COVID-19.

92 In this study, we investigated the evolution of the inflammatory response and
93 immunosenescence of COVID-19 patients from Belo Horizonte, Brazil, and Lisbon,
94 Portugal. Blood samples were collected during ambulatory care or hospitalization, and
95 one week later, allowing the evaluation of the impact of the disease over a period of
96 seven days. Our results showed that SARS-CoV-2 infection induces T cell senescence
97 in both populations in a short period of time, in both moderate and severe cases, with
98 this effect being more prominent in the latter.

99

100 **Materials and Methods**

101 *Ethics statement*

102 The research protocol was approved by the National Research Ethics Commission
103 (CONEP # 5.190.260) of Brazil and by the Lisbon Academic Medical Center Ethics
104 Committee (ref. no. 306/20). The study was conducted in accordance with the Helsinki
105 Declaration for research involving humans. All participants, including healthy controls,
106 agreed to participate voluntarily in this study without financial support and signed an
107 informed consent.

108

109 *Study design*

110 This longitudinal study was performed at two healthcare centres: Centro Hospitalar
111 Universitário Lisboa Norte (CHULN) in Lisbon, Portugal, and Hospital Risoleta
112 Tolentino Neves in Belo Horizonte, Brazil. Non-vaccinated patients were recruited
113 within the first three days of hospitalization or while in ambulatory care, after
114 presenting a positive nasopharyngeal swab test for SARS-CoV-2 by real-time reverse
115 transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) performed upon admission at the
116 health care units. A total of 20 infected patients from Lisbon and 10 from Belo
117 Horizonte agreed to participate in this study. For the longitudinal follow-up, blood
118 samples were collected at the time of enrolment (T0) and seven days later (T7). Each
119 city had a control group formed according to the following criteria: testing negative for
120 COVID-19 in the RT-PCR test and not having presented any symptom the week before
121 blood sample collection. Individuals with prior inflammatory diseases, such as cancer
122 and renal failure were excluded. Data collection was carried out between August and
123 October 2020 in Lisbon and June and August in Belo Horizonte.

124 Disease severity classification was based on the WHO criteria (WHO, 2020b). Mild
125 cases were considered asymptomatic or those treated in an outpatient clinic. Moderate
126 cases included hospitalized patients without oxygen support or using a low to moderate
127 flow oxygen by mask or nasal prongs. Severe cases were characterized as the need for
128 high flow oxygen, mechanical ventilation, vasopressors, dialysis, or extracorporeal
129 membrane oxygenation (ECMO) (WHO, 2020b).

130

131 *Blood collection and isolation of PBMCs*

132 Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by blood collection from
133 COVID-19 patients and healthy controls using heparinized vacuette tubes. The
134 purification was attained by Ficoll gradient (Histopaque-1077; Sigma, cat #10771)
135 centrifugation at room temperature, in a 1:2 ratio, for 40 minutes, at 600xg and without

136 brake-induced end-centrifugation deceleration phase. After that, the PBMCs were
137 collected and washed with Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 basal
138 medium. Red blood cells were lysed using a lysis buffer. Cells were counted and stored
139 in fetal bovine serum supplemented with 10% dimethyl sulfoxide at -80 °C until further
140 use. Blood serum was also obtained by centrifuging whole blood collected in sera tubes
141 for 10 minutes at 500xg.

142

143 *Immunophenotype by polychromatic flow cytometry*

144 PBMCs (1×10^6) were first stained with LIVE/DEAD fixable aqua dead cell stain
145 (ThermoFisher Scientific, cat #L34957) and antibodies fluorophore-conjugated human to
146 surface markers. anti-CD8 (RPA-T8, cat# 562282), -CD4 (SK3, cat# 557852), -CD25
147 (M-A251, cat# 555432), -CD278 (ICOS; DX29, cat# 562833), -CD57 (NK-1, cat#
148 563896), -CD279 (PD-1; EH12.1, cat# 563245), -TIGIT (741182, cat# 747840), -CD28
149 (CD28.2, cat# 561368), -CD45RO (cat# 304234), -CD3 (cat# 317340), -CCR7 (cat#
150 353216) and -KLRG1 (cat# 138427).

151 After the surface staining, cells were fixed and permeabilized using the
152 Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set from eBioscience (cat #00-5523-00)
153 and stained for -Foxp3 from ImmunoTools (3G3, cat# 21276106). Single colors for
154 fluorescence compensation were prepared with antibody capture compensation beads
155 (BD Biosciences). Cell samples were acquired in a BD LSRFortessa cell analyzer (BD
156 Biosciences) coupled to computers with DIVA and FlowJo-10 *software* (Tree Star).

157

158 *Luminex-Multiplex measurement of serum cytokines, chemokines, and growth factors*

159 A Bio-Rad Laboratories kit (Bio-Plex Pro Human Cytokine Standard) was used to
160 analyse multiple serum mediators simultaneously with the Bio-Plex 200 system from
161 Bio-Rad, following storage and processing protocols standardized by the Laboratory of
162 Biomarkers (IRR-FIOCRUZ/MG). Samples were transported and stored at a
163 temperature of -80°C. Analyzes were performed using Bioplex™ xPONENT version
164 3.1 software (Bio-Rad) and included the following panel of analytes: IL-1 β , IL-1ra, IL-
165 2, IL-4, IL-5, IL-6, CXCL-8 (IL-8), IL-10, IL-12p70, IL-13, GM-CSF, IFN- γ , CCL-2
166 (MCP-1) and TNF- α . The panel of biomarkers included in the kit and their standard
167 settings is presented in Supplementary Table 1.

168

169 *Statistical analysis*

170 Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 *software* (GraphPad
171 Software, San Diego, CA, USA). All data acquired from Luminex-Multiplex were
172 converted to logarithmic scale to normalize the data, and a lognormality test was
173 performed to confirm data normality. Wilcoxon test was applied in non-parametric data
174 to compare samples of the same patient at T0 and T7. Student's t-test was used for
175 analysing parametric data.

176 Radar plots highlight the contribution of different cytokines to immunological profile.
177 This analysis allows to convert quantitative cytokine measurements into a categorical
178 variable of low and high cytokine producers as previously proposed by Luiza-Silva et
179 al. (2011). Briefly, this approach categorizes each subject as "Low" or "High" cytokine
180 producer, taking the global median value as a specific cut-off edge for each cytokine.
181 For the calculation of the global median the whole universe of data obtained for the
182 groups was considered. Following data categorization, the frequency of "High Cytokine
183 Producers" was calculated for each group. On radar charts, each axis represents the
184 percentage (%) of volunteers categorized as "High Cytokine Producers" in each group.
185 Then, connecting the values of each axis forms a central polygonal area that represents
186 the immunological profile. Relevant productions were considered when the percentage
187 of "High Cytokine Producers" of a given cytokine was greater than 50%.

188 The correlation matrix was built using the `cor()` function of the statistical analysis
189 package `stats v3.6.2` available in the R v4.0 environment. Spearman's correlation was
190 used considering the non-parametric nature of the data, considering only correlations
191 with $p < 0.05$.

192 Statistical analysis of data on frequencies of T cell subsets obtained by flow cytometry
193 was performed using the nonparametric Wilcoxon rank-sum. $P < 0.05$

194

195 **Results**

196 The study included 20 individuals with severe cases of COVID-19 from Lisbon, and 8
197 individuals with mild to severe cases from Belo Horizonte. The median age of
198 individuals in the infected groups was 69 (IQR 60.0 – 84.3 years) and 42.5 years old
199 (IQR 35.8 – 54.5 years) in Lisbon and Belo Horizonte, respectively. The number of
200 female participants was higher in both control groups when compared to infected
201 patients. The prevalence of comorbidities was higher in the Portuguese population, and
202 hypertension was the most prevalent among infected patients in both cities. Deaths and
203 missing samples were only registered in Lisbon (Table 1).

204

205 *The inflammatory profiles of COVID-19 patients were distinct in the two cohorts*

206 Severe COVID-19 has been reported to be associated with accelerated senescence (Diao
207 et al, 2020; Zheng et al, 2020). In order to understand the immunological profile
208 expressed by the cohorts, we first compared the global production of inflammatory
209 mediators between controls and infected patients in time zero (T0) and time seven (T7).
210 As presented in radar charts (Fig. 1A), there was an overall increase in the frequency of
211 high producers of serum mediators in the infected group from Portugal in T0 when
212 compared to the control group, confirming the ongoing response to the infection.
213 Notably there was an increase in the frequency of high producers of mediators involved
214 in inflammatory response, such as IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF, CXCL-5. Seven days after
215 hospitalization, the immune response was still more prominent than in non-infected
216 individuals, despite the reduction in the frequency of high producers of IL-4, CCL-2,
217 IFN- γ and TNF, possibly indicating a tendency towards resolution of the inflammatory
218 response. Corroborating this result, a significant reduction in the production of CCL-2,
219 IFN- γ , IL-6 and IL-10 was also observed (Fig. 1B).

220 Similar to the analysis conducted for Lisbon patients, to assess whether a population
221 composed of younger individuals from Brazil, who developed moderate to severe
222 clinical conditions, presented a similar pattern of longitudinal immunological response,
223 we compared the overall inflammatory profile of control and infected patients (Fig. 1C).
224 As expected, the control group presented a very discreet production of mediators, while
225 infected individuals showed a burst in inflammation throughout the study. When
226 comparing T0 and T7, there was a rise in the frequency of high producers of many
227 cytokines, including CXCL-8, IL-10, IL-2, GM-CSF, IL-4, IFN- γ , and IL-12p70,
228 indicating intensification in the inflammatory response. Meanwhile, IL-13 presented a
229 reduction in its frequency (Fig 1C). No significant change in the levels of these
230 mediators was observed within seven days.

231 Longitudinal correlation analysis of immunological mediators allowed us to gain
232 insights into cytokines, chemokines, and growth factors production during
233 hospitalization (Fig. 2A). In the Lisbon cohort, although we observed a reduction in the
234 number and intensity of correlations, there was a remarkable switch from positive to
235 negative interactions between mediators, notably in CXCL-2, CCL-2, IL-6, IL-12p70,
236 INF- γ , and IL-4. Some mediators, such as IL-2, GM-CSF and IL-13 gained interactions
237 in T7 (Fig. 2A).

238 The correlation matrix graphic representation from Brazil showed a decline in some
239 interactions within seven days. There is an evident loss of positive correlations for IL-6,
240 IL-10, TNF, and IL-12p70, with the latter having also gained negative correlations,
241 notably with CXCL-8, IL- β , IL-1ra, and INF- γ (Fig. 2C). On the other hand, CCL-2,
242 IFN- γ , and GM-CSF gained intensity and significance in numerous interactions (Fig.
243 2C). Interestingly, we see an increase in the total number of significant correlations
244 between age and cytokines, mostly negative ones, which could indicate a reduction in
245 the interactions with aging.

246

247 *Exhausted and immunosenescent T cells accumulate in COVID-19 patients of both*
248 *cohorts regardless of disease severity*

249 Since inflammatory response during COVID-19 infection is already associated with T
250 cell exhaustion (Arcanjo et al, 2021; Lee et al, 2021), we used flow cytometry
251 immunophenotyping to evaluate alterations in immune responses throughout the course
252 of infection. We investigated the evolution of the relative abundance of CD4⁺ and CD8⁺
253 T cells using manual gating as described in Supplementary Figure 1. T cell markers
254 related to differentiation (CD28, CCR7, CD45RO) and senescence/exhaustion (CD57,
255 KLRG1, PD-1) allowed us to identify these phenotypes in distinct cell compartments
256 including naïve (CD28⁺CCR7⁺CD45RO⁻) and effector memory (CD28⁻CCR7⁺
257 CD45RO⁺) T cells.

258 Results from Lisbon patients showed an increase in the frequency of differentiated T
259 CD4⁺ cells (CD28⁻) expressing both markers of senescence/exhaustion
260 (CD57⁺KLRG1⁺) as well as effect memory cells (EM) (CD45RO⁺ CCR7⁻ CD28⁻) (Fig.
261 3 C and E). In the CD28⁻CD8⁺ T cell compartment, frequency CD57⁺KLRG1⁺ cells
262 increased while there was no difference in EM subset (Fig. 3 D and F).

263 Contrary to what was observed in severe cases from Lisbon, frequencies of naïve CD4⁺
264 and CD8⁺ T cells from patients in Brazil reduced during hospitalization (Fig 3 G and
265 H). This change was accompanied by an increase in T CD4⁺CD28⁻ and EM cells
266 double-positive for CD57⁺KLRG1⁺ during seven days (Fig. 3 I and K). It was also
267 observed a reduction in the frequency of FOXP3⁺ CD4⁺ T cells in the individuals from
268 the Brazilian cohort whereas no difference was observed in the frequency of PD-1-
269 expressing (exhausted) FOXP3⁺ CD4⁺ T (Fig S2).

270 Altogether our results show an emergence of an increased senescent/exhausted T cell
271 phenotype in patients with COVID-19 during 7 days of infection regardless of disease
272 severity.

273

274 **Discussion**

275 Inflammation induced by viral infections plays an important role in the differentiation
276 and development of T cells, as they induce extensive cell proliferation, however it can
277 ultimately lead to cell exhaustion and senescence (Wherry, 2011; Moro-Garcia et al,
278 2018; Heath & Grant, 2020). Although this phenomenon is mainly related to chronic
279 infections such as CMV, HIV, HBV and HPV (Fulop, Larbic, Pawelec, 2013; Wherry,
280 2011), it has also been identified in patients with acute SARS-Cov-2 infection (De
281 Biase et al, 2020; Arcanjo et al, 2021). Considering these findings and the highly
282 heterogeneous immunological responses observed in COVID-19 (Lucas et al, 2020), we
283 studied the evolution of the inflammatory response and exhaustion/senescence T cell
284 profile in a seven-day interval in two different cohorts of infected individuals (one from
285 Belo Horizonte, Brazil and another one from Lisbon, Portugal).

286 Our longitudinal analysis revealed different inflammatory profiles between cohorts,
287 although both presented a hyperactivation of the immune system in response to the
288 infection. At admission, the severe patients from Portugal exhibited high levels of
289 biomarkers associated with a core response signature in moderate to severe conditions
290 in COVID-19, such as IFN- γ , TNF, IL-6, and IL-10 (Liu et al, 2020; Lucas et al, 2020).
291 Meanwhile, over the seven-day period, there was a trend towards the reduction of the
292 inflammatory profile, as observed by the decrease in all cytokine levels (Fig. 1A). This
293 data is supported by the significant reduction of IL-2, IFN- γ , and IL-6 (Fig. 1B), which
294 are biomarkers related to hyperactivation of T cells and recruitment of macrophages to
295 the site of infection (Arcanjo et al, 2021; Coperchini et al, 2021). Decrease in the anti-
296 inflammatory cytokine IL-10 accompanies the general decline in inflammatory immune
297 response. The emergence of negative correlations in the correlation matrix also suggests
298 the downregulation of the immune response during the course of the disease (Fig. 2B),
299 indicating a tendency to resolution of the inflammatory response.

300 Patients from Brazil with mild to severe disease had a trend towards a global rise in
301 serum cytokine production (Fig. 1C). For instance, the frequency of high producers of
302 CXCL-8, a chemokine involved in the recruitment of neutrophils to the site of infection
303 and commonly elevated in patients with COVID-19 (Coperchini et al, 2020; Sallenave

304 & Guillot, 2020; Hazeldine & Lord, 2021), suggests an enhancement of the
305 inflammatory response in the course of seven days (Fig 1C). Also, the correlation
306 matrix evidenced higher correlations between CCL-2, IFN- γ , and GM-CSF levels in T7.
307 These mediators are implicated in T lymphocyte response to SARS-CoV-2, such as cell
308 trafficking, cytokine production and cell replication (Coperchini et al, 2020; Arcanjo et
309 al, 2021). Considering that disease is associated with the loss of complexity and
310 dynamics of physiological processes (Lipsitz, 2004), the reduction in some correlations
311 after a week indicates a putative imbalance in the immune network complexity
312 developed during this short period of infection (Fig 2A).

313 As a complement to the inflammatory profile found in COVID-19 patients from Brazil,
314 we also observed a reduction in the frequency of Foxp3⁺CD4⁺ T cells which have been
315 widely described as regulatory cells mediating anti-inflammatory effects. Of note,
316 frequency of Foxp3⁺CD4⁺ T cells expressing the exhaustion marker PD-1 did not
317 change suggesting that only functionally active regulatory T cells were affected by the
318 infection. These data are in accordance with previous reports showing a reduction in the
319 frequency of these T cell subset in patients with COVID-19 namely in patients with a
320 severe form of the disease (Lucas et al, 2020).

321 It is possible that the two cohorts, in Brazil and Lisbon, were not exactly synchronized.
322 In fact, we observed a more marked reduction of pro-inflammatory cytokines between
323 day 0 and 7 in the Lisbon cohort. However, although this heterogeneity may sound as a
324 negative feature of our sample, the similar results yielded by the two distinct cohorts
325 regarding the immunosenescence profile of the T cell compartment helped to reveal a
326 common phenomenon associated with SARS-CoV2 infection.

327 Studies on individuals with severe COVID-19 revealed an increase in T cells expressing
328 markers of exhaustion/senescence such as PD-1, TIGIT, and CD57, especially in the
329 CD8 compartment, when compared to healthy individuals (Zheng et al., 2020a; Zheng
330 et al, 2020b; De Biasi, 2020; Arcanjo et al, 2021). In the present work, our aim was to
331 examine the emergence of these alterations in a longitudinal study and to determine
332 whether these immunosenescence alterations were restricted to severe cases of the
333 disease in two distinct cohorts. Our data show that patients with mild and severe cases
334 of COVID-19 in Brazil had an increase in CD4⁺CD28⁻ T cells expressing both CD57
335 and KLRG1, whereas patients from Lisbon with severe disease showed this increase in
336 both CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁻ T cell compartments (Fig 3 C, D, I). Expression of
337 CD57 and KLRG1, and the loss of the CD28 molecule are considered indicators of

338 terminal differentiation and are associated with the senescence profile of T lymphocytes
339 (Akbar & Henson, 2011; Pangrazzi & Weinberger, 2020). Although the KLRG1
340 molecule also emerges on the cell surface after differentiation, the signalling generated
341 by this molecule regulates a pathway related to exhaustion, making it a marker of
342 cellular senescence and exhaustion (Akbar & Henson, 2011; Wherry & Kurachi, 2015;
343 Pinti et al, 2016; Cunha et al, 2020; Pangrazzi & Weinberger, 2020). Therefore, absence
344 of CD28 and the high expression of CD57 as well as KLRG1 provide what could be
345 considered the best description of a senescent state (Rodriguez et al, 2021).

346 Interestingly, our results identified the emergence of a senescence profile of T
347 lymphocytes in individuals with COVID-19, both in mild/moderate and severe
348 conditions, being more pronounced the more intense the inflammatory response to the
349 disease was. Although there is no data in the literature relating inflammation and
350 immunosenescence in COVID-19, the hyperactivation of the inflammatory response to
351 SARS-CoV-2 infection has been associated with more severe disease (Lucas et al,
352 2020), which could possibly justify the increase in the frequency of terminally
353 differentiated cells in this group of patients.

354 It is also important to highlight that the cohort of critically ill patients from Portugal is
355 mainly composed of elderly individuals. Thus, this may explain the difference between
356 health conditions between Brazilian and Portuguese cohort samples. As predicted by
357 our group and by others, immunosenescence and inflammaging may be aggravated by,
358 but also may aggravate SARS-CoV-2 infection (Batista et al, 2020; Witkowski, Fulop,
359 Bryl, 2022). The primary setting and one of the hallmarks of immunosenescence is
360 thymic involution, which is followed by the reduction in the naïve cell output (Thomas,
361 Wang, Su, 2020; Elyahu & Monsonego, 2021), a phenomenon that should have been
362 affecting these patients even before the onset of the infection. This could be the reason
363 why no difference was observed in the naïve T cell subset in this severely diseased elder
364 group.

365 The differences seen in inflammatory biomarkers between patients of Brazil and
366 Portugal may be related to the time of the onset of symptoms, as the recruitment was
367 carried out based on the moment patients sought medical assistance at the hospital,
368 rather than on the initiation of symptoms. Notably, accumulation of exhausted/senescent
369 cells seems to occur at distinct time points of disease development, indicating a process
370 that could start early in infection and develop further than the 7-day period examined,

371 particularly in Brazil where the patients were recruited sooner regarding the course of
372 the disease.

373 There were limitations in this study, mainly the small sample size in both cohorts. This
374 may have hindered the identification of significant differences in inflammatory
375 mediators and other T-cell subsets that would be possible using a larger number of
376 individuals. Moreover, this feature precluded formal statistical analysis regarding the
377 associations between laboratory findings and disease severity. There were also
378 methodological differences in the study of the two cohorts that could have impacted on
379 the results. We did not investigate the SARS-CoV-2 variant infecting the individuals
380 and this could also partially explain differences in their immunological responses,
381 considering the distinct scenarios of the pandemic in Brazil and Portugal during which
382 patients were recruited.

383 Our longitudinal study provided evidence of accelerated immunosenescence in the T
384 cell compartment during COVID-19 showing that senescent and exhausted T cells
385 significantly increased within a seven-day period. Interestingly, even though our
386 samples were composed by two different populations, who presented distinct
387 inflammatory profiles and were possibly affected by different variants of the virus, a
388 similar profile of immunosenescence and exhaustion was identified during this short
389 period of infection by SARS-CoV-2. Furthermore, this change in immunological
390 profile was shown to be independent of disease severity even though the magnitude was
391 greater in patients with severe disease. This suggests that accelerated
392 immunosenescence of the T cell compartment may be described as a general feature of
393 COVID-19.

394

395 **Acknowledgments:** This study was financially supported by grants from Fundação para
396 a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal, Research4covid_369), Merck Sharp & Dohme
397 (MISP 42521) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
398 (CNPq, Brazil, APQ 407363/2021-1). RB Pedroso is funded by FCT
399 (SFRH/BD/144372/2019). Samples in Lisbon were collected, stored and provided by
400 Biobanco-iMM (Lisbon Academic Medical Center, Lisbon, Portugal) in coordination
401 with a taskforce created at iMM for the collection of COVID-19 Research Samples.
402 Flow cytometry in Lisbon was performed at the Flow Cytometry Facility of iMM.

403

404 **Conflict of interest:** The authors have no conflict of interest.

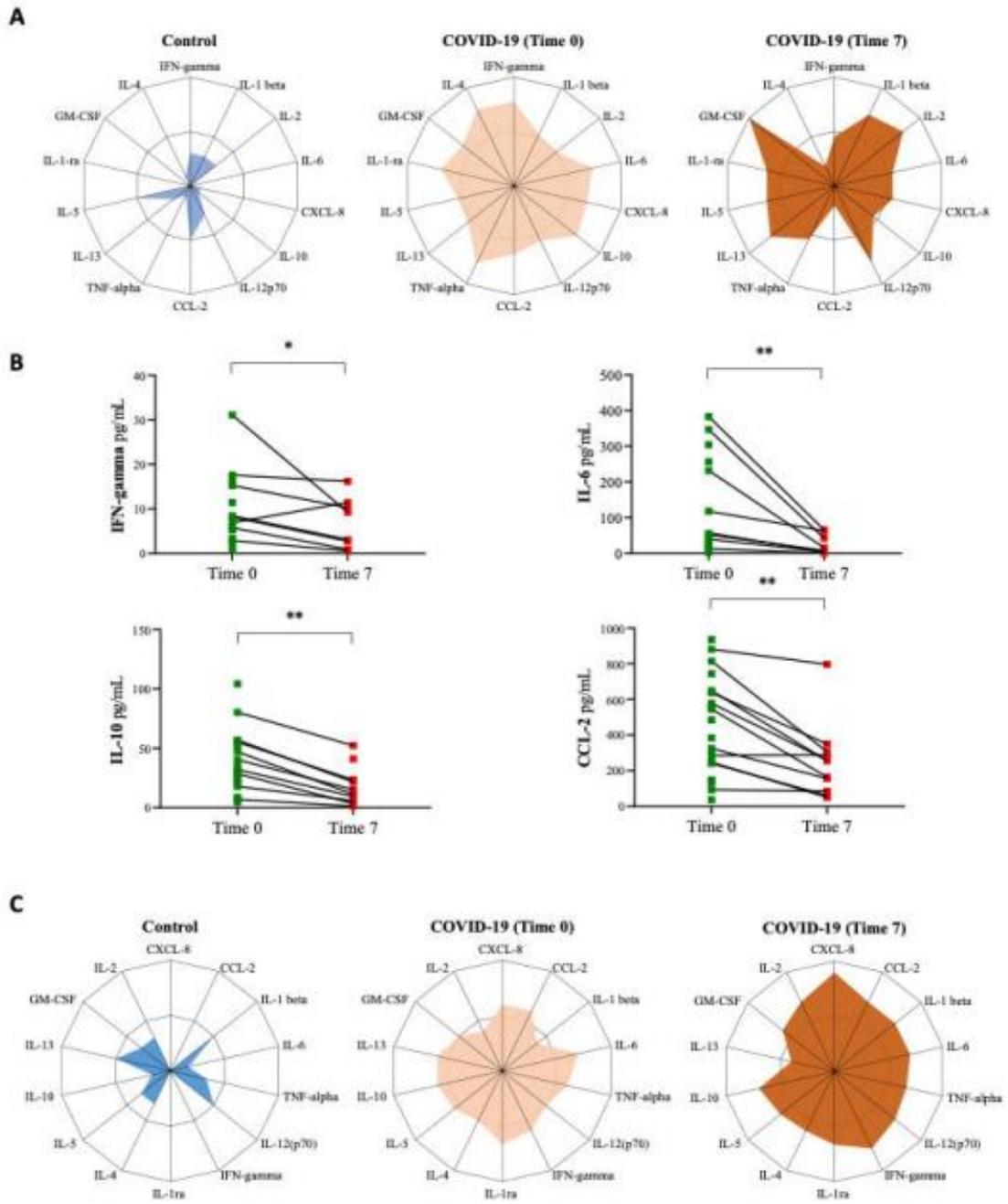


Figure 1

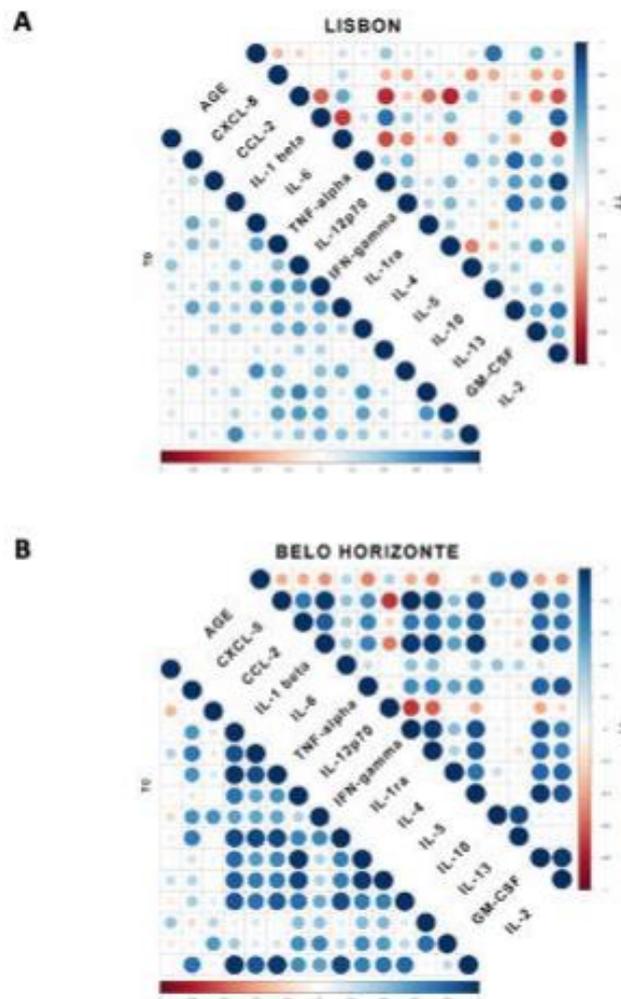


Figure 2

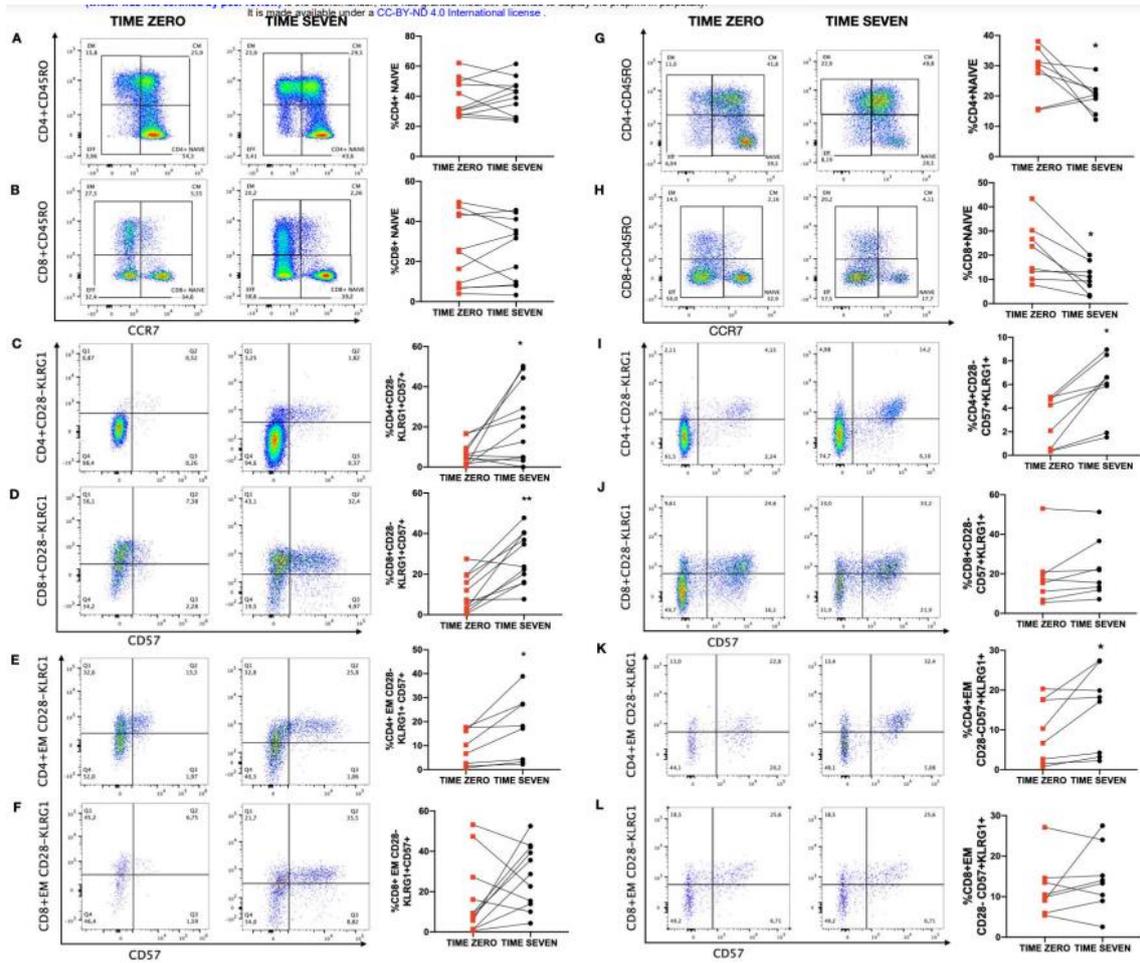


Table 1 - Clinical characteristics of Lisbon and Belo Horizonte populations.

	Lisbon		Belo Horizonte	
	Healthy controls (n=10)	COVID-19 (n=20)	Healthy controls (n=5)	COVID-19 (n=8)
Age, median (IQR) (years)	66.0 (57.8 – 74.5)	69.0 (60.0 – 84.3)	25.0 (22.0 – 29.0)	42.5 (35.8 – 54.5)
Female sex (%)	9 (90%)	6 (30%)	4 (80%)	4 (50%)
Comorbidities, n (%)				
Cancer	0	0	0	1 (12.5%)
Cardiovascular disease	0	5 (25%)	0	0
Diabetes	0	6 (30%)	0	0
High cholesterol	0	3 (15%)	0	0
Hypertension	0	12 (60%)	0	1 (12.5%)
Disease severity, n (%)				
Mild	NA	0	NA	3 (37.5%)
Moderate	NA	0	NA	3 (37.5%)
Severe	NA	20 (100%)	NA	2 (25%)
Death during hospitalization, n (%)	NA	3 (7.5%)	NA	0
Samples lost between T0 and T7, n (%)	NA	6 (15%)	NA	0

IQR: interquartile range. NA: not applicable.