



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DE INFILTRADOS CELULARES INFLAMATÓRIOS
EM AMOSTRAS TECIDUAIS PULMONARES DE PACIENTES QUE
FORAM A ÓBITO POR PNEUMONIAS VIRAIS PANDÊMICAS
(COVID-19 E H1N1)**

Mestranda: Daniele Margarita Marani Prá

Orientadora: Dra. Lúcia de Noronha

Curitiba, setembro de 2022

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**AVALIAÇÃO DE INFILTRADOS CELULARES INFLAMATÓRIOS
EM AMOSTRAS TECIDUAIS PULMONARES DE PACIENTES QUE
FORAM A ÓBITO POR PNEUMONIAS VIRAIS PANDÊMICAS
(COVID-19 E H1N1)**

Dissertação de mestrado acadêmico apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Lúcia de Noronha

Curitiba, setembro de 2022

AGRADECIMENTOS

A Deus pelos muitos privilégios a mim concedido nesta jornada.

Ao meu privilégio maior Rafael Prá, pelo amor, paciência infinita e toda ajuda que alguém poderia oferecer. Aos meus tesouros: Raul e Francisco. Quando eu achei que já tinha tudo Deus me deu vocês!

À minha querida avó Lira. Minha grande referência.

Aos meus pais pelos esforços para que eu pudesse realizar o sonho de estudar medicina.

À minha amiga irmã Andressa que sempre foi um exemplo maior de persistência em continuar estudando, apesar de todas as dificuldades.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Lucia de Noronha, pela oportunidade de estar inserida neste grupo de pesquisa, justamente quando o mundo se deparou com um desafio tão grande. Obrigada pela paciência e obrigada por ser meu maior exemplo na medicina e na ciência, desde sempre!

À Carol Vaz pela ajuda infinita no momento mais difícil desta batalha. Gratidão eterna!

Ao querido Seigo Nagashima por estar sempre disponível para ajudar em qualquer momento.

À minha amiga querida Ana Paula por toda ajuda e pelo ombro amigo sempre disponível. Você é luz dentro do Laboratório de Patologia Experimental.

À Marina por toda ajuda, pela oportunidade de ter trabalhado com você depois desses anos todos! Foi maravilhoso ver a docente que você se transformou!

A todos os professores e colaboradores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Foram anos de intenso aprendizado. Parabéns pela organização! Obrigada!

Ao grupo “biópsias pandemia”. Estar inserido neste grupo foi fundamental para uma atualização constante e filtrada, o que me proporcionou uma melhor assistência na linha de frente, diante desta doença que ceifou tantas vidas.

Dedico este trabalho aos maiores presentes que a vida me deu :Rafael, Raul e Francisco. Amo vocês!

DANIELE MARGARITA MARANI PRÁ

**AVALIAÇÃO DE INFILTRADOS CELULARES
INFLAMATÓRIOS EM AMOSTRAS TECIDUAIS
PULMONARES DE PACIENTES QUE FORAM A ÓBITO
POR PNEUMONIAS VIRAIS PANDÊMICAS (COVID-19 E
H1N1)**

Dissertação de mestrado como requisito parcial para obtenção do título de Mestre. como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestrado, sob a orientação da Prof.^a Dra. Lúcia de Noronha.

Curitiba, julho de 2022.

Folha informativa:

A dissertação foi elaborada seguindo a normatização estabelecida pela ABNT. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná dentro do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da PUCPR. Declaramos que não há conflito de interesse na realização da presente dissertação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Respostas imunes no controle das infecções virais	23
Figura 2: Segmentação semiautomatizada por cores da análise morfológica.	31
Figura 3: Contagem celular	32
Figura 4: Esquema representado a metodologia do escore de Allred ..	33
Figura 5: Exemplo de lâminas imunocoradas pela Esfingosina-1 .	34
Figura 6: Número de células coradas por Arginase-1 por campo de grande aumento.	39
Figura 7: Número de células coradas por CD68 por campo de grande aumento.	39
Figura 8: Número de células coradas por CD4 por campo de grande aumento.	41
Figura 9: Número de células coradas por CD138 por campo de grande aumento.	42
Figura 10: Número de células coradas por Perforina por campo de grande aumento.	43
Figura 11: Número de células coradas por CD8 por campo de grande aumento.	44
Figura 12: Número de células coradas por CD57 por campo de grande aumento.	45
Figura 13: Número de células coradas por CCR4 por campo de grande aumento.	46
Figura 14: Número de células coradas por CD3 por campo de grande aumento	47
Figura 15: Número de células coradas por CD20 por campo de grande aumento.	48
Figura 16: Número de células coradas por INF- α por campo de grande aumento.	49
Figura 17: Número de células coradas por INF- γ por campo de grande aumento.	50
Figura 18: Número de células coradas por iNOS por campo de grande aumento.	51
Figura 19: Número de células coradas por Esfingosina-1 por campo de grande aumento.	52
Figura 20: Número de células coradas por PD-1 por campo de grande aumento.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados dos anticorpos utilizados no estudo	29
Tabela 2. Dados gerais dos pacientes do estudo	36
Tabela 3. Resultados da expressão tecidual dos biomarcadores do estudo.	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

COVID-19 - Doença coronavírus 2019
SARS-CoV-2 - Coronavírus 2 de síndrome respiratória aguda grave
Células NK - Células natural killer
PAMPS - Padrões moleculares associados a patógenos
PRRS - Receptores de reconhecimento de padrão
TLRS - Receptores do tipo Toll
RLRS - Receptores do tipo RIG-I
IFN tipo I - Interferons do tipo I
IFN- α – Interferon - alfa
IFN- β – Interferon - beta
IFNS - Interferons
IFN- γ - Interferon – *gama*
CTLs CD4+ - Linfócitos T auxiliares
CTLs CD8+ - Linfócitos T citotóxicos
MHC classe I - Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe I
IL-4 - Interleucina- 4
IL-13 - Interleucina -13
IL-17 - Interleucina-17
IL-22 - Interleucina-22
ROS - Espécies reativas de oxigênio
NOS - Espécies reativas de nitrogênio (NOS)
IL-10 - Interleucina – 10
TGF- β - Fator de crescimento transformador- β
SDRA- Síndrome da angústia respiratória aguda grave
COVID - Coagulação intravascular disseminada
Spike protein - Proteína de pico estrutural viral Spike
ECA2 - Enzima de conversora da angiotensina 2
TMPRSS2 - Serina protease transmembrana tipo 2 (TMPRSS2)
IRF3 - Fator regulador do interferon 3
NF- $\kappa\beta$ -fator nuclear kappa β
DAMPs - padrões moleculares associados a danos

RESUMO

Introdução: A pandemia de COVID-19, causada pelo vírus respiratório SARS-CoV-2, resultou em morbidade e mortalidade global generalizada. A resposta imune contra este patógeno tem mostrado uma linha tênue entre os efeitos protetores e as reações patológicas resultantes da liberação maciça de citocinas e baixa depuração viral. Esta última é possivelmente causada por exaustão e/ou senescência das células TCD8+ e atividade reduzida das células natural killer (NK). O desequilíbrio entre as respostas inatas e adaptativas durante os estágios iniciais da infecção causada pelo SARS-CoV-2 contribuiu para o controle ineficaz da disseminação viral. **Objetivos:** O presente estudo avaliou a imunexpressão tecidual dos marcadores imuno-histoquímicos Arginase-1, CCR4, CD3, CD4, CD8, CD20, CD57, CD68, CD138, IL-4, INF- α , INF- γ , iNOS, PD -1, Perforina e Esfingosina-1, a fim de compreender, sobretudo, a resposta imune celular desencadeada em pacientes que morreram em decorrência da COVID-19. **Métodos:** Foram avaliadas, com os marcadores imuno-histoquímicos mencionados acima, vinte e quatro amostras de tecido pulmonar, embebidas em parafina, de pacientes que morreram de COVID-19 (grupo COVID-19) e comparadas com dez amostras de tecido pulmonar de pacientes que morreram de H1N1pdm09 (grupo H1N1). **Resultados:** A imunexpressão tecidual significativamente aumentada de marcadores como Arginase-1, CD4, CD68, CD138, Perforina, Esfingosina-1 e IL-4 foi observada no grupo COVID-19 em comparação ao grupo H1N1. Uma imunexpressão significativamente menor de CD8 e CD57 também foi encontrada no grupo COVID-19 em comparação ao grupo H1N1. **Conclusão:** Sugere-se que os pacientes que morreram de COVID-19 tiveram uma resposta celular inata menos efetiva em relação à depuração viral e uma resposta adaptativa tendendo ao reparo tecidual.

Palavras Chaves: COVID19; SARS-CoV-2; pulmão; resposta celular; infiltrados celulares

ABSTRACT

Introduction: The COVID-19 pandemic, promoted by the SARS-CoV-2 respiratory virus, has resulted in widespread global morbidity and mortality. The immune response against this pathogen has shown a thin line between protective effects and pathological reactions resulting from the massive release of cytokines and poor viral clearance. The latter is possibly caused by exhaustion, senescence, or both of CD8+ T cells and reduced activity of natural killer (NK) cells. The imbalance between innate and adaptive responses during the early stages of infection caused by SARS-CoV-2 contributes to ineffective control of viral spread.

Objective: In this sense, the present study evaluated the tissue immunoexpression of the immunohistochemistry markers Arginase-1, CCR4, CD3, CD4, CD8, CD20, CD57, CD68, CD138, IL-4, INF- α , INF- γ , iNOS, PD-1, Perforin and Sphingosine-1, to understand, above all, the cellular immune response triggered in patients who died because of COVID-19.

Method: We evaluated twenty-four paraffin-embedded lung tissue samples from patients who died of COVID-19 (COVID-19 group) and compared them with ten lung tissue samples from patients who died of H1N1pdm09 (H1N1 group) with the immunohistochemistry markers mentioned above. **Results:** Significantly increased tissue immunoexpression of Arginase-1, CD4, CD68, CD138, Perforin, Sphingosine-1, and IL-4 were observed in the COVID-19 compared to H1N1 group. A significantly lower immunoexpression of CD8 and CD57 was also found in the COVID-19 compared to H1N1 group. **Conclusion:** It is suggested that patients who died from COVID-19 had a poor innate cellular response concerning viral clearance and an adaptive response tending to tissue repair.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; lung; cellular response; cellular infiltrates

RESUMO POPULAR

A doença COVID-19 surgiu na China e espalhou-se pelo mundo. Milhões de pessoas morreram devido COVID-19. Outras pessoas tiveram sequelas graves causadas pela doença. A COVID-19 compromete principalmente os pulmões, mas pode também acometer outros órgãos. Após dois anos do seu aparecimento a ciência ainda não dispõe de tratamentos eficazes para combater o vírus. Por isso é fundamental estudarmos como o corpo, através do sistema de defesa, combate este microrganismo. Este estudo teve como objetivo avaliar as células de defesa, em pulmões de pacientes que faleceram de COVID-19, comparando com a resposta de defesa em amostras de pulmões de pacientes que faleceram de gripe (H1N1). Para esta avaliação utilizamos amostras teciduais de pulmões de pacientes que morreram em decorrência à pneumonia causada por estes dois vírus. Concluímos nesse estudo que aqueles indivíduos que faleceram pelo vírus causador da COVID-19 apresentaram uma resposta celular comprometida, com menor defesa contra o vírus e maior reparo do pulmão, levando à fibrose pulmonar.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	2
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
RESUMO POPULAR	11
SUMÁRIO	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 JUSTIFICATIVA	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO - RESPOSTAS IMUNES INATAS E ADAPTATIVAS	17
3.2 RESPOSTAS IMUNES NO CONTROLE DAS INFECÇÕES VIRAIS	18
3.3 SISTEMA IMUNOLÓGICO - RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA COVID - 19	24
4 OBJETIVO GERAL	26
4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	26
5 MÉTODOS	27
5.1 APROVAÇÃO ÉTICA	27
5.2 AMOSTRAS	27
5.2.1 Critérios de inclusão dos pacientes COVID-19:	28
5.2.2 Critérios de exclusão dos pacientes COVID-19:	28
5.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS	28

5.4 ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS	29
5.4.1 Morfometria:	30
5.4.2 Contagem de Células:	31
5.4.3 Allred Score:	32
<u>6 ANÁLISE ESTATÍSTICA</u>	<u>35</u>
<u>7 RESULTADOS</u>	<u>36</u>
<u>8 DISCUSSÃO</u>	<u>54</u>
8.1 ACHADOS DEMOGRÁFICOS E HISTOLÓGICOS	54
8.2 RESPOSTA CELULAR	54
<u>9 CONCLUSÃO</u>	<u>59</u>
<u>10 LIMITAÇÕES</u>	<u>60</u>
<u>11 CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	<u>61</u>
<u>12 PRODUÇÃO CIÊNTEFICA</u>	<u>62</u>
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>65</u>
<u>13 ANEXOS</u>	<u>73</u>

1 INTRODUÇÃO

A rápida disseminação da doença por coronavírus (COVID-19) resultou em ampla morbidade e mortalidade global, causando uma crise de saúde pública sem precedentes em todo o mundo (1). Assim como na pandemia do subtipo H1N1 do vírus Influenza A (H1N1pdm09), as manifestações clínicas da COVID-19 são heterogêneas. Os pacientes variam de doença respiratória assintomática ou leve à pneumonia viral grave, evoluindo para síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e óbito (2,3).

Evidências crescentes indicam que uma resposta hiper inflamatória ao SARS-CoV-2 contribui para casos críticos e desfechos de óbito no COVID-19 (1). Como outras doenças virais respiratórias, a fase de resposta adaptativa, especialmente as respostas de células T, desempenha um papel relevante na infecção pelo novo coronavírus (4).

A defesa contra patógenos é mediada pela imunidade inata e adaptativa (5). Cada uma consiste em diferentes tipos de células e funções distintas (6). Em um exemplo genérico de infecção viral, o sistema imune reconhece rapidamente a entrada de um agente extrínseco através de células e moléculas efetoras do sistema imune inato (5). Macrófagos, monócitos, células dendríticas e neutrófilos expressam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), identificando as características do patógeno invasor (7). Essas estruturas moleculares externas são conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). A ligação dos PAMPs aos PRRs desencadeia a resposta inflamatória contra os vírus. Essa ação resulta na ativação de um processo de sinalização que leva à expressão de fatores de transcrição, induzindo citocinas pró-inflamatórias, como o fator nuclear kappa β (NF- κ), bem como a ativação de componentes cruciais da resposta antiviral imediata, como Interferons tipo I (alfa - α e beta - β), que são cruciais para limitar a replicação e disseminação viral (5,8).

Os interferons do tipo I aumentam a citotoxicidade das células natural killer (NK), que matam as células infectadas através de um mecanismo semelhante ao dos linfócitos T citotóxicos CD8 (CTLs CD8+) (5). Essas células carregam grânulos contendo proteínas, como Perforina e Granzimas, que causam a morte das células-alvo. Além disso, as células NK produzem interferon-gama (INF- γ) que recruta macrófagos para destruir microrganismos fagocitados (9). Os interferons do tipo II (INF- γ) também promovem a diferenciação de células T imaturas para subgrupos de células T auxiliares Th1 e regulam positivamente a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC

II), aumentando a probabilidade e a visibilidade das células infectadas serem reconhecidas e mortas por CTLs CD8+ (10).

As citocinas produzidas pelas células apresentadoras de antígenos (APC) contra infecções virais estimulam a ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos durante a resposta inata, além de influenciar a natureza da resposta adaptativa (4). Uma vez ativado, o T CD4 *naive* difere em células efetoras, capazes de promover funções como ativação de células B (linfócitos B-efetores são plasmócitos secretores de anticorpos), auxiliando células T CD8+, polarizam-se no subtipo Th1 para desempenhar um papel antiviral devido à produção de IFN- γ , entre outras citocinas, e ativar macrófagos de fenótipo tipo I (6). A ativação de macrófagos é a função primária da resposta imune mediada por células T para eliminar microrganismos intracelulares por meio de fagocitose e induzir uma resposta inflamatória robusta (11).

Além do subtipo Th1, os linfócitos T auxiliares CD4 podem se diferenciar no subtipo Th2. Essa diferenciação é mediada principalmente pela Interleucina 4 (IL-4), que também induz a ativação de macrófagos do fenótipo M2, cruciais para o processo de reparo tecidual (12). O processo de polarização das células T CD4+ é mediado por fatores de transcrição, quimiocinas e citocinas, onde a regulação de moléculas inflamatórias associadas às células pode levar ao aparecimento e aumento de doenças inflamatórias pulmonares como a SDR (13).

Na persistência ou exposição crônica a antígenos, como infecções virais crônicas, as respostas das células T CD8+ podem ser gradualmente suprimidas pela expressão e acoplamento de receptores inibitórios, como a Proteína de Morte Celular Programada 1 (PD-1) (5). As células T CD8+ esgotadas expressam PD-1, que bloqueia a ativação de CTLs e induz a diminuição da produção de citocinas, como IFN- γ (14). Além disso, a idade avançada contribui para uma questão de senescência imunológica, implicando na redução da plasticidade de T CD4+ e T CD8+, além de uma resposta adaptativa comprometida contra infecções virais (15).

Especificamente, em eventos de infecção por SARS-CoV-2, sua imunopatologia ainda é subjetiva. Embora a comunidade científica tenha elucidado várias questões em relação ao COVID-19, questões sobre imunidade celular ainda precisam de esclarecimento. O presente estudo analisou vinte e quatro amostras pulmonares post-mortem de pacientes acometidos pela COVID-19, através de uma análise histopatológica e imuno-histoquímica, visando compreender melhor o comportamento da resposta imune celular no estágio de maior gravidade da doença.

2 JUSTIFICATIVA

- As infecções respiratórias agudas representam uma causa mundialmente importante de morbidade e mortalidade. Atualmente vivemos uma pandemia causada pela infecção de um vírus respiratório.

- As pneumonias virais são comumente não pandêmicas, isto é, sazonais, porém, muitas vezes, nos deparamos com epidemias e pandemias causadas pelos vírus respiratórios.

- O padrão de resposta imunológica pode variar de paciente para paciente, e entre os tipos virais, pandêmicos ou não.

- Conhecer a resposta do sistema imunológico perante infecções virais podem auxiliar na definição do quadro clínico e proporcionar tratamento mais direcionado à doença, evitando agravamentos, diminuindo morbimortalidade e tempo de internação e consequentemente custos sociais e econômicos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Infecções de vias aéreas inferiores foram responsáveis por aproximadamente quatro milhões de mortes no mundo em 2019, sendo a quarta causa de morte entre todas as idades, e a segunda causa de morte entre as crianças abaixo de cinco anos, segundo The Global Burden of Diseases, Injuries and Risk Factors Study (GBD) 2019. Os quatro principais agentes causadores das infecções e das mortes por infecções respiratórias inferiores são: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, Vírus Influenza, e Vírus Sincicial Respiratório (16).

Em quase um terço das pneumonias comunitárias os vírus respiratórios são considerados o agente etiológico prevalente, em particular os vírus influenza (A e B), rinovírus, vírus parainfluenza 1, 2 e 3 e coronavírus. Globalmente, estima-se que 100 milhões de casos de pneumonia viral ocorram anualmente (17).

Os vírus influenza está entre as causas mais comuns de infecções respiratórias em humanos, e está associados a alta morbidade e mortalidade (18). Em 2009 houve surgimento de um novo subtipo do vírus influenza A, subtipo H1N1 pandêmico (H1N1pdm09), o qual foi identificado no México neste mesmo ano, e espalhou-se por praticamente todos os países do mundo (19).

Em junho de 2009, a Organização Mundial de Saúde (OMS) comunicou a ocorrência de uma nova pandemia causada pelo vírus da Influenza A, subtipo H1N1 (H1N1pdm09) após um intervalo de 40 anos. No mês de julho do mesmo ano, mais de 94.000 casos foram confirmados e reportados por 100 países diferentes. Desde então o vírus da Influenza A, subtipo H1N1 na sua forma sazonal continua a circular (18).

Os principais sinais e sintomas apresentados pelos pacientes infectados pelo vírus H1N1pdm09 são: febre (38°C), tosse e dispnéia sendo que, até 20% dos pacientes podem evoluir com a forma mais grave, desenvolvendo pneumonia severa, necessitando de internação em UTI (20).

Em dezembro de 2019 uma pneumonia de causa desconhecida surgiu no Mercado atacadista de frutos do mar de Huanan, Wuhan, província de Hubei. Em 3 de janeiro de 2020 o genoma completo do novo gênero β coronavírus foi identificado em amostras de fluido de lavado broncoalveolar (21). Essa doença foi nomeada como COVID-19. Até início de 2022 a Covid-19 foi responsável por quase seis milhões de óbitos (22).

Diferente dos coronavírus já conhecidos este foi chamado 2019 - coronavírus (2019-nCoV) pela OMS (23). Posteriormente verificou-se que o novo vírus compartilhava de mais

de 79% da sequência genética do SARS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave) (24). O vírus então é formalmente designado como coronavírus 2 de síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) pelo Coronavirus Study Group (CSG) do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (25). A doença causada pelo vírus é denominada doença coronavírus 2019 (COVID-19). O tempo entre a exposição ao SARS-CoV-2 e o momento em que os sintomas começam (período de incubação) é geralmente de cinco a seis dias, mas pode variar de 1 a 14 dias (26). O vírus SARS-CoV-2 afeta principalmente o sistema respiratório, embora outros sistemas e órgãos possam estar envolvidos. Infecção do trato respiratório inferior e sintomas relacionados, incluindo febre, tosse seca e dispnéia, foram relatados na série de casos iniciais de Wuhan, China (27). Além disso, dor de cabeça, tontura, fraqueza generalizada, vômito e diarreia também foram relatados (28). Atualmente é reconhecido que os sintomas respiratórios da COVID-19 são extremamente heterogêneos, variando de sintomas mínimos a hipóxia significativa com SDRA (29).

Os sintomas clínicos da infecção pela COVID-19 podem ser observados após 5 a 14 dias do contágio (período de incubação). O tempo de incubação difere principalmente devido idade e resposta imunológica do indivíduo. Os homens são mais suscetíveis ao SARS-CoV-2 em comparação as mulheres. Aparentemente pessoas com mais de 60 anos são mais sensíveis ao SARS-CoV-2 (30).

3.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO - RESPOSTAS IMUNES INATAS E ADAPTATIVAS

O sistema imunológico tem como função:

- Reconhecimento molecular dos agentes agressores
- Ativação de vias bioquímicas intracelulares que resultam em modificações vasculares e teciduais
- Produção de mediadores com efeitos locais e sistêmicos com ativação e proliferação celular
- Químio atração de células que realizarão destruição e remoção do agente agressor

Respostas imunes inatas e adaptativas tem como objetivo bloquear a infecção e eliminar células infectadas (5).

A imunidade inata representa uma resposta rápida e representa primeira linha de defesa do organismo. Os principais componentes da imunidade inata são:

- Barreiras físicas e químicas;

-Células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos), células dendríticas, células natural killer (células NK) e outras células linfoides (plasmócitos);

- Ativação complemento, liberação mediadores inflamatórios, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas (31).

O sistema imunológico inato é uma estratégia de defesa conservada e é crucial na detecção inicial e restrição de patógenos com posterior ativação da resposta imune adaptativa. Ativação efetiva da imunidade inata depende do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), como receptores do tipo Toll (TLRs) e receptores do tipo RIG-I (RLRs) (32).

A resposta imune adaptativa depende da ativação de linfócitos e caracteriza-se por:

- Especificidade e diversidade de reconhecimento;
- Memória;
- Resposta especializada;
- Autolimitação;
- Tolerância aos componentes próprios do organismo (5,31).

3.2 RESPOSTAS IMUNES NO CONTROLE DAS INFECÇÕES VIRAIS

As principais vias de controle da infecção viral, pela imunidade inata, ocorrem através da produção de interferons do tipo I, cuja ação mais importante é a inibição da replicação viral e a destruição das células infectadas pelos Macrófagos e as células NK (33). Os Interferons do tipo I (IFN tipo I) são glicoproteínas produzidos por células em resposta direta à infecção por vírus, e compreendem um grande número de subespécies de Interferons - alfa (IFN- α) e um único Interferon - beta (IFN- β). A forma alfa é produzida principalmente por células dendríticas plasmocitóides e a forma beta por muitos tipos celulares, mas principalmente por fibroblastos, quando invadidos por vírus. Interferons (IFNs) induzem a própria célula infectada e células próximas a produzirem proteínas que impedem a replicação viral. O estímulo à produção de Interferons do tipo I se dá através das células infectadas pelo vírus e ao interagir com uma célula não infectada tem propriedade de protegê-la contra infecção (estado antiviral). O IFN tipo I também aumenta a citotoxicidade das células NK e Linfócitos T CD8+, e promovem diferenciação de células T imaturas em células T auxiliares Th1. Eles também regulam positivamente a expressão de moléculas de MHC de classe I e aumentam as chances de as células infectadas serem reconhecidas e destruídas pelos LT CD8 + (5).

O Interferon do tipo II – gama (IFN- γ), também conhecido por interferon imune, é produzido por linfócitos T e células NK quando estimulados por IL-12 e IL-18. O interferon gama é responsável por ativar macrófagos, estimular a expressão do complexo maior de histocompatibilidade, além de atuar no crescimento, maturação e diferenciação de muitos tipos celulares. Ele também aumenta a atividade das células NK, regula atividade inflamatória, potencializa outros interferons e modula atividade dos linfócitos B (5).

Macrófagos e células apresentadoras de antígenos também produzem Interleucina 12 (IL-12) na fase inicial da infecção, estimulando as células NK a exercer citotoxicidade e a produzir mais IFN- γ . Este, por sua vez, aumenta o potencial microbicida dos macrófagos através da estimulação da via Th1 (31).

As células dendríticas são as principais células apresentadoras de antígenos em infecções virais. Encontram-se abaixo da barreira do epitélio das vias aéreas e acima da membrana basal. Elas são capazes de processar os antígenos e associá-los às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Os antígenos virais capturados no exterior das células são processados e unidos ao MHC-II e apresentados aos linfócitos T auxiliares (T CD4+), enquanto os antígenos virais produzidos dentro das células dendríticas são unidos ao MHC-I e apresentados aos linfócitos T citotóxicos (T CD8+). Assim, as células dendríticas constituem o principal elo entre o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo (34).

Além das respostas imunes inespecíficas, existe o desenvolvimento de respostas imunológicas específicas, capazes de reagir a um grande número de substâncias microbianas, e distinguir microrganismos, proporcionando uma atuação mais eficaz contra esses agentes. Esse tipo de resposta é denominado de resposta imune adaptativa. Nela estão presentes células apresentadoras de antígenos e linfócitos, os quais vão atuar na ativação de outras células, produção de citocinas e anticorpos. Deste modo respostas imune inespecíficas e específicas atuam em cooperação para intensificar os mecanismos protetores capazes de combater com maior eficácia microrganismos patogênicos (5). A resposta inata inicial coloca em movimento a resposta imune adaptativa celular e humoral.

A imunidade mediada por célula, também denominada imunidade celular, é mediada por linfócitos T (5). A resposta mediada por células T é extremamente efetiva no mecanismo de defesa contra agentes intracelulares tais como vírus, protozoários, fungos e bactérias intracelulares (35).

Os linfócitos T auxiliares (Linfócitos T CD4+) são células do sistema imune adaptativo e desempenham papéis centrais na função do sistema imunológico como: auxiliar

as células B na produção de anticorpos, regulação da função de macrófagos, organização e regulação das respostas contra uma grande variedade de microrganismos patogênicos, controlando a autoimunidade e ajustando a magnitude e persistência de respostas imunes (31).

A imunidade celular é mediada por células T e serve como um mecanismo de defesa contra microrganismos intracelulares e fagocitados. As células T CD4⁺ efetoras são geradas pelo reconhecimento de antígenos nos órgãos linfoides secundários, entretanto a maioria delas migram para locais da infecção, onde atuam, juntamente com os macrófagos, na eliminação do patógeno. Três grandes grupos de células T CD4⁺ efetoras chamados de Th1, Th2 e Th17 atuam na defesa do hospedeiro contra diferentes tipos de microrganismos. As principais citocinas produzidas pelos principais subgrupos de células T CD4⁺ são IFN- γ para Th1, Interleucina - 4 (IL- 4) e Interleucina -13 (IL-13) para Th2 e Interleucina-17 (IL-17) e Interleucina-22 (IL22) para Th17 (5).

As células da resposta Th1 expressam níveis elevados de receptores de quimiocinas CXCR3 e CCR5 e tendem a ser abundantes em locais de infecção onde os agentes infecciosos desencadeiam fortes reações imunológicas inatas; esses agentes incluem bactérias e vírus. Por outro lado, células da resposta Th2 expressam receptores de quimiocinas CCR3, CCR4 e CCR8. Uma vez que uma resposta imunológica se desenvolve ao longo de uma via efetora ela torna-se cada vez mais polarizado nesta direção (5).

Os vírus utilizam várias moléculas da superfície celular para obter a entrada na célula e para utilizar a maquinaria genética e de síntese proteica das células do hospedeiro para se replicar e disseminar de uma célula para outra. Os vírus não podem ser destruídos se as células infectadas não possuírem mecanismos microbicidas intrínsecos, ou se os vírus estiverem no citosol. Nestas situações a única maneira de erradicar a infecção é matando a célula infectada, liberando o vírus para o meio extracelular, paralisando sua capacidade de sobreviver e de se replicar. A imunidade adaptativa contra os vírus ocorre com ativação de células T CD8⁺ que vão exercer citotoxicidade pelo reconhecimento dos antígenos virais via MHC classe I nas células alvo (31). Além disso os linfócitos T citotóxicos são capazes de secretar citocinas, principalmente IFN- γ que tem a função de ativar fagócitos (5). Os linfócitos T CD8⁺ ativados liberam grânulos perto das células alvos contendo proteínas denominadas Perforinas. Essa proteína facilita a entrada de outra proteína granular denominada Granzima. As Granzimas são enzimas que iniciam uma sequência de eventos de sinalização que causam morte das células alvo por apoptose. A diferenciação completa das células T CD8⁺ muitas vezes depende de citocina produzidas pelas células T CD4⁺ ou os

coestimuladores expressos nas células infectadas (5). Em algumas infecções virais crônicas as respostas das células T CD8 + podem ser iniciadas, mas gradualmente extintas, um fenômeno que é chamado de exaustão. O termo exaustão tem sido utilizado para atribuir uma resposta efetora que se desenvolve, mas está ativamente suprimida. As células TCD8 + exaustas mostram numerosas alterações funcionais e fenotípicas incluindo diminuição da produção de IFN- γ (36).

Uma molécula co-estimulatória com função negativa, a molécula PD-1 (*programmed cell death 1*), é expressa pelas células do sistema imunológico (37). Quando PD-1 está associada a seus ligantes PD-L1 (CD274) ou PD-L2 (CD273), uma sequência inibitória contendo tirosina fosfatase-2 (SHP-2) na cauda de PD-1 recruta fosfatases para desfosforilação das tirosinas na região citoplasmática, processo que pode induzir a desativação das células T ou à indução de apoptose (38). Recentemente foi relatado que, em casos graves e críticos de pacientes com COVID-19, as células T apresentam uma expressão aumentada de PD-1, levando à uma mudança de um estado de hiperativação à uma exaustão destas células (39).

Os monócitos e macrófagos são fagócitos eficientes, englobam patógenos e restos celulares. Além de seu papel na imunidade inata, processam e apresentam antígenos via moléculas de MHC, estimulando a resposta mediada por Linfócitos T (31).

Os macrófagos são células amplamente distribuídas nos órgãos e tecido conjuntivo e têm papel central na imunidade inata e adaptativa. Muitos tecidos são povoados com macrófagos residentes com vida longa. Exemplos são as células de Kupffer que recobrem sinusoides do fígado, macrófagos sinusoides no baço, macrófagos alveolares nos pulmões e células na micróglia do cérebro. Nos adultos as células da linhagem de macrófagos surgem a partir de células precursoras na medula óssea direcionadas por uma proteína denominada fator estimulador de colônia de monócitos (ou macrófagos). Esses precursores evoluem para monócitos que entram e circulam no sangue e, então, migram para os tecidos, especialmente durante as reações inflamatórias onde então eles maturam em macrófagos. A principal função dos macrófagos na defesa do hospedeiro é ingerir e matar microrganismos. Os mecanismos de morte incluem geração enzimática de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NOS) que são tóxicas aos microrganismos além de realizarem digestão proteolíticas. Macrófagos também participam da limpeza após infecção ou lesão tecidual e reparo de tecidos danificados. Os macrófagos podem adquirir capacidades funcionais distintas dependendo dos tipos de estímulos ativadores aos quais estão expostos. Quando ativados pelas células T algumas citocinas os direcionam para se tornarem eficientes em

matar microrganismos o que é chamada de ativação clássica. Outras citocinas ativam os macrófagos para promover o remodelamento e reparo tecidual o que se denomina ativação alternativa (5). A ativação dos macrófagos pode ocorrer no foco inflamatório pela ação de toxinas bacterianas e por citocinas da resposta Th1, sendo estes denominados “macrófagos de ativação clássica” ou macrófagos M1. Outra forma de ativação dos macrófagos, a “ativação alternativa”, ocorre pela ação de citocinas pertencentes à resposta Th2. Estes macrófagos são denominados de macrófagos M2 e desempenham papéis importantes no processo de reparo tecidual. Em resposta a estímulos derivados do ambiente local ou do tipo de patógenos, os macrófagos podem polarizar-se em dois tipos fenotípicos: M1, induzido por ligantes do receptor Toll-like (TLR) e IFN- γ e, a via alternativa - M2, induzido por IL4 / IL13 (M2a), complexo imune (M2b), e as citocinas anti-inflamatórias interleucina – 10 (IL-10) ou fator de crescimento transformador- β (M2c) (40). Macrófagos ativados matam os microrganismos fagocitados pela ação de moléculas microbidas nos fagolisossomas. Os macrófagos ativados convergem oxigênio molecular em espécies reativas de oxigênio (ROS) que são agentes oxidantes altamente reativos e que destroem microrganismos e outras células. Em adição às ROS, os macrófagos produzem espécies reativas de nitrogênio principalmente óxido nítrico (NO) pela ação da enzima chamada óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) (5). A IL-4 e IL13 ativam os macrófagos para expressar as enzimas que promovem a síntese de colágeno e fibrose. A resposta dos macrófagos às citocinas Th2 tem sido chamada de ativação alternativa de macrófagos, para distingui-la da ativação induzida por IFN- γ que foi caracterizada primeiro (via clássica). As citocinas Th2 também suprimem a via clássica e interferem na proteção imunológica mediada pelas respostas Th1 às infecções intracelulares (31).

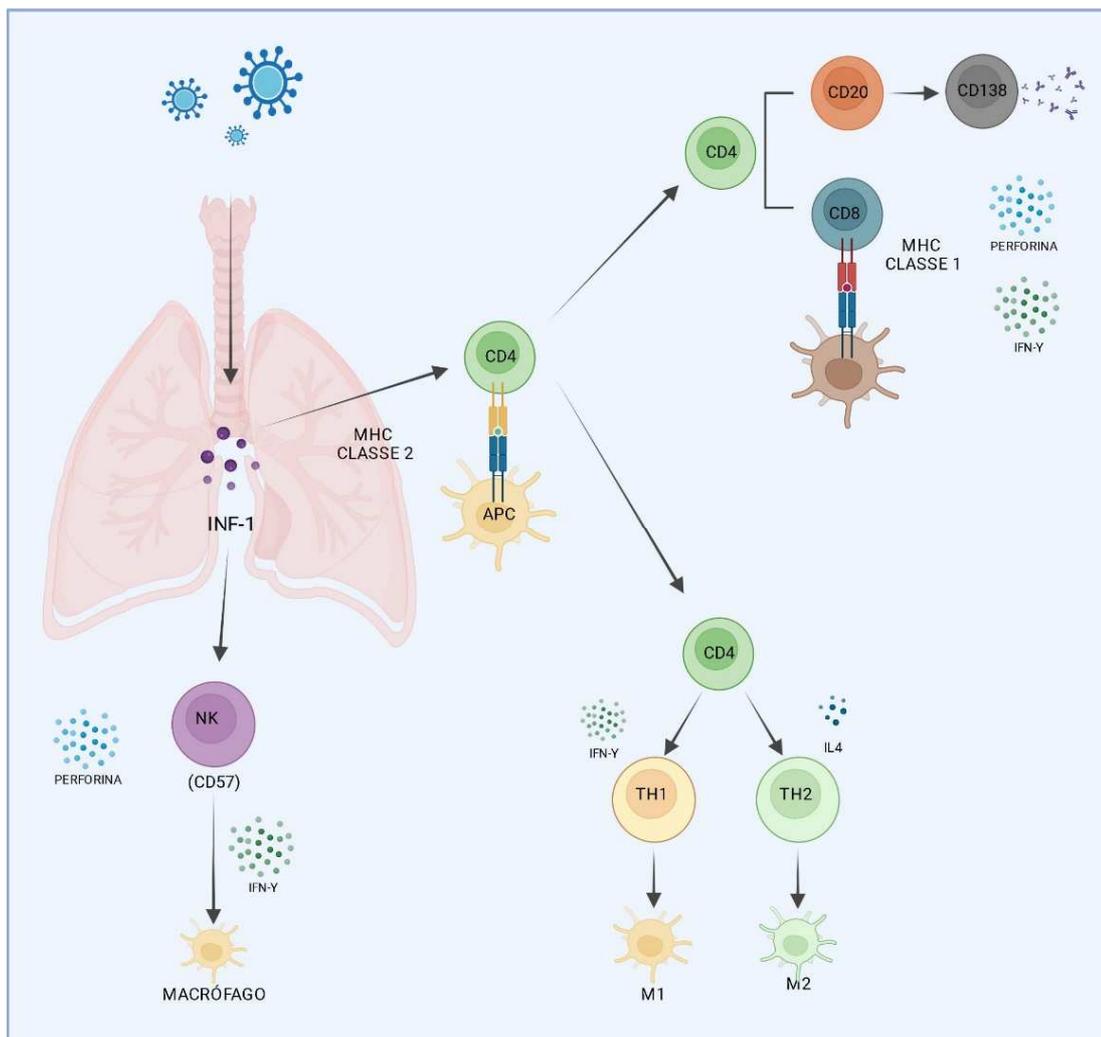


Figura 1: Respostas imunes no controle das infecções virais

O vírus inicia invasão celular e estimula produção de interferons do tipo I que inibem a replicação viral e estimulam macrófagos e células NK na destruição das células infectadas. Vários receptores reconhecem as partículas virais e iniciam as vias de sinalização. Os antígenos virais capturados no exterior das células são processados e unidos ao MHC-II e apresentados aos LTCD4+ auxiliares. Os linfócitos LTCD4+ auxiliam as células B (CD20) na produção de anticorpos, regulam a função de macrófagos (vias Th1 e Th2), organizam e regulam a resposta imune, controlando a autoimunidade, ajustando a magnitude e a persistência da resposta. A ativação dos linfócitos T CD8+ ocorre pelo reconhecimento dos antígenos virais via MHC classe I nas células alvo. Os linfócitos T citotóxicos ativados vão secretar citocinas, principalmente IFN- γ , que irá ativar fagócitos e também liberam grânulos contendo proteínas denominadas Perforinas, as quais irão destruir células infectadas. Desenho esquemático desenvolvido pela autora através Software Biorender, 2022.

Ao contrário, uma resposta disfuncional, incapaz de inibir a replicação viral e a eliminação de células infectadas, poderá resultar em uma resposta inflamatória exagerada levando, possivelmente, a uma tempestade de citocinas, manifestada clinicamente pela síndrome da angústia respiratória aguda grave (SDRA) e consequências sistêmicas como coagulação intravascular disseminada (CIVD) (41).

3.3 SISTEMA IMUNOLÓGICO - RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA COVID - 19

O vírus SARS-CoV-2 afeta principalmente o sistema respiratório, embora outros sistemas e órgãos possam estar envolvidos. Infecção do trato respiratório inferior e sintomas relacionados, incluindo febre, tosse seca e dispneia, foram relatados na série de casos iniciais de Wuhan, China (27). Além disso, dor de cabeça, tontura, fraqueza generalizada, vômito e diarreia também foram relatados (29). Sabe-se atualmente que os sintomas respiratórios da COVID-19 são extremamente heterogêneos, variando de sintomas mínimos a hipóxia significativa com SDRA (42). Enquanto a maioria dos indivíduos infectados permanece assintomática ou apresenta sintomas leves do trato respiratório superior, outros desenvolvem quadros graves de pneumonia, que pode progredir para a síndrome respiratória aguda (43).

A disseminação do vírus inicia-se, em média, no quinto dia após a exposição ao vírus e a infectividade parece reduzir significativamente após dez dias do início dos sintomas. Apesar disso, partículas virais ainda podem ser detectadas na orofaringe, em média, entre 20 e 37 dias nos indivíduos infectados (44). Os sintomas iniciais são limitados ao trato respiratório superior – alteração de olfato e paladar, tosse e dor de garganta –, acompanhados de febre, fadiga e dor muscular. SARS-CoV-2 infecta principalmente pneumócitos, enterócitos e macrófagos, mas também pode infectar outras células que expressam o receptor enzima de conversora da angiotensina 2 (ECA2) e a enzima proteolítica Serina Protease Transmembrana 2 (TMPRSS2). No entanto, alguns estudos sugerem que o vírus pode infectar muitos outros tipos celulares, tais como células endoteliais (45,73)

No início da infecção o SARS-CoV-2 tem como alvo células epiteliais nasais, células brônquicas e pneumócitos. Ele se liga a essas células por meio da proteína de pico estrutural viral Spike (proteína S) que se liga ao receptor da enzima de conversora da angiotensina 2 (ECA2). A serina protease transmembrana tipo 2 (TMPRSS2), presente na célula hospedeira, promove a absorção viral por clivar ECA2 e ativar a proteína S do SARS-CoV-2, permitindo a entrada do coronavírus nas células hospedeiras (35).

Após a ativação por PAMPs, os PRRs recrutam proteínas adaptadoras, que iniciam vias de sinalização envolvendo múltiplas citocinas. Isso leva à ativação de fatores de transcrição cruciais, incluindo o fator regulador do interferon 3 (IRF3), o fator nuclear intensificador de cadeia leve kappa de células B ativadas (NF- κ B) e proteína ativadora I (AP-1). Sinergicamente esses fatores promovem a produção de interferons do tipo I (IFN-I), que são liberados e atuam sobre células por ligação ao receptor de IFN- α/β (IFNAR) (46).

Essas quimiocinas atraem células da resposta inata [leucócitos polimorfonucleares, monócitos, células NK, células dendríticas], que também produzem quimiocinas, como MIG, IP-10 e MCP-1, capazes de recrutar linfócitos, que por sua vez, reconhecerão os antígenos virais apresentados pelas DCs (47).

Alguns vírus, incluindo SARS-CoV -2, são citopáticos, ou seja, induzem dano celular e morte em tecidos infectados por piroptose. Aumento dos níveis de IL-1, uma das citocinas pró-inflamatórias características liberadas durante a piroptose, foram recentemente relatados em pacientes com infecção por SARS-CoV-2. Os componentes liberados pela lise do epitélio respiratório, tais como ATP, DNA entre outros podem então ser detectadas como DAMPs (padrões moleculares associados a danos) pelos PRRs de outras células epiteliais e macrófagos alveolares, resultando em sua ativação. Em uma situação fisiológica essa resposta favoreceria a eliminação do microrganismo, devido à atividade de depuração dos macrófagos alveolares. No entanto, alguns pacientes, seja pela alta carga viral e/ou fatores de risco imunogenéticos individuais, podem apresentar uma resposta imune disfuncional, resultando em e/ou hiperinflamação pulmonar difusa, desencadeada por superprodução de citocinas (síndrome da tempestade de citocinas) ou síndrome de ativação de macrófagos (MAS) (48).

Embora tenhamos ampliado muito nossos conhecimentos sobre quadro clínico da doença, pouco se sabe sobre sua imunofisiopatologia nos seus diversos estágios: leve, moderada, grave e crítica. Diversos estudos deverão ser realizados para elucidar os diversos cursos clínicos da doença, concentrando-se nas áreas do trato respiratório que estão envolvidas (49).

4 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo avaliar infiltrados celulares inflamatórios em amostras de biópsias pulmonares, a fim de compreender a resposta imune celular desencadeada em pacientes que faleceram em decorrência da COVID-19, e comparar os resultados obtidos com amostras de tecido pulmonar de pacientes que foram à óbito por Influenza A, subtipo H1N1pdm09.

4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar as amostras estudadas de acordo com o gênero e faixa etária;
- Avaliar a imunexpressão tecidual dos seguintes biomarcadores: Arginase-1, CCR4, CD3, CD4, CD8, CD20, CD57, CD68, CD138, IL-4, INF- α , INF- γ , iNOS, PD -1, Perforina e Esfingosina-1.
- Comparar os resultados obtidos acima com amostras de pacientes que foram a óbito por influenza A, subtipo H1N1 pandêmico (H1N1pdm09).

5 MÉTODOS

5.1 APROVAÇÃO ÉTICA

A realização do estudo retrospectivo foi aprovada pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob os protocolos 3.944.734/2020 e 2.550.445/2018. A metodologia foi realizada de acordo com as diretrizes e regulamentação vigente. As famílias permitiram a biópsia post mortem dos casos de COVID-19 e H1N1pdm09 e assinaram os termos de consentimento informado.

5.2 AMOSTRAS

Grupo COVID-19 (n = 24): Amostras pulmonares *post mortem* de pacientes que morreram de infecção por SARS-CoV-2 de março a agosto de 2020. Após a constatação da morte, os representantes legais dos pacientes que se adequavam aos critérios de inclusão para comporem o grupo COVID-19 eram comunicados. Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 3**) foi submetido à sua assinatura com a finalidade de esclarecimentos gerais a respeito do estudo, assim como dos protocolos da coleta e permissão da utilização da amostra pulmonar.

Uma biópsia pulmonar minimamente invasiva foi realizada através de uma minitoracotomia anterior esquerda com ressecção de um segmento do lobo superior esquerdo. As peças ressecadas mediam 3 × 3 cm. O tempo de obtenção da amostra pulmonar após a morte foi inferior a 2 horas. As amostras foram acondicionadas em um frasco contendo solução de formalina a 10%, onde posteriormente foram embebidas e emblocadas em parafina, para fins histológicos.

Os dados clínicos (tempo de ventilação mecânica e tempo do internamento até óbito) e os dados demográficos (sexo e idade) foram obtidos dos prontuários durante a permanência destes pacientes na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Marcelino Champagnat em Curitiba, Brasil.

O teste para COVID-19 foi realizado através de swabs nasofaríngeos colhidos durante a internação na UTI e realizado Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR). A amplificação do genoma viral foi realizada com o kit Invitrogen SuperScript™III Platinum® One-Step qRT-PCR (Número de catálogo: 11732020, Waltham, MA, EUA), foi positivo para SARS-CoV-2.

5.2.1 Critérios de inclusão dos pacientes COVID-19:

- Idade maior de 18 anos;
- Admissão hospitalar por quadro clínico compatível com COVID-19: febre, dispneia ($SaO_2 < 92\%$) e/ou tosse;
- Testes imunológicos ou moleculares confirmando a infecção pelo SARS-CoV-2;
- Tempo da coleta após a morte menor do que 4 horas.

5.2.2 Critérios de exclusão dos pacientes COVID-19:

- Sorologia negativa para COVID-19;
- Diagnóstico de outras infecções virais como HIV, Hepatite C e B ou outro vírus respiratório comum, além de tuberculose*;
- Negação da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por parte de um representante legal.

O grupo H1N1 ($n = 10$) foi composto por amostras *post mortem* de pulmões de pacientes cuja causa de morte foi infecção respiratória aguda grave por Influenza A subtipo H1N1 pandêmico de 2009 (H1N1pdm09). Os fragmentos de pulmão são provenientes do banco de amostras teciduais parafinadas de necropsias do Hospital das Clínicas (HC) de Curitiba, Brasil.

Os pacientes foram testados por meio da técnica de RT-qPCR (técnica similar à do grupo COVID-19), sendo possível a caracterização positiva para H1N1pdm09. As amostras foram fixadas em formalina a 10%, onde posteriormente foram embebidas e emblocadas em parafina, para fins histológicos.

Dados como sexo e idade dos pacientes foram obtidos por meio de uma pesquisa direta nos laudos de necropsias, além do tempo entre o internamento/diagnóstico e o óbito.

5.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

As amostras pulmonares parafinadas foram submetidas a cortes histológicos com a finalidade de atender às necessidades das colorações histoquímicas e ensaios imuno-histoquímicos utilizados no presente estudo. Cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina - H&E (Hematoxilina de Harris: NewProv, Cód. PA203, Paraná, BR; Eosina: BIOTEC Reagentes Analíticos, Cód. 4371, Paraná, BR), foram realizados com o objetivo de analisar as características anatomopatológicas.

5.4 ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS

O ensaio imunohistoquímico foi precedido pela preparação de blocos de tecido parafinado multiamostrais, TMA (*Tissue Microarray*) (71). As áreas representativas do pulmão foram previamente demarcadas e identificadas. Em seguida, três fragmentos cilíndricos medindo 0,3 cm de diâmetro foram extraídos dos blocos originais fixados em formalina e embebidos em parafina (blocos doadores) e compilados em novos blocos de TMA.

A técnica de imuno-histoquímica foi aplicada para identificar a imunexpressão dos seguintes biomarcadores: Arginase-1, CCR4, CD3 (Linfócito TCD3+), CD4 (Linfócito TCD4+), CD8 (Linfócito TCD8+), CD20 (Linfócitos B), CD57 (Células NK), CD68 (Macrófagos), CD138 (Plasmócitos), IL-4, INF- α , INF- γ , iNOS, PD-1, Perforina-1 e Esfingosina-1.

Tabela 1. Dados dos anticorpos utilizados no estudo

Anticorpo	Tipo	Clone/Cod	Diluição	Marca	Espécies reativas
CD3	Policlonal/Coelho	IR503	Pronto para uso	Dako	Humano
CD4	Monoclonal/Camundongo	IS649	Pronto para uso	Dako	Humano
CD8	Monoclonal/Camundongo	IS623	Pronto para uso	Dako	Humano
CD20	Monoclonal/Camundongo	IR604	Pronto para uso	Dako	Humano
CD57	Monoclonal/Camundongo	IR647	Pronto para uso	Dako	Humano
CD68	Monoclonal/Camundongo	KP-1	1:400	BioSB	Humano
CD138	Monoclonal/Camundongo	IR642	Pronto para uso	Dako	Humano
Arginase-1	Monoclonal/Coelho	E-P261	1:200	BioSB	Humano
Anti-IL-4	Policlonal/Coelho	PA5-25165	1:200	Thermo Fisher	Humano, Camundongo
Anti- INF- α	Policlonal/Coelho	A0285	1:200	ABclonal	Humano, Rato, Camundongo
Anti- INF- γ	Policlonal/Coelho	Ab218426	1:100	Abcam	Humano
Anti- iNOS	Monoclonal/Coelho	E-P261	1:100	BioSB	Humano
Anti – PD1	Monoclonal/Camundongo	J116	1:100	Thermo Fisher	Humano
Perforina-1	Monoclonal/Camundongo	SB10	1:100	BioSB	Humano
CCR4	Policlonal/Coelho	Ab216560	1:400	Abcam	Camundongo, Rato
Anti-Efingosina-1	Policlonal/Coelho	Ab71700	1:200	Abcam	Humano, Rato, Camundongo

A técnica recomendou um protocolo de incubação durante a noite para anticorpos primários. O polímero secundário (Mouse/Rabbit PolyDetector DAB HRP Brown,

BSB0205, BioSB, Santa Barbara, CA) foi aplicado ao material testado por 40 minutos em temperatura ambiente. A revelação ocorreu com a adição do complexo 2, 3 diaminobenzeno para um tempo de coloração marrom e, posteriormente, foi realizada a contracoloração com Hematoxilina de Harris. Os resultados foram confirmados pela reatividade de um controle positivo, onde uma amostra de tecido de imunexpressão conhecida como positiva para o anticorpo em questão foi alocada juntamente com as amostras estudadas.

5.4.1 Morfometria:

As lâminas imunocoradas pelos marcadores de Arginase-1, CCR4, IL-4, INF- α , INF- γ e iNOS foram escaneadas com o Axio Scan.Z1 Scanner (ZEISS, Jena, Germany), e em seguida o software ZEN Blue Editions (ZEISS, Jena, Alemanha) foi utilizado para a geração de 30 campos de grande aumento (ampliação de 40X) (grupo COVID-19) e 20 campos de grande aumento (ampliação de 40X) (grupo H1N1), aleatoriamente, das amostras elegíveis. A diferença no número de campos de grande aumento deveu-se à melhor qualidade nas lâminas das amostras da COVID-19 (menor quantidade de amostras em branco, rasuradas ou com artefatos). Após realização de uma máscara, as áreas de imunopositividade foram medidas pelo software Image-Pro Plus 4.5 (micrômetros quadrados) (Media Cybernetics, Rockville, MD). Posteriormente, essas áreas foram convertidas em porcentagens.

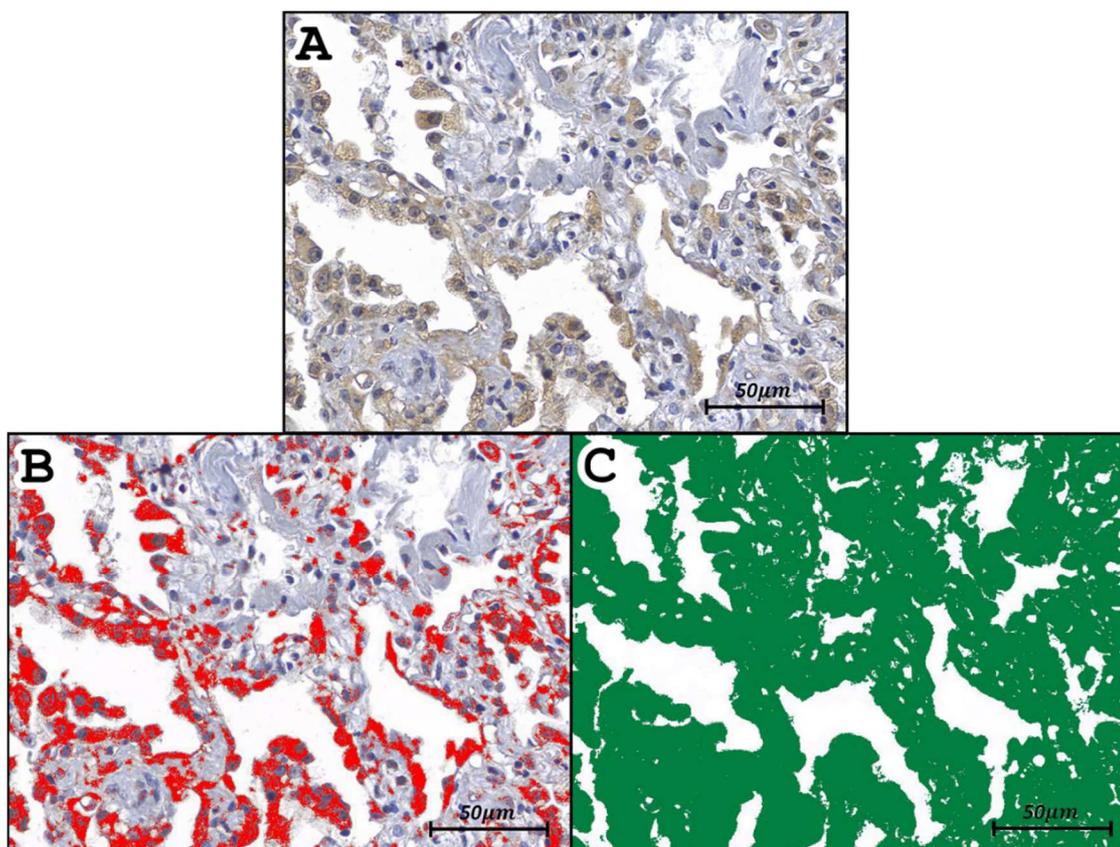


Figura 2: Segmentação semiautomatizada por cores da análise morfométrica.

Composição de imagens demonstrando os processos da segmentação semiautomatizada por cores. A: Imagem de uma lâmina imunomarcada com anti-IL-4 digitalizada. B: Imagem da área imunopositiva delimitada com o auxílio do Programa Image Pro Plus. C: Imagem cuja área total foi delimitada artificialmente, com o intuito da quantificação do seu valor. Imagens de Seigo Nagashima, 2021.v

5.4.2 Contagem de Células:

Para marcadores CD3, CD4, CD8, CD20, CD57, CD68, CD138, PD-1 e Perforina-1 foi realizado contagem celular. Apenas as células imunoexpressas foram contadas em 20 campos de grande aumento (CGA), nos septos alveolares e espaços perivasculares, com o microscópio óptico BX 50 (OLYMPUS, Tóquio, Japão). Em seguida, foram calculados os valores médios aritméticos dos 20 CGA de cada paciente, seus resultados organizados e posteriormente submetidos à análise estatística.

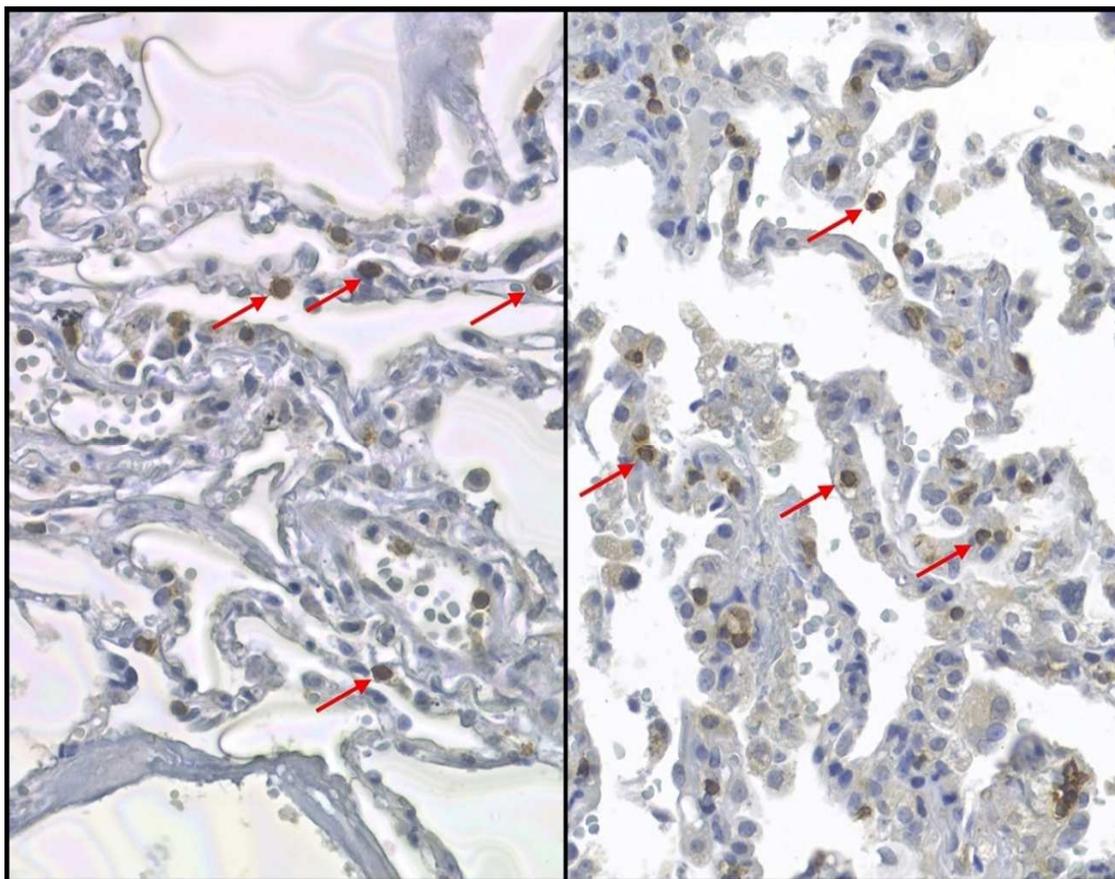


Figura 3: Contagem de células. Imagens demonstrando a contagem de células imunocoradas pelo marcador CD3 (setas vermelhas)

5.4.3 Allred Score:

As lâminas imunocoradas pela Esfingosina-1 foram observadas ao microscópio óptico e analisadas em 10 campos de grande aumento, utilizando o método de pontuação conhecido como Allred Score. Este método avalia a proporção e intensidade da imunopositividade de macrófagos M2 e pneumócitos tipo II. A análise semiquantitativa foi obtida pela soma de dois escores (proporção e intensidade de positividade), variando de 0 a 8. O escore de proporção foi subdividido de acordo com a porcentagem de imunopositividade celular, em que o escore celular poderia ser 0-0% de células coradas, pontuação 1: < 1%, pontuação 2: 1-10%, pontuação 3: 11-33%, pontuação 4: 34-66% e pontuação 5: >66%. Enquanto a intensidade da positividade foi avaliada: negativa: escore 0, fraca: escore 1, moderada: escore 2 e forte: escore 3.

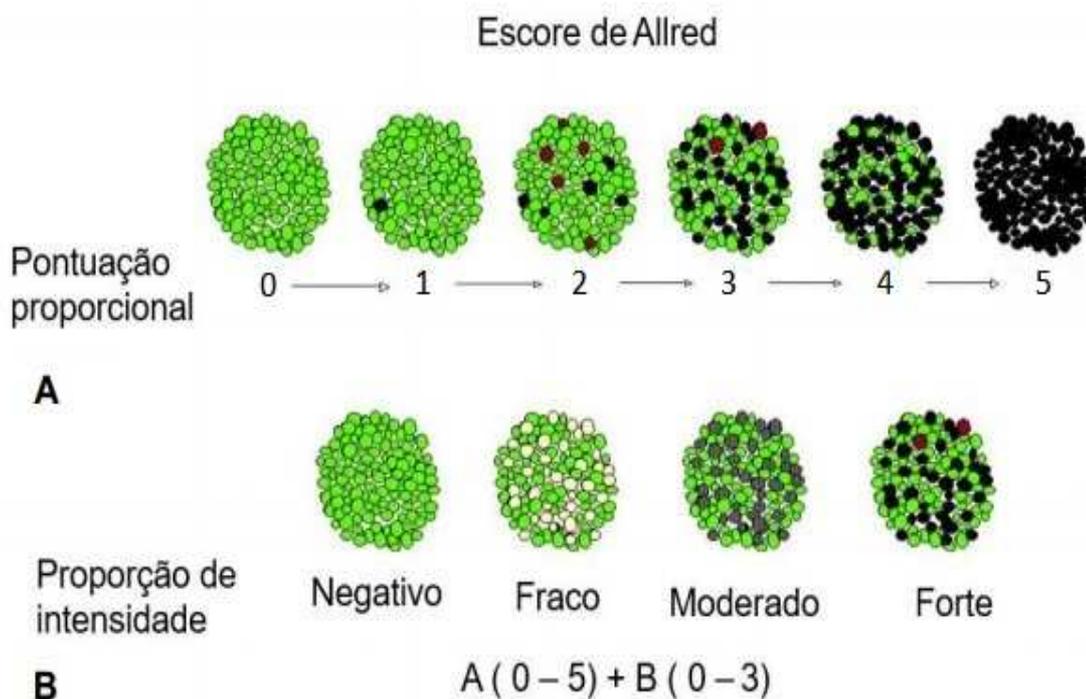


Figura 4: Esquema representado a metodologia do escore de Allred . A cor verde indica as células negativas para imunoposição de determinado anticorpo, enquanto as cores, amarela, cinza, cinza escuro e preto identificam células coradas em diferentes intensidades. **A**: pontuação proporcional; 0: ausência de expressão da proteína analisada; 1: 1% das células com expressão positiva para a proteína analisada; 2: 1-10% das células com expressão positiva para a proteína analisada; 3: 11-33% das células com expressão positiva para a proteína analisada; 4: 34-66% das células com expressão positiva para a proteína analisada; 5: >66% das células com expressão positiva para a proteína analisada; **B**: proporção de intensidade; negativo: ausência de expressão da proteína; fraco: expressão fraca da proteína; moderado: expressão moderada da proteína; forte: expressão forte da proteína. Fonte: adaptado de Choudhury et al., 2010 (50).

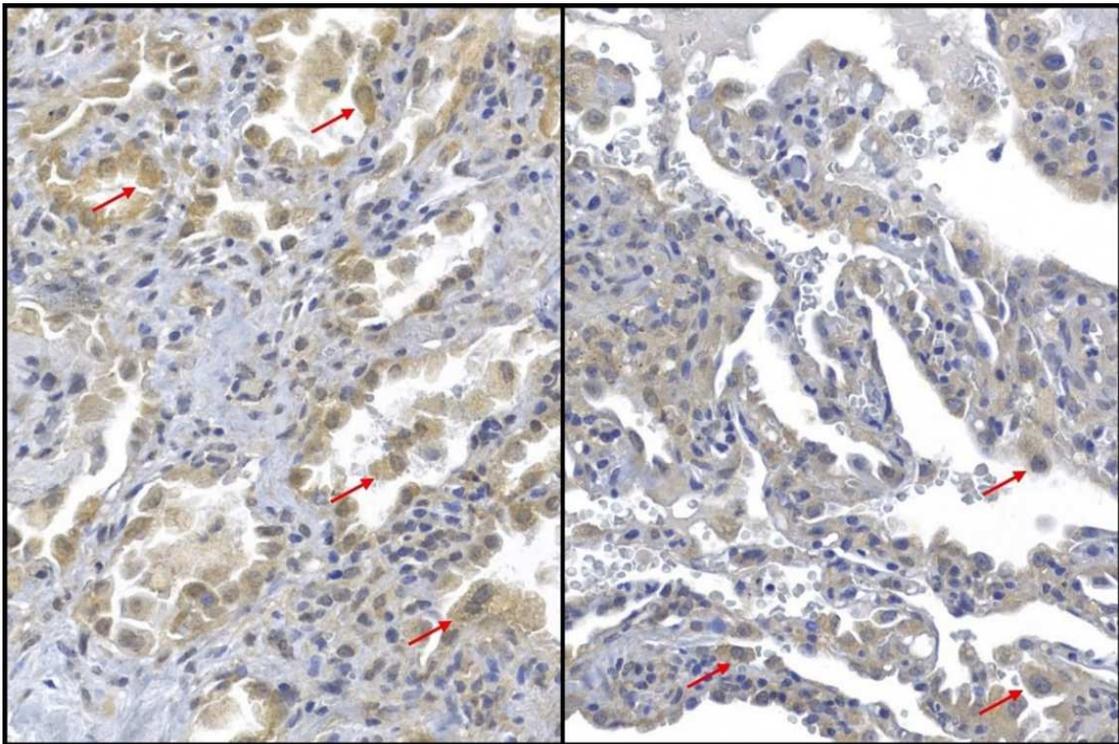


Figura 5: lâminas imunocoradas pela Esfingosina-1 demonstrando score proporcional = 5 e de intensidade = 3 a esquerda; e score proporcional = 4 e intensidade = 2 a direita.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas são expressas pela mediana/intervalo interquartil (mínimo-máximo). Variáveis categóricas expressas por número absoluto (frequência). Para variáveis categóricas expressa em números absolutos foi utilizado Teste exato de Fisher (gênero). Para variáveis demográficas (idade) e variáveis clínicas (tempo de hospitalização até óbito, tempo de ventilação mecânica) expresso pela média \pm desvio padrão foi utilizado Teste t de Student. Para expressão tecidual em porcentagem por campos de grande aumento (Arginase-1, CCR4, CD68, IL-4, INF- α , INF- γ , iNOS), média do número de células por 20 campos de grande aumento (CD3, CD4, CD8, CD20, CD57, CD68, CD138, Perforina -1) e média pontuação Allred foi utilizado Teste de Mann-Whitney. Para avaliação de PD-1 utilizado Teste exato de Fisher. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados por meio do software JPM Pro 14.0.0 (SAS 483 Institute, Cary, NC, USA).

7 RESULTADOS

As análises demográficas, clínicas, histopatológicas os achados dos grupos estão resumidos na Tabela 2:

Tabela 2. Dados gerais dos pacientes do estudo

	COVID-19 (n = 24)	H1N1 (n = 10)	VALOR p
Sexo ^a	Masculino 15 (62.5%) Feminino 9 (37.5%)	Masculino 8 (80%) Feminino 2 (20%)	0.437*
Idade (anos) ^b	71.96 ± 12.5	43.5 ± 14	<0.001**
Tempo entre hospitalização e óbito (dias) ^b	15.87 ± 10.2	4.70 ± 6.13	0.003**
Ventilação Mecânica (dias) ^b	12 ± 9.2	4.7 ± 6.13	0.028**
Doença pulmonar prévia	Asma Brônquica (4/24) Fibrose Pulmonar Intersticial (1/24)	-----	
Comorbidades (número de casos)	Doença arterial sistêmica 15/24 Hipertensão 15/24 Dislipidemia 7/24 Obesidade Grau II e III 5/24 Diabetes Melitus Tipo 2 7/24	-----	
Achados Histopatológicos	Pneumonite intersticial com escassos neutrófilos septais, membrana hialina, hiperplasia pneumócitos	Pneumonite intersticial com grande	

As variáveis contínuas são expressas pela mediana/intervalo interquartil (mínimo-máximo). a Variáveis categóricas expressas por número absoluto (frequência). b Variável demográfica IDADE (anos) e variáveis clínicas Tempo de internação até o óbito (dias) e Tempo de

ventilação mecânica (dias) expressos por média \pm desvio padrão. *Teste exato de Fisher.
**Teste t de Student.

A análise demográfica relacionada ao gênero não revelou resultados estatisticamente significativos. No entanto há um envolvimento considerável das infecções em pacientes do sexo masculino em ambos os grupos. Com relação aos dados relacionados à idade há resultado estatisticamente significativo para o grupo COVID-19 em relação ao H1N1 ($p < 0,001$), considerando a predominância de óbitos em pacientes mais velhos no primeiro grupo. Também é perceptível que os dados referentes ao tempo de internação até o óbito e o uso de ventilação mecânica demonstraram resultados significativamente maiores no grupo COVID-19 ($p = 0,003$ e $p = 0,028$, respectivamente). Em relação às doenças pulmonares pré-existentes, 4 dos 24 pacientes do grupo COVID-19 apresentavam asma brônquica e 1 apresentava fibrose pulmonar intersticial. Os achados histopatológicos mostram pneumonite intersticial com pouca presença neutrofílica no grupo COVID-19 e presença de membrana hialina, hiperplasia de pneumócitos tipo II, fibrose e microtrombose. Em relação ao grupo H1N1, observa-se pneumonite intersticial com alta infiltração de neutrófilos septais e ausência de microtrombos.

Tabela 3. Resultados da expressão tecidual dos biomarcadores do estudo.

	COVID-19 (n = 24)	H1N1 (n = 10)	VALOR p
Àreas marcadas Arginase-1 ^c	14.98/9.36 (5.32-37)	3.81/ 8.60 (1.1-24)	0.002 ^{***}
Àreas marcadas CCR4 ^c	4.77/10.34 (0.19-18.18)	6.14/8.06 (1.19-11.86)	0.845 ^{***}
Número de CD3 ^d	45/52.8 (9.3-168)	48.55/38.92 (29-112.45)	0.533 ^{***}
Número de CD4 ^d	5.9/6.14 (1.45-56.4)	2.8/2.32 (1.55-5.65)	0.009 ^{***}
Número de CD8 ^d	18.8/20.77 (1.9-52.65)	35.7/82.84 (7.5-81.05)	0.03 ^{***}
Número de CD20 ^d	4.02/4.4 (0.6-24.95)	6.3/9.51 (1.85-17.05)	0.416 ^{***}
Número de CD57 ^d	1.08/1.15 (0.3-4.3)	2.58/1.92 (1.35-5.45)	0.001 ^{***}
Número de CD68 ^d	71.52/42.53 (25.75-118.05)	46.7/35.54 (17.8-67.15)	0.013 ^{***}
Número de CD138 ^d	5.78/12.75 (1.45-57.85)	0.58/1.75 (0-4.1)	<0.0001 ^{***}
Àreas marcadas IL-4 ^c	17.5/9.72 (1.02-32.4)	1.36/1.41 (0.36-3.41)	<0.0001 ^{***}
Àreas marcadas INF- α ^c	10.14/14.5 (0.52-32.75)	10.35/7.54 (1.36-20)	0.637 ^{***}
Àreas marcadas INF- γ ^c	8.5/4.39 (4.36-16.62)	8.66/9.5 (1.57-17.34)	0.806 ^{***}
Àreas marcadas iNOS ^c	10.88/11.81 (1.78-23.35)	13.14/8.08 (3.43-19.36)	0.610 ^{***}
Número de PD-1 ^{a,d}	24 (72.7 %)	9 (27.3 %)	0.07 [*]
Número de Perforina-1 ^d	1.98/3.89 (0.55-12)	0.95/0.44 (0.5-2.35)	0.009 ^{***}
Allred de Esfingosina-1 ^e	6/1 (5-7)	5/1 (4-6)	0.06 ^{***}

As variáveis contínuas são expressas pela mediana/intervalo interquartil (mínimo-máximo). ^c Expressão tecidual em porcentagem por CGA. ^d Número de células por 20 CGA (média). Pontuação e Allred (média). ^{*} Teste exato de Fisher. ^{***} Teste de Mann-Whitney.

Em relação aos achados da técnica de imunohistoquímica, observa-se que o grupo COVID-19 demonstrou imunexpressão tecidual significativamente aumentada de Arginase-1 (p=0,002), CD4 (p=0,009), CD68 (p=0,013), CD138 (p< 0,0001) IL-4 (p<0,0001) e Perforina-1 (p=0,009) em comparação ao grupo H1N1.

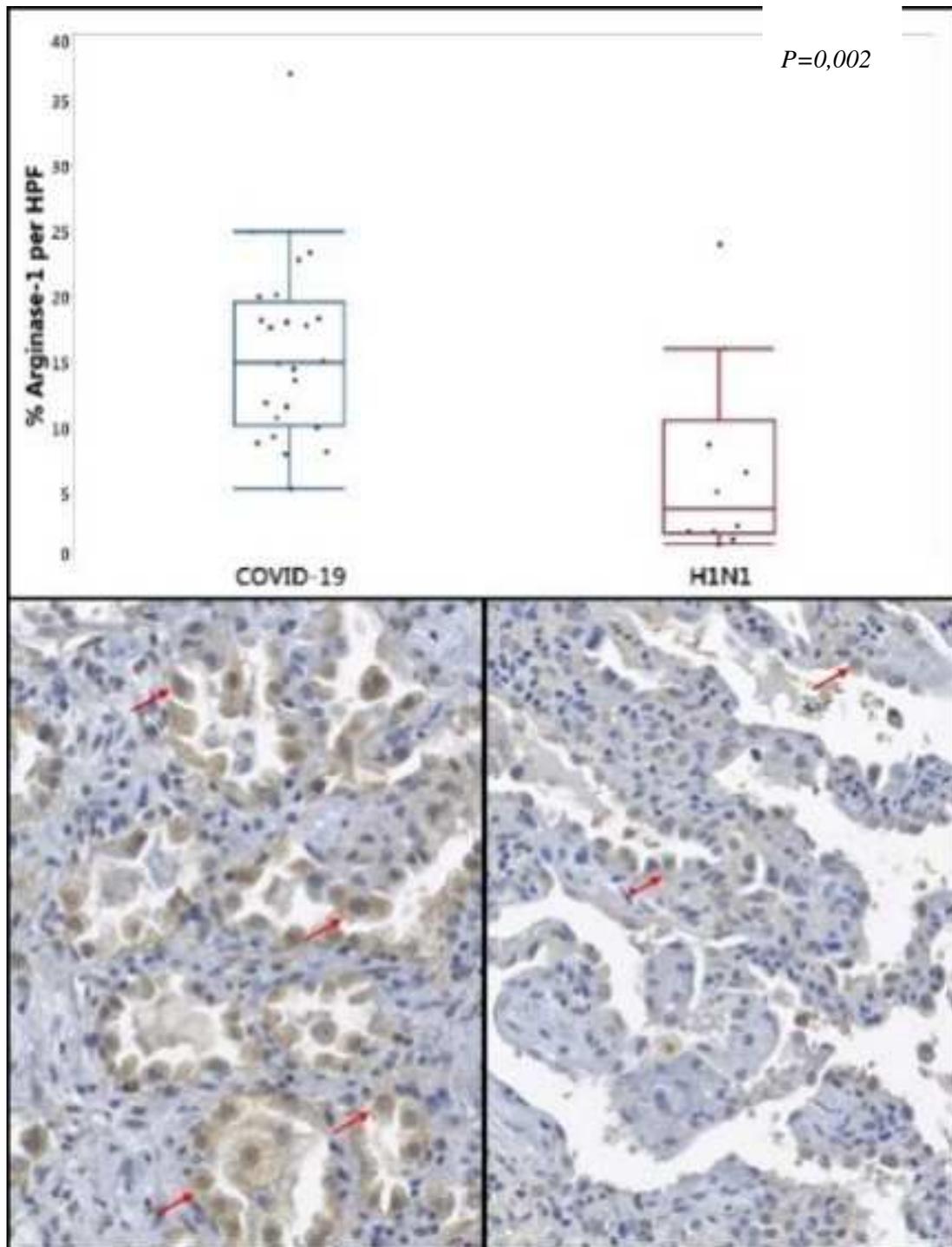


Figura 6: Áreas marcadas por Arginase-1 por campo de grande aumento.
Fonte: Autor 2022

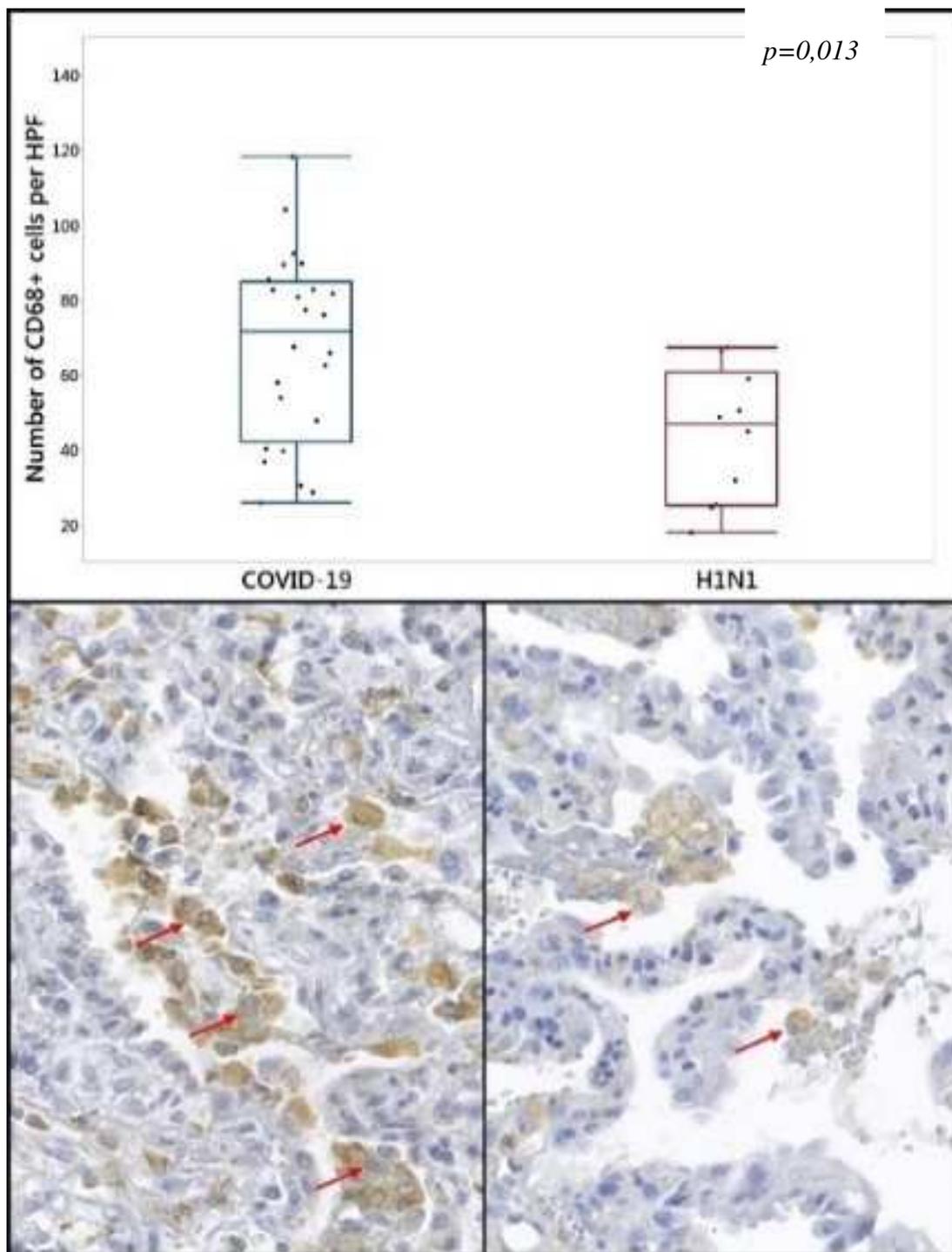


Figura 7: Número de células marcadas por CD68 por campo de grande aumento. Fonte: Autor 2022

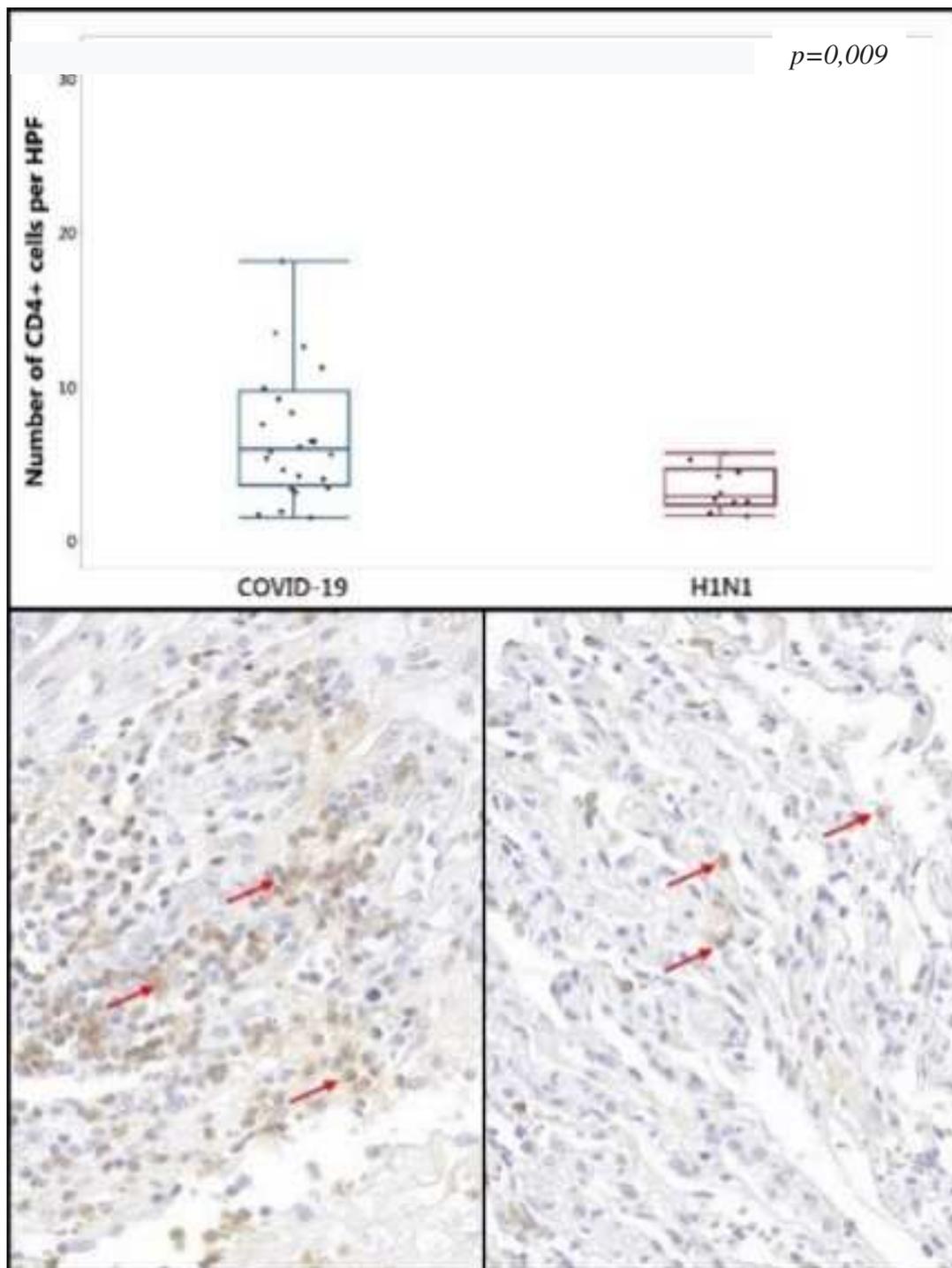


Figura 8: Número de células marcadas por CD4 por campo de grande aumento. Fonte: Autor 2022

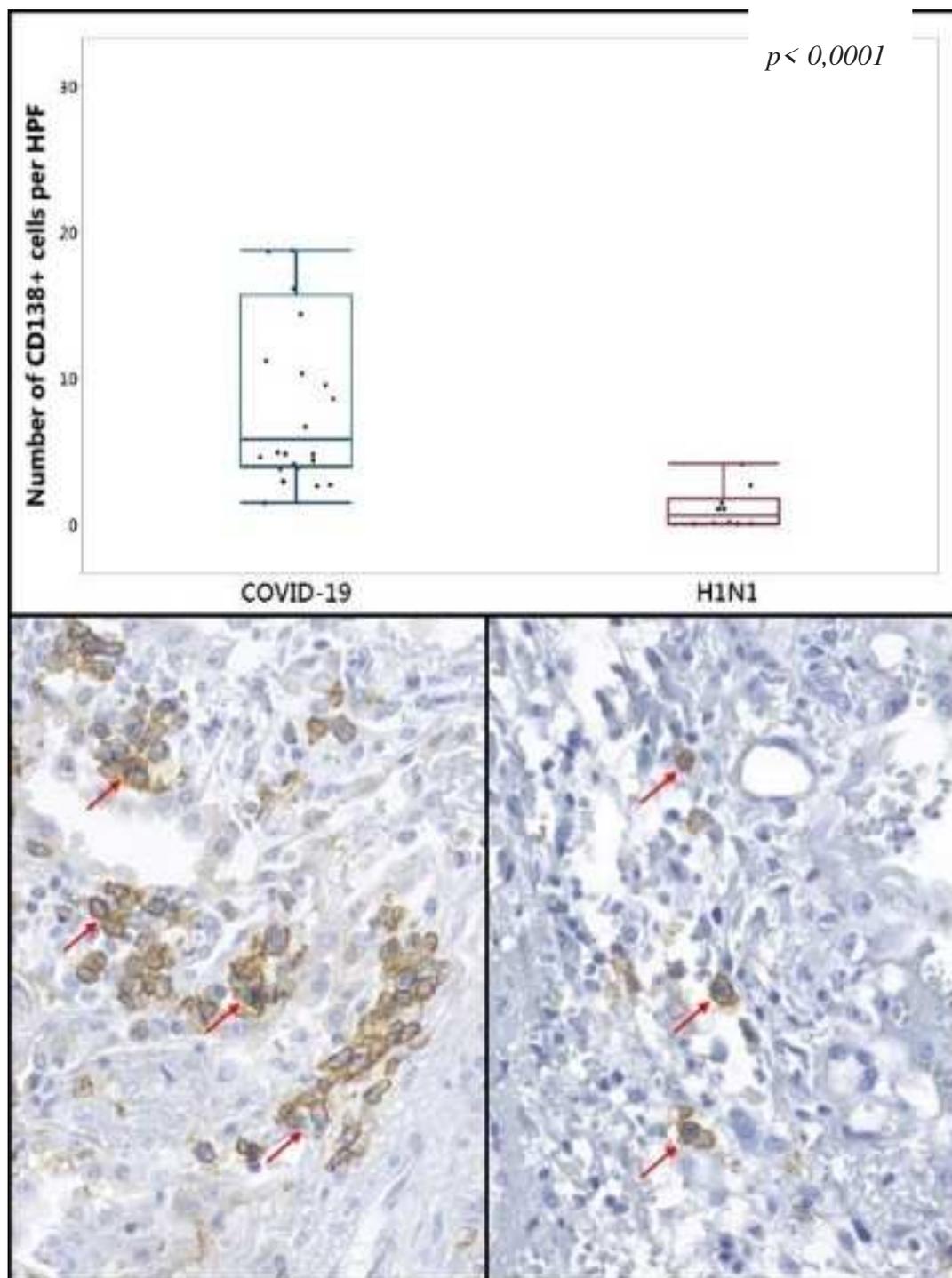


Figura 9: Número de células marcadas por CD138 por campo de grande aumento. Fonte: Autor 2022

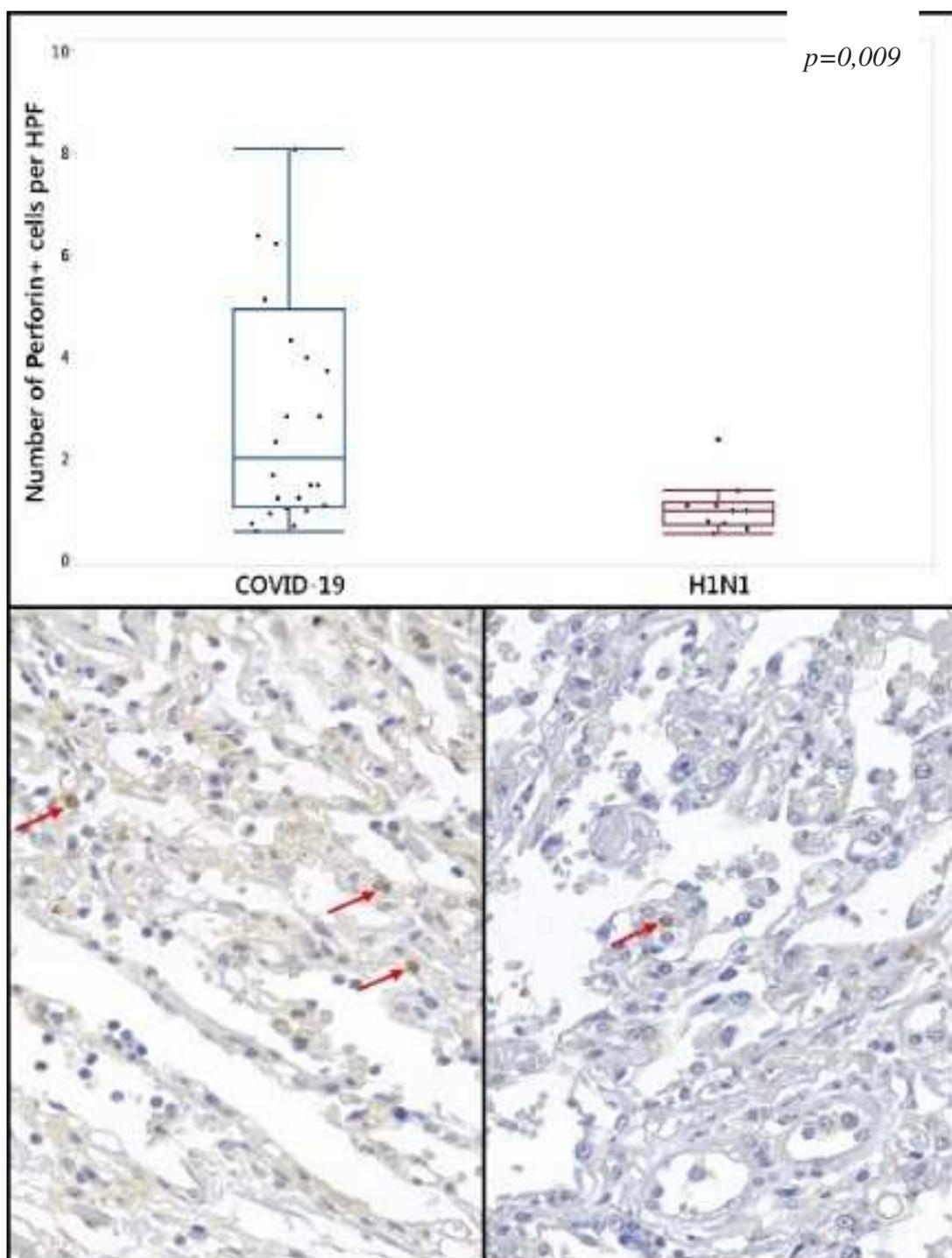


Figura 10: Número de células marcadas por Perforina por campo de grande aumento. Fonte: Autor 2022

A imunoexpressão significativamente diminuída de CD8 e CD57 ($p=0,030$ e $p=0,001$) foi observada no grupo COVID-19 quando comparado ao grupo H1N1.

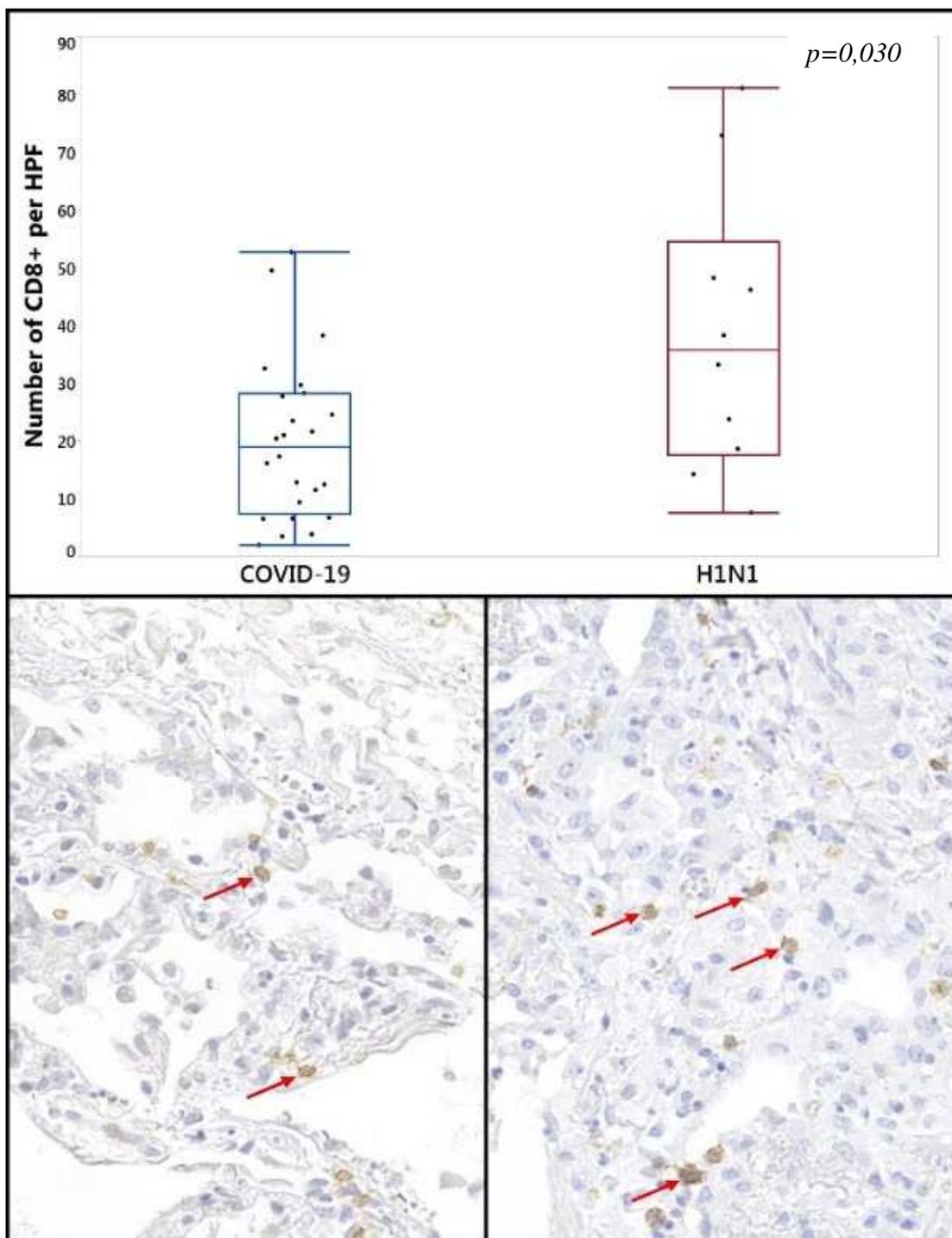


Figura 11: Número de células marcadas por CD8 por campo de grande aumento. Fonte: Autor 2022

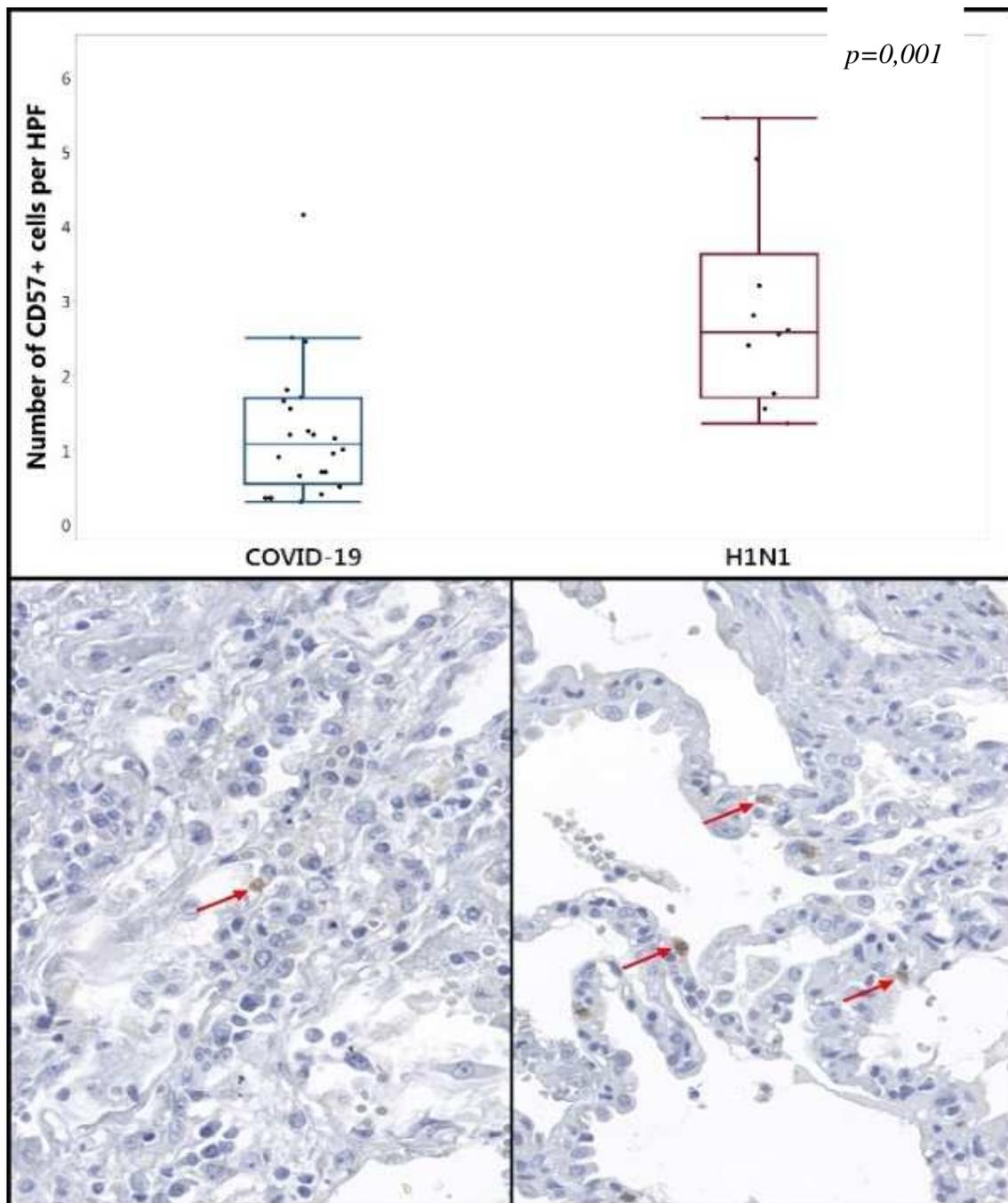


Figura 12: Número de células marcadas por CD57 por campo de grande aumento. Fonte: Autor 2022

Não foram observadas diferenças estatísticas na imunoposição tecidual de CCR4 ($p=0,845$), CD3 ($p=0,533$), CD20 ($p=0,416$), INF- α ($p=0,637$), INF- γ ($p=0,806$), iNOS ($p=0,610$) e Esfingosina-1 ($p=0,06$) e PD-1 ($p=0,07$) no grupo COVID-19 quando comparado com o H1N1.

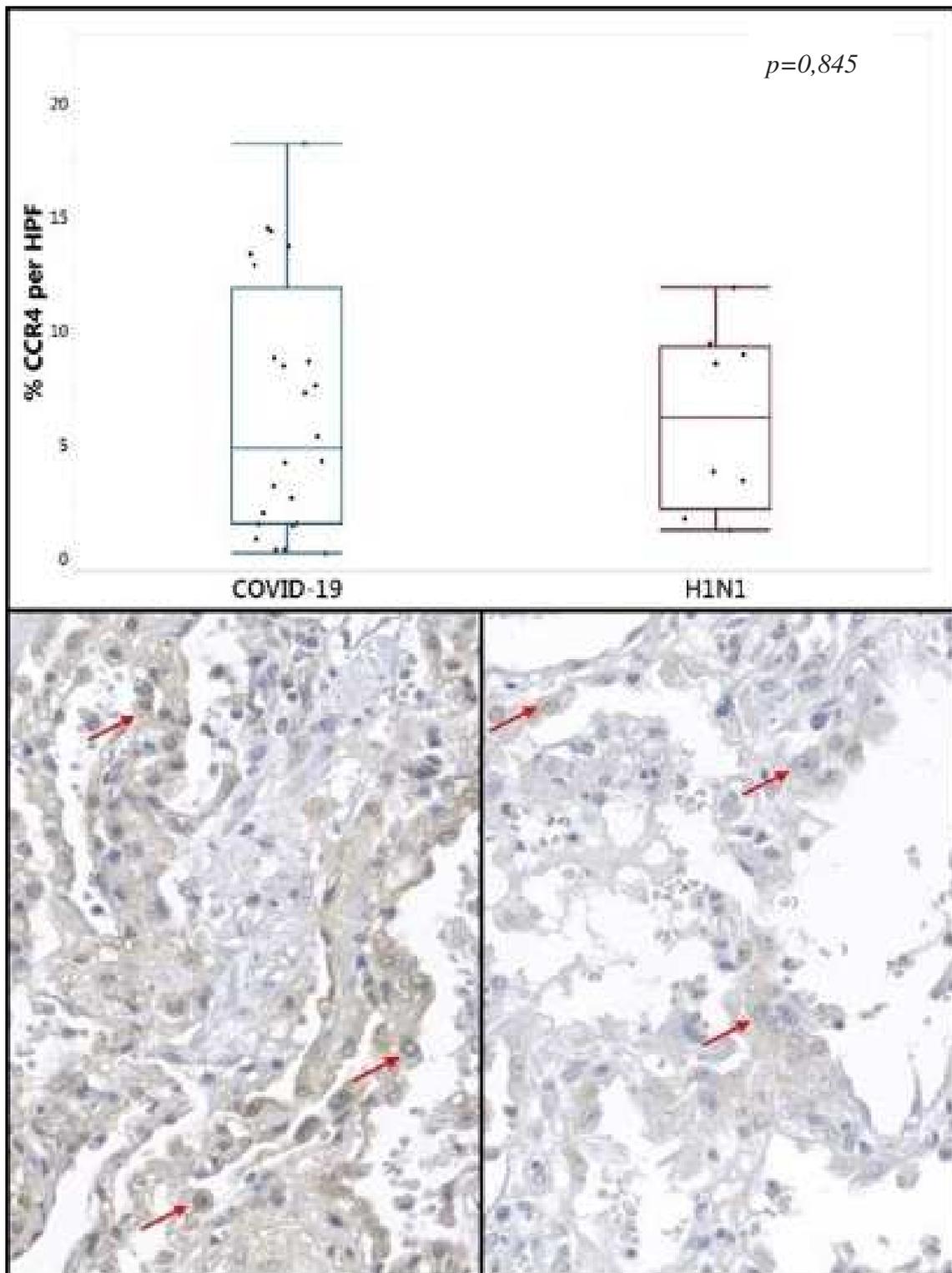


Figura 13: Área marcada por CCR4 por campo de grande aumento.
Fonte: Autor 2022

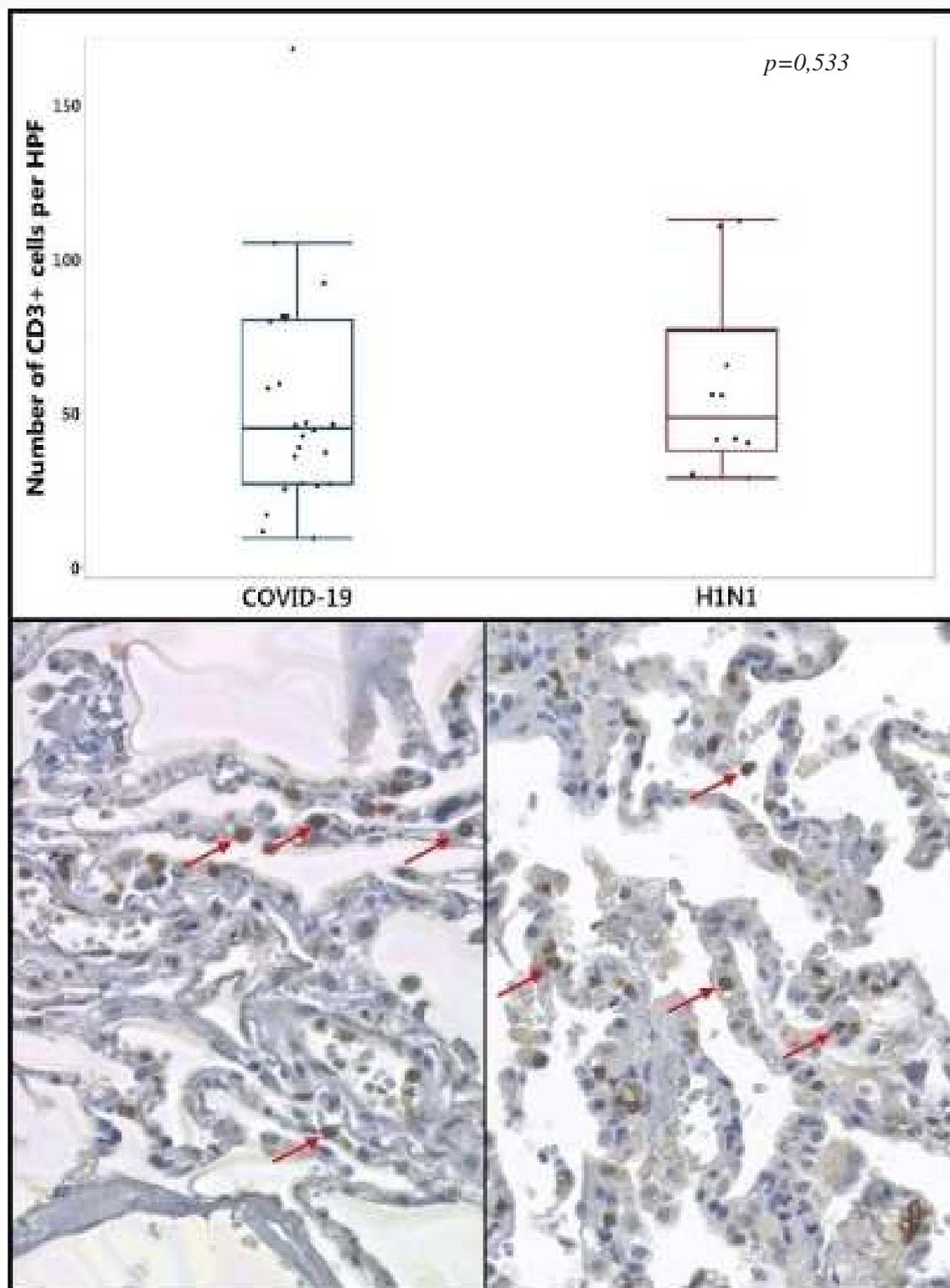


Figura 14: Número de células marcadas por CD3 por campo de grande aumento.

Fonte: Autor 2022

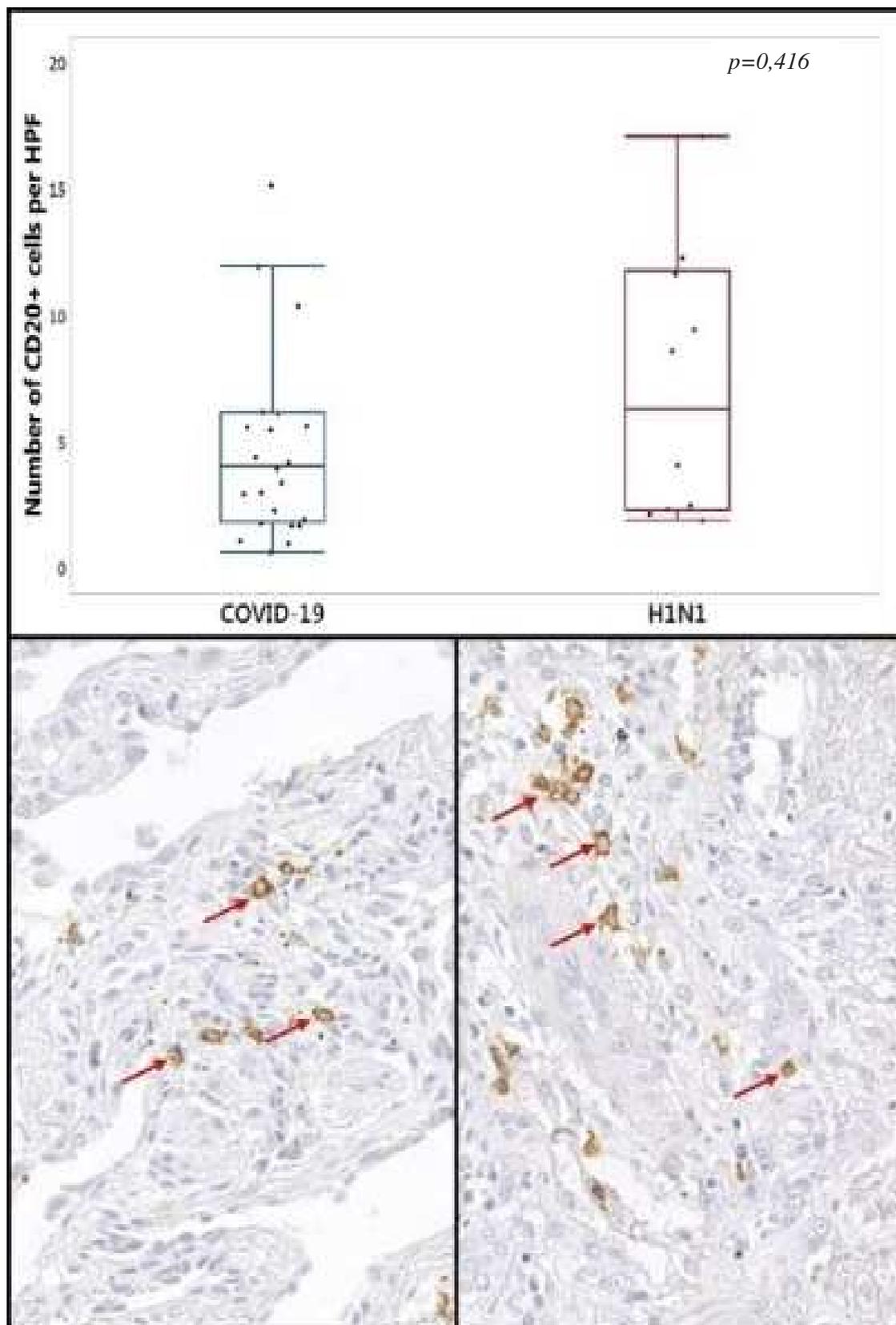


Figura 15: Número de células marcadas por CD20 por campo de grande aumento.

Fonte: Autor 2022

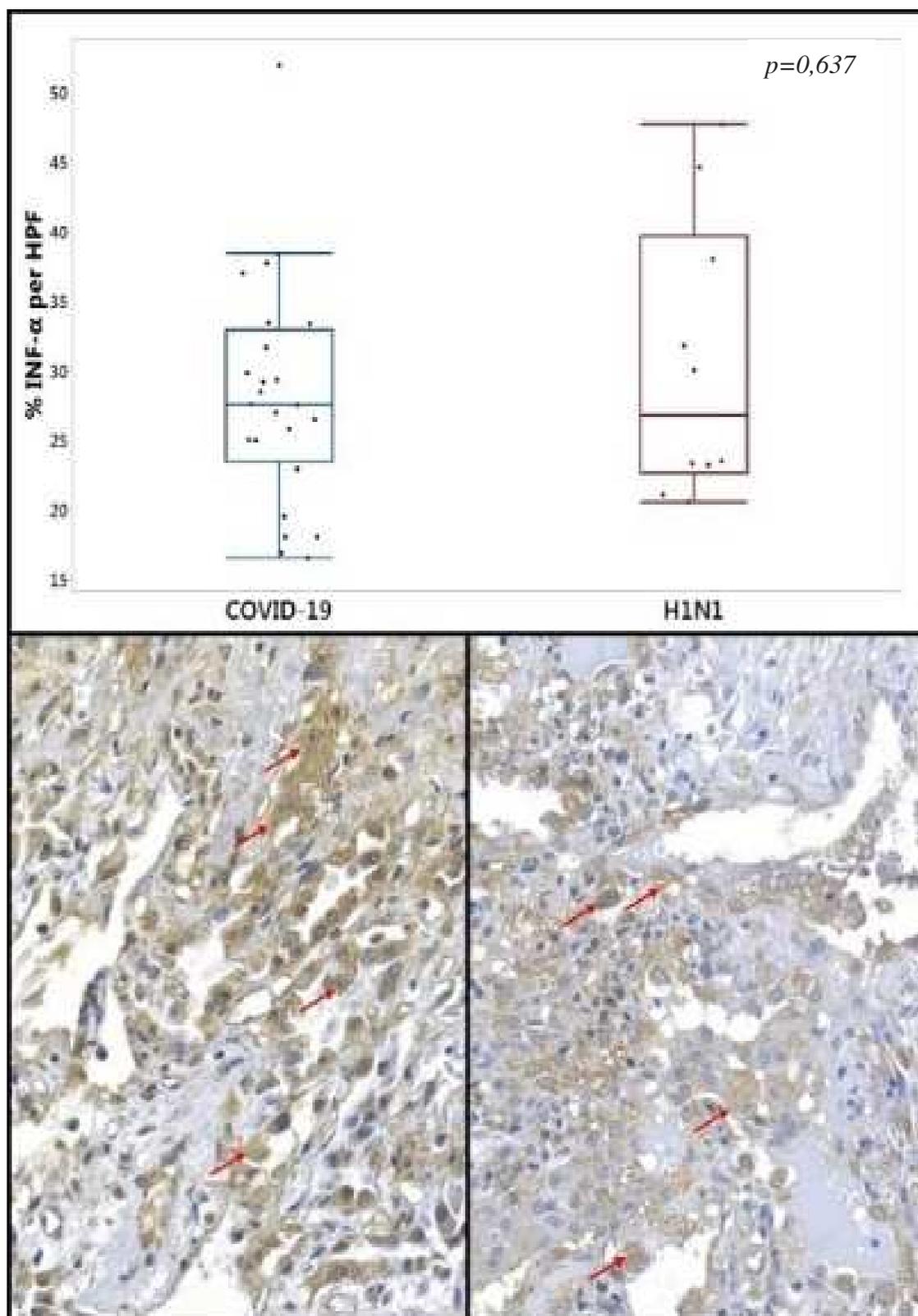


Figura 16: Área marcada por INF- α por campo de grande aumento.

Fonte: Autor 2022

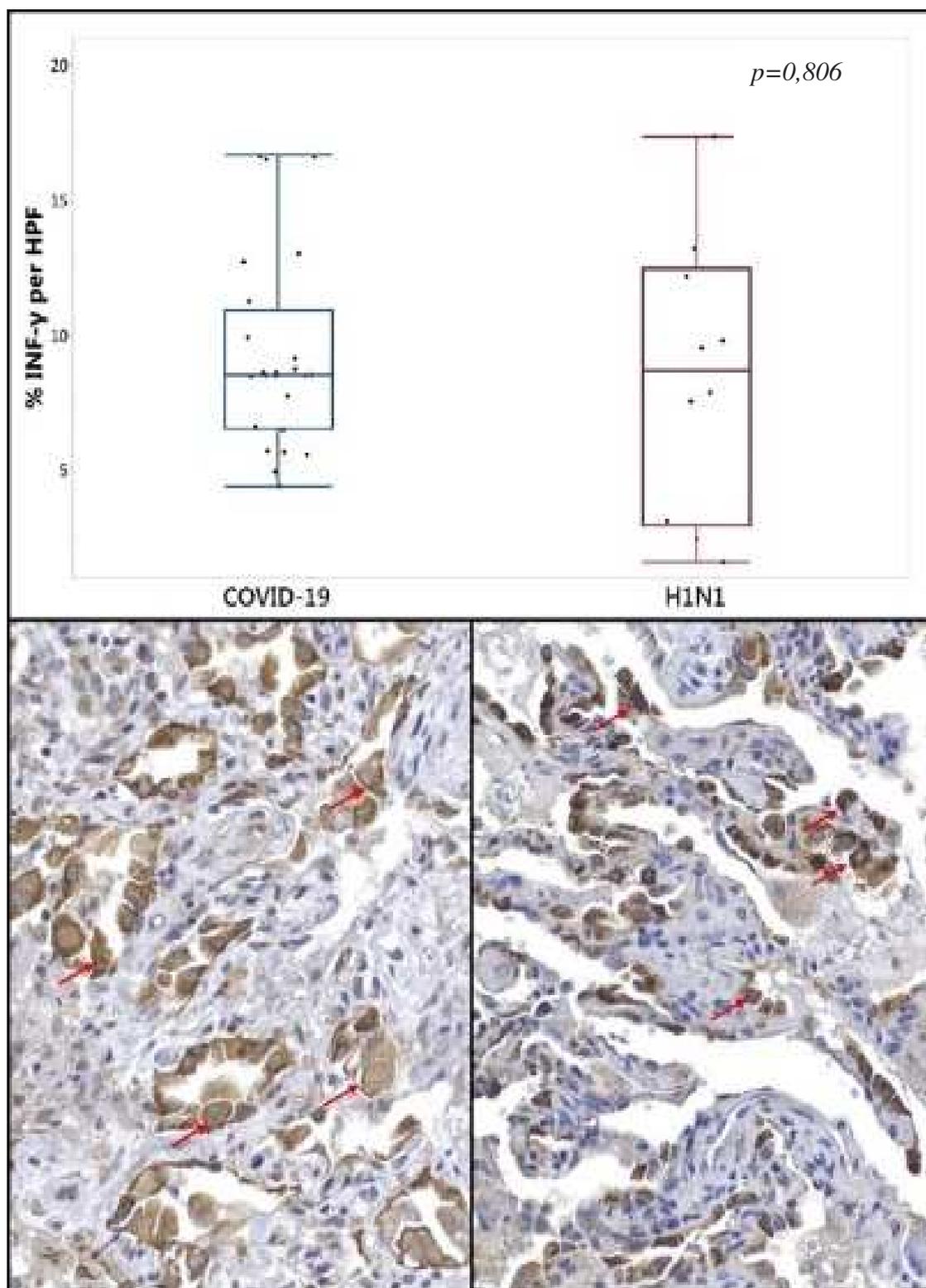


Figura 17: Área marcada por INF- γ por campo de grande aumento.

Fonte: Autor 2022

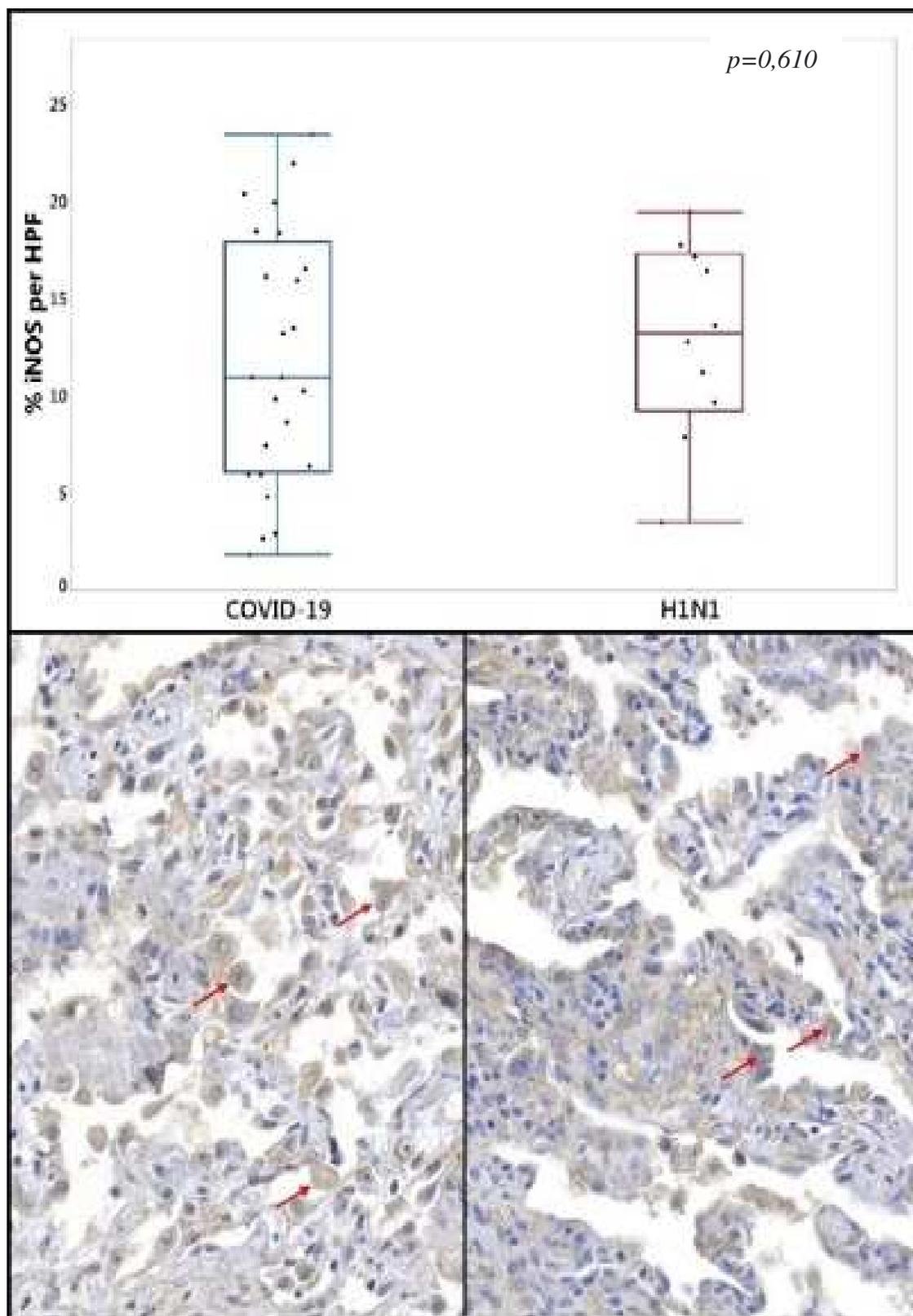


Figura 18: Area marcada por iNOS por campo de grande aumento.

Fonte: Autor 2022

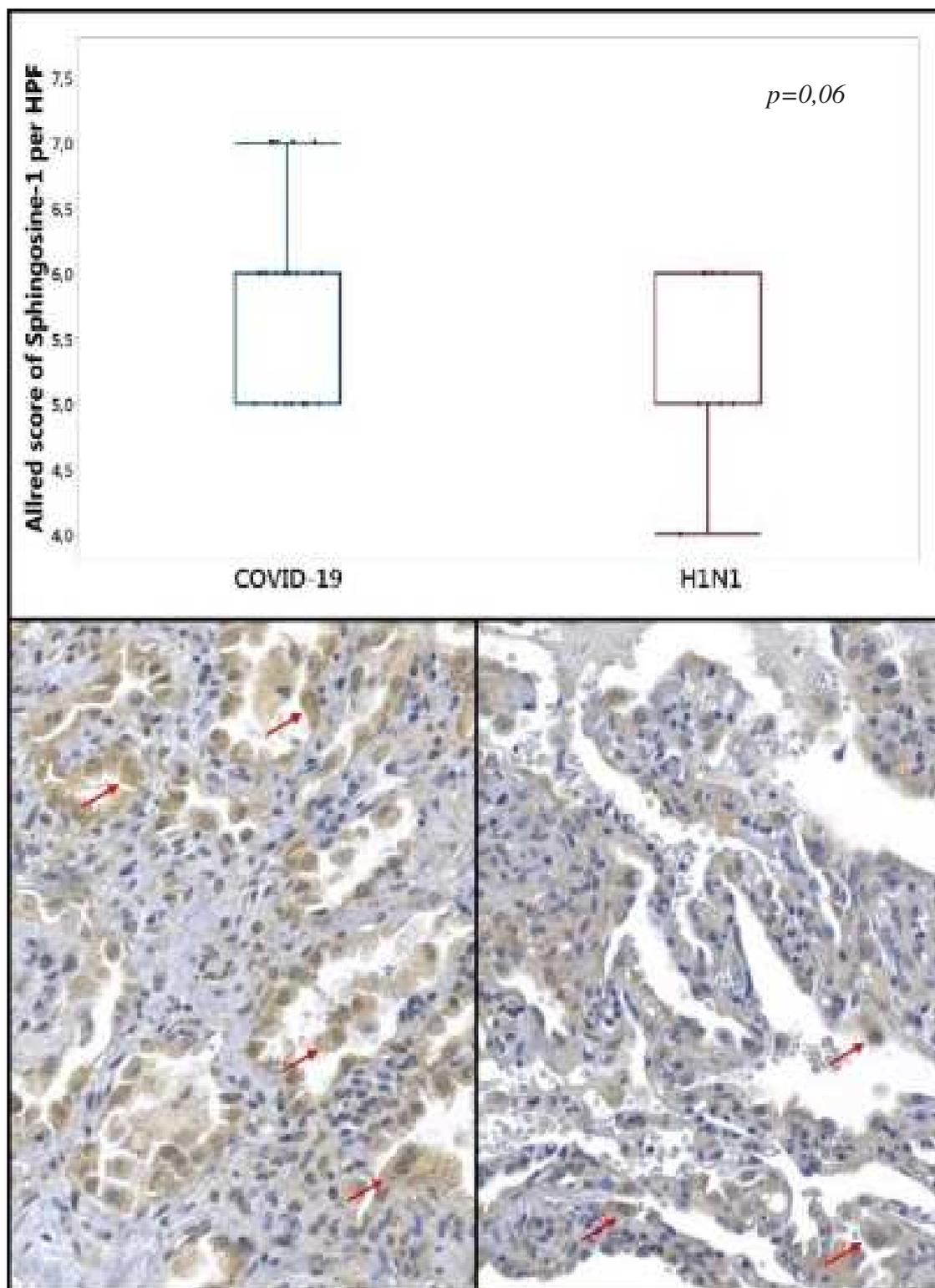


Figura 19: Allred score para marcador Esfingosina -1 por campo de grande aumento. Fonte: Autor 2022

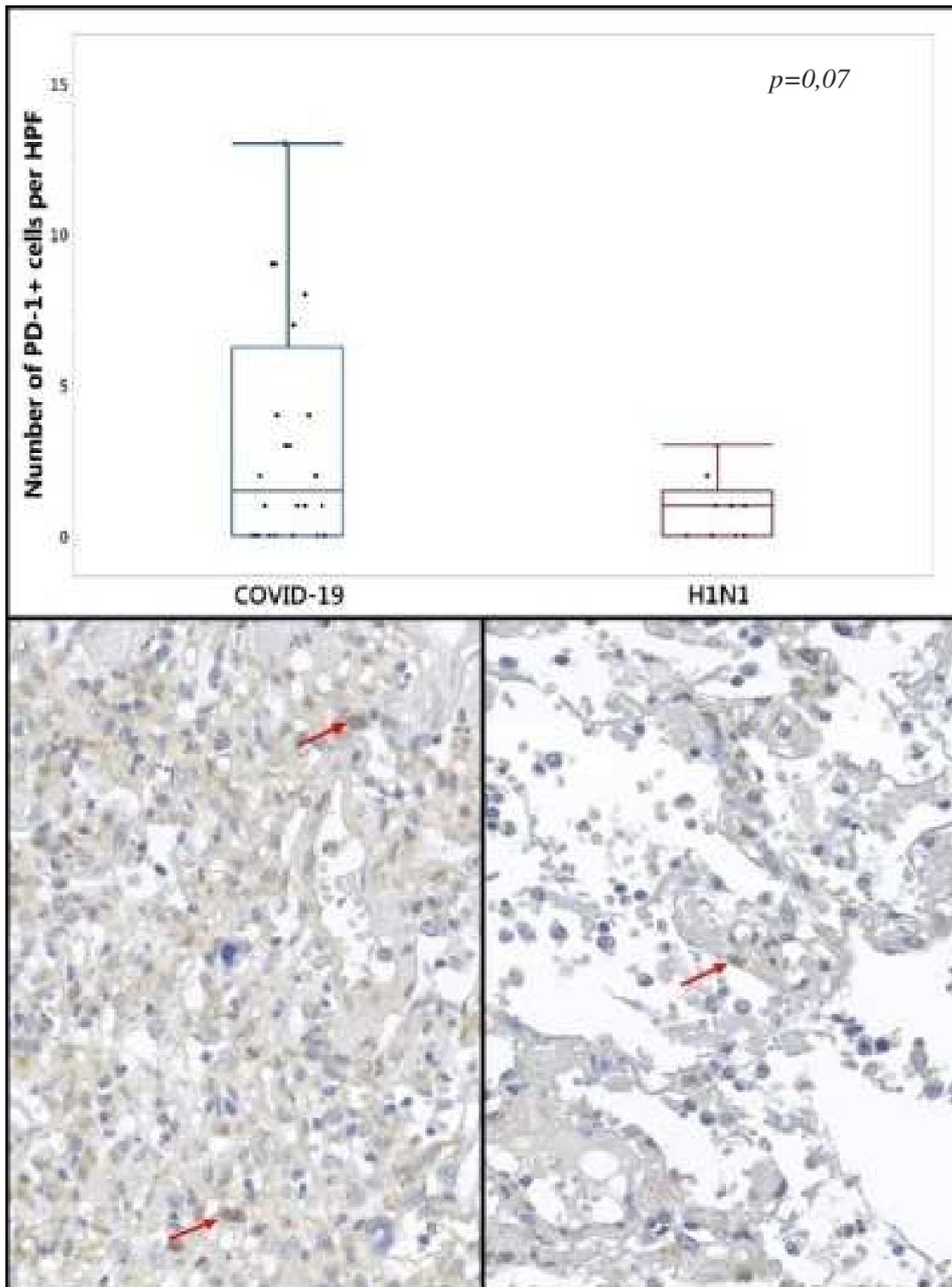


Figura 20: Número de células marcadas por PD-1 por campo de grande aumento. Fonte: Autor 2022

8 DISCUSSÃO

8.1 ACHADOS DEMOGRÁFICOS E HISTOLÓGICOS

Os achados demográficos referentes aos grupos COVID-19 e H1N1 corroboram aos encontrados na literatura (51), considerando que o grupo COVID-19 foi composto principalmente por pacientes mais velhos (média de 71,96). Vale ressaltar que as amostras que compõem este estudo foram obtidas em março e agosto de 2020, quando as mortes por COVID-19 afetaram principalmente idosos. Esses pacientes também apresentavam comorbidades relevantes e permaneciam internados por longos períodos e em ventilação mecânica. Por outro lado, a idade dos pacientes do grupo H1N1 (média de 43,5), o tempo de internação e a exposição à ventilação mecânica foram menores, conforme descrito na literatura (52). Tabela 2.

Dano Alveolar Difuso (DAD) com membrana hialina interalveolar foi observado em ambos os grupos na avaliação dos aspectos histopatológicos. Estudos que descreveram os padrões histopatológicos de lesão pulmonar em pacientes acometidos por COVID-19 e H1N1pdm09 relatam a existência de DAD (53). Além disso, os pacientes do grupo COVID-19 também apresentaram fibrose terminal, microtrombos e hiperplasia de pneumócitos tipo II. Estudos indicam que a fibrose pulmonar terminal está comumente associada à desfechos fatais da COVID-19, referindo-se a ela como um aspecto histopatológico patognomônico do processo de reparo na SDRA (54).

Em relação à microtrombose observada no grupo COVID-19, evidências sugerem que o envolvimento da piroptose na ativação/disfunção endotelial induzida pela infecção por SARS-CoV-2 contribui para os eventos trombogênicos observados, ao contrário do H1N1pdm09 (55). Diferentemente do grupo COVID-19, há recrutamento de infiltrado neutrofílico septal nos casos do grupo H1N1. A infecção por influenza aumenta a suscetibilidade do hospedeiro às bactérias, principalmente devido à falha na resposta imune antibacteriana e à sinergia de patógenos (56).

8.2 RESPOSTA CELULAR

O SARS-CoV-2, assim como outros vírus que infectam os humanos, possui mecanismos de evasão do sistema imunológico (6). Estudos demonstraram que esse vírus atrasa efetivamente o processo de disparo das respostas do sistema imunológico inato (6,57).

Devido à infecção do hospedeiro, as células associadas ao sistema imune inato reconhecem o padrão molecular viral, os PAMPs. Fagócitos, como macrófagos e células epiteliais, expressam PRRs e se ligam a PAMPs, ativando vias de transdução de sinal que promovem funções anti-inflamatórias, entre outras funções (5).

Avaliando a imunexpressão de CD68 no presente estudo, observa-se que este imunomarcador de macrófagos estava significativamente aumentado no grupo COVID-19 ($p=0,013$). A depleção de macrófagos alveolares residentes e um aumento concomitante de macrófagos inflamatórios derivados de monócitos foram previamente demonstrados em pacientes acometidos por COVID-19 (58).

Os fagócitos mononucleares estimulam a expressão de interferons tipo I, entre outras citocinas pró-inflamatórias, sendo o INF- α o mais importante na defesa viral (5). Quando infectadas por agentes virais, outras linhagens celulares também secretam INF- α para sinalizar células adjacentes, cuja função é produzir proteínas virais que realizam o reconhecimento e degradação de material genético exógeno (59). Não foi observada diferença estatística na imunexpressão tecidual do INF- α entre os dois grupos neste estudo.

Sabe-se que os interferons do tipo I aumentam a citotoxicidade de células NK e CTLs CD8+ e promovem a diferenciação de células T imaturas em subgrupos de células T auxiliares TH1. No presente estudo, foi observada uma diminuição no número de células NK (CD57) no grupo COVID-19. Witrowski et al. (60) evidenciaram altos níveis séricos de fator de crescimento transformador β (TGF- β) em pacientes críticos com COVID-19, que atingiram picos durante as duas primeiras semanas de infecção. Essa produção prematura de TGF- β pode inibir a função das células NK e o controle viral. Além disso, o tempo médio de sobrevida dos pacientes do grupo H1N1 no presente estudo foi de 4,7 dias. Em comparação, o tempo médio de sobrevida do grupo COVID-19 foi de 15,87 dias, o que significa que os pacientes do grupo H1N1 apresentavam-se na fase aguda da doença no momento do óbito.

Ao avaliar a imunexpressão de CD3, não foi observada diferença significativa entre os grupos COVID-19 e H1N1. No entanto, a avaliação da imunexpressão de CD4 observou uma diferença significativamente aumentada no grupo COVID-19. Há evidências de que os CTLs CD4+ se infiltram/expandem no parênquima pulmonar de pacientes com COVID-19 criticamente enfermos, e essa infiltração/expansão é mais proeminente na fase de resolução da doença. O aumento da inflamação que acompanha esses aumentos na infiltração/expansão dos CTLs CD4+ tardios pode contribuir positivamente para o clearance viral. No entanto, em alguns contextos da doença, pode contribuir negativamente, possivelmente por fornecer um gatilho imunológico para o desenvolvimento de fibrose (61). Esse dado também corrobora

com o estudo, pois, nos critérios histopatológicos, foi identificada fibrose terminal em pacientes com COVID-19.

Nos vírus, as células T CD4+ geralmente se diferenciam no subtipo Th1, que possui atividade antiviral através da produção de INF- γ , sendo, portanto, capaz de recrutar macrófagos do fenótipo M1 (6). Esses macrófagos, quando ativados pelo INF- γ , produzem espécies reativas de nitrogênio, principalmente óxido nítrico (NO), por meio da ação da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), que tem papel relevante na destruição de microrganismos (15). Em relação à imunexpressão tecidual de INF- γ e iNOS, não foi observada diferença estatisticamente significativa na comparação dos grupos. No entanto, avaliando a imunexpressão de CCR4, IL-4, Esfingosina-1 e Arginase, deduz-se que o grupo COVID-19 teve a via Th2 ativada. Este grupo apresentou valores significativamente aumentados de IL-4 e Arginase-1 (Tabela 3), além da tendência de aumento do valor da Esfingosina-1. Além disso, esse achado corrobora com a literatura, uma vez que as funções das células Th2 são mediadas principalmente pela IL-4, cuja associação é compatível com piores prognósticos (62). Citocinas que estimulam a via Th2 interferem na resposta Th1 ao suprimir a ativação de macrófagos com fenótipo M1 estimulam a produção de TGF- β , que é ineficiente na depuração viral (51). A Esfingosina-1 contribui para respostas fibróticas dependentes de macrófagos, moldando a ativação destas células, particularmente pela liberação de citocinas/quimiocinas pró-fibróticas, como TGF- β , IL-13 ou CCL2 (75).

As células T CD4+ efetoras respondem aos antígenos produzindo citocinas com funções de recrutamento e ativação de leucócitos e linfócitos B. Além de visar a produção de anticorpos neutralizantes específicos, os linfócitos B desempenham um papel essencial nas APCs, uma vez que expressam MCH classe II (15). Embora a imunquantificação de linfócitos B (CD20) não tenha apresentado resultado estatisticamente significativo, sua forma diferenciada, plasmócitos (CD138), apresentou resultado estatisticamente aumentado no grupo COVID-19 em relação ao H1N1 (Tabela 3). Deve-se levar em consideração que, embora a quantificação de linfócitos B diferenciados seja alta, o vírus, após infectar uma célula, torna-se inacessível ao anticorpo, e sua erradicação exigirá linfócitos T CD8+ (CTLs) para matar as células infectadas e eliminar o reservatório de infecção (53).

A resposta celular ao SARS-CoV-2 é a mais importante para combate ao vírus, especialmente em relação às células T CD8+. Os CTLs CD8+ reconhecem peptídeos derivados de antígenos proteicos associados ao MHC de classe I e eventualmente matam células infectadas por vírus através da produção de moléculas de Perforinas e granzimas (63). Em relação à avaliação de linfócitos CD8+ e quantificação de Perforina, a imunexpressão

tecidual de CD8+ está estatisticamente reduzida no grupo COVID-19, embora a Perforina esteja estatisticamente aumentada neste grupo. Além disso, nota-se uma tendência estatística de PD-1 no grupo COVID-19 (Tabela 3). Alguns pontos principais devem ser relatados e discutidos. Primeiro, como mencionado anteriormente, a idade média dos pacientes do grupo COVID-19 é de 71,96 anos, o que explicaria a baixa imunoquantificação celular de CD8+. A idade avançada é uma condição comum em relação à gravidade das doenças virais respiratórias, e essa gravidade pode estar associada a respostas alteradas das células T. A senescência celular também pode estar associada à idade, contribuindo para respostas ineficazes a uma infecção viral (4). Como as células T se replicam inúmeras vezes em detrimento da estimulação do patógeno durante toda a vida do hospedeiro, elas podem perder a capacidade de proliferar e atingir o estágio de senescência replicativa, de acordo com a perda da atividade da telomerase (64).

Associada à senescência, a exaustão celular também deve ser considerada. Embora não tenha sido observada significância estatística do PD-1, esse marcador apresentou uma tendência estatística para o grupo COVID-19. Enquanto as células T efetoras funcionais expressam transitoriamente receptores inibitórios, a estimulação persistente do patógeno pode induzir a redução e exaustão da função das células T durante a infecção crônica (65). As células T CD8+ esgotadas mostram alterações funcionais e fenotípicas, incluindo aumento da expressão de receptores inibitórios, como PD-1 (53,66). Recentemente foi relatado que pacientes criticamente doentes com COVID-19 apresentaram um estado que passou de hiperativação para exaustão de células T CD8+, com altas expressões de PD-1 (4). Além disso, o TGF- β também pode estar associado à exaustão das células T. O TGF- β parece promover disfunção ou exaustão das células T durante a infecção viral crônica (67). Os achados do presente trabalho predizem que a via TH2 é ativada no grupo COVID-19; como resultado dessa ativação, ocorre a secreção de TGF- β , com o intuito de promover a remodelação tecidual. No entanto são necessários mais estudos para determinar a associação de exaustão celular e expressão elevada de TGF- β no COVID-19.

Se por um lado as células T CD8+ estão senescentes, esgotadas ou ambas, por outro lado, neste estudo, elas parecem estar hiperativadas. A quantificação de Perforina no grupo COVID-19 foi significativamente aumentada em comparação com o grupo H1N1. A apoptose induzida por Perforina (e granzima) é a principal via para os linfócitos citotóxicos (incluindo células NK) erradicarem células hospedeiras infectadas por vírus (68). A Perforina é uma proteína que forma poros na membrana das células-alvo, permitindo a entrada de moléculas efetoras e posterior morte celular (69). Sugere-se que essa proteína, embora

presente, seja disfuncional, o que significa que o estado não funcional pode estar associado ao polimorfismo. O polimorfismo A91V foi testado em um estudo de vinte e dois pacientes previamente saudáveis, internados em uma unidade de terapia intensiva, com COVID-19. Dois dos pacientes, que apresentavam esse polimorfismo, faleceram. No entanto, há necessidade de mais estudos para atestar a associação dessa mutação com a alteração funcional da Perforina (70). Zanchettin e col. investigaram a função citolítica das células responsáveis pela primeira linha da resposta imune viral, através de um estudo imunistoquímico e genético, e verificaram que alguns polimorfismos poderiam produzir proteínas disfuncionais, levando a uma diminuição do processo de apoptose e, conseqüentemente maior expressão de perforina como mecanismo de compensação (72).

Evidências científicas sugerem que o SARS-CoV-2 pode desencadear uma resposta imunológica deficiente, especialmente em pacientes com idade avançada. O presente estudo enfatiza que a infecção por SARS-CoV-2 pode comprometer a resposta celular e uma baixa depuração viral devido a um estado de senescência, exaustão celular ou ambos. A resposta adaptativa tende ao reparo tecidual.

9 CONCLUSÃO

- O presente estudo enfatiza que a infecção por SARS-CoV-2 pode comprometer a resposta celular, levando a uma baixa depuração viral, devido a um estado de senescência, exaustão celular ou ambos, e que a resposta adaptativa tende ao processo de reparo tecidual, com desvio para via Th2.
- Comprometimento da resposta celular realizada pelos linfócitos TCD8.

10 LIMITAÇÕES

Este estudo é uma análise retrospectiva, em que amostras foram obtidas de biópsias *post mortem* de pacientes graves acometidos pela COVID-19; assim, as informações deste coorte não podem reconstruir os eventos na evolução cronológica da doença em relação aos dados prévios relativos aos aspectos clínicos ou fisiopatológicos.

11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A infecção causada pelo SARS-CoV-2 impactou em alta morbidade e mortalidade na população mundial. Evoluímos com muitos conhecimentos acerca do quadro clínico, porém pouco sabemos sobre a resposta imunológica nos diversos estágios da doença.

Apesar das limitações do nosso estudo pudemos ter uma ideia do comportamento da resposta celular pulmonar nos indivíduos que faleceram pela COVID-19, entendendo um pouco mais sobre a resposta imunológica neste estágio da doença. Atualmente a compreensão da resposta imunológica é fundamental para tratamentos clínicos eficazes



Association Between COVID-19 Pregnant Women Symptoms Severity and Placental Morphologic Features

Patricia Zadorosnei Rebutini^{1*}, Aline Cristina Zanchettin², Emanuele Therezinha Schueda Stonoga³, Daniele Margarita Marani Prá¹, André Luiz Parmegiani de Oliveira¹, Felipe da Silva Dezidério¹, Aline Simoneti Fonseca², Júlio César Honório Dagostini³, Elisa Carolina Hlatchuk³, Isabella Naomi Furuie⁴, Jessica da Silva Longo⁵, Bárbara Maria Cavalli⁵, Carolina Lumi Tanaka Dino⁵, Viviane Maria de Carvalho Hessel Dias¹, Ana Paula Percicote³, Meri Bordignon Nogueira^{5,6}, Sonia Mara Raboni⁷, Newton Sergio de Carvalho⁵, Cleber Machado-Souza^{2*} and Lucia de Noronha¹

OPEN ACCESS

Edited by:

Abhay P.S. Rathore,
Duke University, United States

Reviewed by:

David Alan Schwartz,
Augusta University, United States
Jeffery A. Goldstein,
Northwestern Medicine, United States

*Correspondence:

Cleber Machado-Souza
Cleberus@gmail.com
Patricia Zadorosnei Rebutini
rebutini@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Viral Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 26 March 2021

Accepted: 05 May 2021

Published: 26 May 2021

Citation:

Rebutini PZ, Zanchettin AC,
Stonoga ETS, Prá DMM,
de Oliveira ALP, Dezidério FdS,
Fonseca AS, Dagostini JCH,
Hlatchuk EC, Furuie IN, Longo JdS,
Cavalli BM, Dino CLT, Dias VMdCH,
Percicote AP, Nogueira MB,
Raboni SM, de Carvalho NS,
Machado-Souza C and de Noronha L
(2021) Association Between
COVID-19 Pregnant Women
Symptoms Severity and Placental
Morphologic Features.
Front. Immunol. 12:685919.
doi: 10.3389/fimmu.2021.685919

¹ Postgraduate Program of Health Sciences, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR, Curitiba, Brazil, ² Postgraduate Program in Biotechnology Applied in Health of Children and Adolescent, Pelé Pequeno Príncipe, Research Institute, Faculdades Pequeno Príncipe, Curitiba, Brazil, ³ Department of Medical Pathology, Clinical Hospital, Universidade Federal do Paraná-UFPR, Curitiba, Brazil, ⁴ Department of Tocogynecology, Clinical Hospital, Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, Brazil, ⁵ Postgraduate Program of Tocogynecology and Women's Health, Clinical Hospital, Universidade Federal do Paraná-UFPR, Curitiba, Brazil, ⁶ Virology Laboratory, Clinical Hospital, Universidade Federal do Paraná-UFPR, Curitiba, Brazil, ⁷ Department of Infectious Disease, Clinical Hospital, Universidade Federal do Paraná-UFPR, Curitiba, Brazil

Since the beginning of the pandemic, few papers describe the placenta's morphological and morphometrical features in SARS-CoV-2-positive pregnant women. Alterations, such as low placental weight, accelerated villous maturation, decidual vasculopathy, infarcts, thrombosis of fetal placental vessels, and chronic histiocytic intervillitis (CHI), have been described.

Objective: To analyze clinical data and the placental morphological and morphometric changes of pregnant women infected with SARS-CoV-2 (COVID-19 group) in comparison with the placentas of non-infected pregnant women, matched for maternal age and comorbidities, besides gestational age of delivery (Control group).

Method: The patients in the COVID-19 and the Control group were matched for maternal age, gestational age, and comorbidities. The morphological analysis of placentas was performed using Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement. The quantitative morphometric evaluation included perimeter diameter and number of tertiary villi, number of sprouts and knots, evaluation of deposition of villous fibrin, and deposition of intra-villous collagen I and III by Sirius Red. Additionally, Hofbauer cells (HC) were counted within villi by immunohistochemistry with CD68 marker.

Results: Compared to controls, symptomatic women in the COVID-19 group were more likely to have at least one comorbidity, to evolve to preterm labor and infant death, and to have positive SARS-CoV-2 RNA testing in their concepts. Compared to controls, placentas in the COVID-19 group were more likely to show features of maternal and

Article

Role of Genetic Polymorphism Present in Macrophage Activation Syndrome Pathway in Post Mortem Biopsies of Patients with COVID-19

Aline Cristina Zanchettin ^{1,2}, Leonardo Vinicius Barbosa ^{1,2}, Anderson Azevedo Dutra ³, Daniele Margarita Marani Prá ³, Marcos Roberto Curcio Pereira ³, Rebecca Benicio Stocco ³, Ana Paula Camargo Martins ³, Caroline Busatta Vaz de Paula ³, Seigo Nagashima ³, Lucia de Noronha ³ and Cleber Machado-Souza ^{1,2,*}

¹ Faculdades Pequeno Príncipe, Av. Iguaçu, 333, Curitiba 80230-020, Paraná, Brazil; aline.zanchettin78@gmail.com (A.C.Z.); leovinius@live.com (L.V.B.)

² Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Av. Silva Jardim, 1632, Curitiba 80250-200, Paraná, Brazil

³ Pontifícia Universidade Católica do Paraná, R. Imaculada Conceição, 1155, Curitiba 80215-901, Paraná, Brazil; andersonazevedodutra@yahoo.com.br (A.A.D.); danimargarita@yahoo.com.br (D.M.M.P.); marcos.curcio@pucpr.edu.br (M.R.C.P.); rebecca.stocco@pucpr.edu.br (R.B.S.); anapaulacamargo@hotmail.com (A.P.C.M.); carolbvaz@gmail.com (C.B.V.d.P.); seigo_nagashima@hotmail.com (S.N.); lnno.noronha@gmail.com (L.d.N.)

* Correspondence: cleber.souza@pelepequenoprincipe.org.br

Citation: Zanchettin, A.C.; Barbosa, L.V.; Dutra, A.A.; Prá, D.M.M.; Pereira, M.R.C.; Stocco, R.B.; Martins, A.P.C.; Paula, V.d.; Nagashima, S.; de Noronha, L.; et al. Role of Genetic Polymorphism Present in Macrophage Activation Syndrome Pathway in Post Mortem Biopsies of Patients with COVID-19. *Viruses* **2022**, *14*, 1699. <https://doi.org/10.3390/v14081699>

Academic Editor: Benjamin M. Liu

Received: 8 June 2022

Accepted: 28 July 2022

Published: 31 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: COVID-19 is a viral disease associated with an intense inflammatory response. Macrophage Activation Syndrome (MAS), the complication present in secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis (sHLH), shares many clinical aspects observed in COVID-19 patients, and investigating the cytolytic function of the responsible cells for the first line of the immune response is important. Formalin-fixed paraffin-embedded lung tissue samples obtained by post mortem necropsy were accessed for three groups (COVID-19, H1N1, and CONTROL). Polymorphisms in MAS cytolytic pathway (*PRF1*; *STX11*; *STXBP2*; *UNC13D* and *GZMB*) were selected and genotyping by TaqMan[®] assays (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) using Real-Time PCR (Applied Biosystems, MA, USA). Moreover, immunohistochemistry staining was performed with a monoclonal antibody against perforin, CD8+ and CD57+ proteins. Histopathological analysis showed high perforin tissue expression in the COVID-19 group; CD8+ was high in the H1N1 group and CD57+ in the CONTROL group. An association could be observed in two genes related to the cytolytic pathway (*PRF1* rs885822 G/A and *STXBP2* rs2303115 G/A). Furthermore, *PRF1* rs350947132 was associated with increased immune tissue expression for perforin in the COVID-19 group. The genotype approach could help identify patients that are more susceptible, and for this reason, our results showed that perforin and SNPs in the *PRF1* gene can be involved in this critical pathway in the context of COVID-19.

Keywords: SARS-CoV-2; secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis; macrophage; immunohistochemistry; polymorphisms

1. Introduction

In 2020, a new type of infection, caused by the *Coronaviridae* family virus (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2—SARS-CoV-2), proved to be highly contagious and caused many hospitalizations and deaths, especially in people with comorbidities and older age. Host-related risk factors have been identified as associated with developing the severe form of COVID-19 (Coronavirus Disease 19) [1].



Article

IMMUNE RESPONSE GAPS LINKED TO SARS-COV-2 INFECTION: CELLULAR EXHAUSTION, SENEESCENCE, OR BOTH?

Leonardo Vinicius Barbosa^{1**}, Daniele Margarita Marani Prá^{2**}, Seigo Nagashima², Marcos Roberto Curcio Pereira², Rebecca Benicio Stocco³, Francys de Luca Fernandes da Silva³, Milena Rueda Cruz³, Djessyka Dallagrassa³, Thiago João Stupak³, George Willian Xavier da Rosa³, Georgia Garofani Nasimoto³, Luiz Augusto Fanhani Cracco⁴, Isabela Busto Silva⁴, Karen Fernandes de Moura², Marina de Castro Deus², Ana Paula Camargo Martins³, Beatriz Akemi Kondo Van Spitzenbergen², Andréa Novais Moreno Amaral², Caroline Busatta Vaz de Paula^{2*}, Cleber Machado-Souza^{1*}, Lucia de Noronha²

¹Postgraduate in Biotechnology Applied in Health of Children and Adolescent. Faculdades Pequeno Príncipe (FPP). Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (IPPPP). R. Silva Jardim, 1632 - Água Verde, Curitiba, PR, Brazil.

²Postgraduate Program of Health Sciences, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). R. Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho, Curitiba, PR, Brazil.

³Laboratory of Experimental Pathology - School of Medicine - Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). R. Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho, Curitiba, PR, Brazil.

⁴Hospital Marcelino Champagnat. Av. Presidente Afonso Camargo, 1399 - Cristo Rei, Curitiba, PR, Brazil.

*Correspondence:

Cleber Machado-Souza

Caroline Busatta Vaz de Paula

Laboratory of Experimental Pathology

Tel: +55 (41) 3271-2264

Rua Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho Curitiba, Paraná, Brazil.

E-mail: cleberius@gmail.com; carolbvaz@gmail.com

**these two authors also contributed to the first authorship

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The COVID-19 pandemic, promoted by the SARS-CoV-2 respiratory virus, has resulted in widespread global morbidity and mortality. The immune response against this pathogen has shown a thin line between protective effects and pathological reactions resulting from the massive release of cytokines and poor viral clearance. The latter is possibly caused by exhaustion, senescence, or both of TCD8+ cells and reduced activity of natural killer (NK) cells. The imbalance between innate and adaptive responses during the early stages of infection caused by SARS-CoV-2 contributes to ineffective control of viral spread. In this sense, the present study evaluated the tissue immunoppression of the immunohistochemical markers Arginase-1, CCR4, CD3, CD4, CD8, CD20, CD57, CD68, CD138, IL-4, INF- α , INF- γ , iNOS, PD-1, Perforin and Sphingosine-1, in order to understand, above all, the cellular immune response triggered in patients who died as a result of COVID-19. We evaluated twenty-four paraffin-embedded lung tissue samples from patients who died of COVID-19 (COVID-19 group) and compared them with ten lung tissue samples from patients who died of H1N1pdm09 (H1N1 group) with the immunohistochemical markers mentioned above. In addition, polymorphisms in the Perforin gene were genotyped through Real-Time PCR. Significantly increased tissue immunoppression of Arginase, CD4, CD68, CD138, Perforin, Sphingosine-1, and IL-4 markers were observed in the COVID-19 group. A significantly lower immunoppression of CD8 and CD57 was also found in this group. It is suggested that patients who died from COVID-19 had a poor cellular response concerning viral clearance and adaptive response going through tissue repair.

Keywords: SARS-CoV-2; inflammation; pathogenesis; cellular exhaustion; senescence; CD8; perforin.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GUSTINE JN, JONES D. IMMUNOPATHOLOGY OF HYPERINFLAMMATION IN COVID-19. AM J PATHOL [INTERNET]. 2021 JAN 1 [CITED 2022 APR 2];191(1):4–17. AVAILABLE FROM: [HTTP://AJP.AMJPATHOL.ORG/ARTICLE/S0002944020304090/FULLTEXT](http://ajp.amjpathol.org/article/S0002944020304090/fulltext)
2. VIASUS D, OTEO REVUELTA JA, MARTÍNEZ-MONTAUTI J, CARRATALÀ J. INFLUENZA A(H1N1) PDM09-RELATED PNEUMONIA AND OTHER COMPLICATIONS. ENFERM INFECC MICROBIOL CLIN [INTERNET]. 2012 OCT [CITED 2022 APR 2];30 SUPPL 4(SUPPL. 4):43–8. AVAILABLE FROM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/23116792/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23116792/)
3. RICHARDSON S, HIRSCH JS, NARASIMHAN M, CRAWFORD JM, MCGINN T, DAVIDSON KW, ET AL. PRESENTING CHARACTERISTICS, COMORBIDITIES, AND OUTCOMES AMONG 5700 PATIENTS HOSPITALIZED WITH COVID-19 IN THE NEW YORK CITY AREA. JAMA [INTERNET]. 2020 MAY 26 [CITED 2022 APR 2];323(20):2052–9. AVAILABLE FROM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/32320003/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32320003/)
4. CHEN Z, WHERRY E. T CELL RESPONSES IN PATIENTS WITH COVID-19. NAT REV IMMUNOL 2020 209 [INTERNET]. 2020 JUL 29 [CITED 2022 MAR 30];20(9):529–36. AVAILABLE FROM: [HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/S41577-020-0402-6](https://www.nature.com/articles/s41577-020-0402-6)SCHMIDT ME, VARGA SM. THE CD8 T CELL RESPONSE TO RESPIRATORY VIRUS INFECTIONS. FRONT IMMUNOL. 2018 APR 9;9(APR):678.
5. ABBAS, ABUL K.; LICHTMAN, ANDREW H.; PILLAI, SHIV. IMUNOLOGIA: CELULAR E MOLECULAR. 8. ED. RIO DE JANEIRO: ELSEVIER EDITORA LTDA., 2015. 536 P.
6. SETTE A, CROTTY S. ADAPTIVE IMMUNITY TO SARS-CoV-2 AND COVID-19. CELL [INTERNET]. 2021 FEB 18 [CITED 2022 APR 2];184(4):861. AVAILABLE FROM: </PMC/ARTICLES/PMC7803150/>
7. HU B, HUANG S, YIN L. THE CYTOKINE STORM AND COVID-19. J MED VIROL [INTERNET]. 2020; 2:0–2. AVAILABLE FROM: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1002/JMV.26232](http://dx.doi.org/10.1002/jmv.26232)
8. ACHARYA D, LIU GQ, GACK MU. DYSREGULATION OF TYPE I INTERFERON RESPONSES IN COVID-19. NAT REV IMMUNOL 2020 207 [INTERNET]. 2020 MAY 26 [CITED 2022 APR 3];20(7):397–8. AVAILABLE FROM: [HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/S41577-020-0346-X](https://www.nature.com/articles/s41577-020-0346-x)
9. VARCHETTA S, MELE D, OLIVIERO B, MANTOVANI S, LUDOVISI S, CERINO A, ET AL. UNIQUE IMMUNOLOGICAL PROFILE IN PATIENTS WITH COVID-19. CELL MOL IMMUNOL 2020 183 [INTERNET]. 2020 OCT 15 [CITED 2022 APR 16];18(3):604–12. AVAILABLE FROM: [HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/S41423-020-00557-9](https://www.nature.com/articles/s41423-020-00557-9)
10. MIYAMOTO T. [INTERFERON AND BONE]. CLIN CALCIUM [INTERNET]. 2015 NOV 1 [CITED 2022 APR 16];25(11):1653–8. AVAILABLE FROM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/26503870/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26503870/)
11. KNOLL R, SCHULTZE JL, SCHULTE-SCHREPPING J. MONOCYTES AND MACROPHAGES IN COVID-19. FRONT IMMUNOL. 2021 JUL 21; 12:2952.
12. VAZ DE PAULA CB, DE AZEVEDO MLV, NAGASHIMA S, MARTINS APC, MALAQUIAS, MAS, MIGGIOLARO AFR DOS S, ET AL. IL-4/IL-13 REMODELING PATHWAY OF COVID-19 LUNG INJURY. SCI REP [INTERNET]. 2020;10(1):4–11. AVAILABLE FROM: [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/S41598-020-75659-5](https://doi.org/10.1038/s41598-020-75659-5)
13. LEE JW, CHUN W, LEE HJ, MIN JH, KIM SM, SEO JY, ET AL. THE ROLE OF MACROPHAGES

IN THE DEVELOPMENT OF ACUTE AND CHRONIC INFLAMMATORY LUNG DISEASES. CELLS [INTERNET]. 2021 APR 1 [CITED 2022 APR 16];10(4). AVAILABLE FROM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/33919784/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33919784/)

14. LI M, GUO W, DONG Y, WANG X, DAI D, LIU X, ET AL. ELEVATED EXHAUSTION LEVELS OF NK AND CD8+ T CELLS AS INDICATORS FOR PROGRESSION AND PROGNOSIS OF COVID-19 DISEASE. FRONT IMMUNOL. 2020 OCT 14;11: 2681.
15. WESTMEIER J, PANISKAKI K, KARAKÖSE Z, WERNER T, SUTTER K, DOLFF S, ET AL. IMPAIRED CYTOTOXIC CD8+ T CELL RESPONSE IN ELDERLY COVID-19 PATIENTS. MBIO [INTERNET]. 2020 SEP 1 [CITED 2022 MAR 30];11(5):1–13. AVAILABLE FROM: [HTTPS://JOURNALS.ASM.ORG/DOI/FULL/10.1128/MBIO.02243-20](https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mbio.02243-20)
16. VOS, THEO; LIM, STEPHEN S; ABBAFATI, CRISTIANA; ABBAS, KAJA M; ABBASI, MOHAMMAD; ABBASIFARD, MITRA; ABBASI-KANGEVARI, MOHSEN; ABBASTABAR, HEDAYAT; ABD-ALLAH, FOAD; ABDELALIM, AHMED. GLOBAL BURDEN OF 369 DISEASES AND INJURIES IN 204 COUNTRIES AND TERRITORIES, 1990–2019: A SYSTEMATIC ANALYSIS FOR THE GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY 2019. THE LANCET, [S.L.], v. 396, n. 10258, p. 1204-1222, OUT. 2020. ELSEVIER BV. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30925-9).
17. RUUSKANEN, OLLI ET AL. VIRAL PNEUMONIA. THE LANCET, LONDON, ENGLAND, ANO 2011, v. 377, p. 1264-1275, 22 MAR. 2011. DOI [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0140-6736\(10\)61459-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61459-6). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/21435708/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21435708/). ACESSO EM: 28 JUN. 2020.
18. WORLD HEALTH ORGANIZATION. A MANUAL FOR ESTIMATING DISEASE BURDEN ASSOCIATED WITH SEASONAL INFLUENZA. GLOBAL INFLUENZA PROGRAMME OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. GENEVA-DISPONÍVEL EM: [HTTP://WWW.WHO.INT/INFLUENZA/RESOURCES/PUBLICATIONS/MANUAL_BURDEN_OF_DISEASE/EN/](http://www.who.int/influenza/resources/publications/manual_burden_of_disease/en/); 2015. ACESSO EM: 10 MAIO 2022.
19. NEUMANN, GABRIELE; NODA, TAKESHI; KAWAOKA, YOSHIHIRO. EMERGENCE AND PANDEMIC POTENTIAL OF SWINE-ORIGIN H1N1 INFLUENZA VIRUS. NATURE, [S.L.], v. 459, n. 7249, p. 931-939, JUN. 2009. SPRINGER SCIENCE AND BUSINESS MEDIA LLC. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1038/NATURE08157](http://dx.doi.org/10.1038/nature08157). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/NATURE08157](https://www.nature.com/articles/nature08157). ACESSO EM: 10 MAIO 2022.
20. DOMÍNGUEZ-CHERIT, GUILLERMO. CRITICALLY ILL PATIENTS WITH 2009 INFLUENZA A(H1N1) IN MEXICO. JAMA, [S.L.], v. 302, n. 17, p. 1880, 4 NOV. 2009. AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION (AMA). [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1001/JAMA.2009.1536](http://dx.doi.org/10.1001/jama.2009.1536). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://JAMANETWORK.COM/JOURNALS/JAMA/FULLARTICLE/184798](https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/184798). ACESSO EM: 10 MAIO 2022.
21. TAN, WENJIE ET AL. A NOVEL CORONAVIRUS GENOME IDENTIFIED IN A CLUSTER OF PNEUMONIA CASES — WUHAN, CHINA 2019–2020. CHINA CDC WEEKLY. [ONLINE], p. 61-62. DEZ. 2020. DISPONÍVEL EM: [HTTP://WEEKLY.CHINACDC.CN/EN/ARTICLE/ID/A3907201-F64F-4154-A19E-4253B453D10C?VIEWTYPE=HTML](http://weekly.chinacdc.cn/en/article/id/A3907201-F64F-4154-A19E-4253B453D10C?viewType=HTML). ACESSO EM: 01 MAIO 2021.
22. [HTTPS://COVID19.WHO.INT/](https://covid19.who.int/) ORGANIZATION, WORLD HEALTH. WHO CORONAVIRUS (COVID-19) DASHBOARD. 2021. DISPONÍVEL EM: [HTTPS://COVID19.WHO.INT/](https://covid19.who.int/). ACESSO EM: 30 MAIO 2021.

23. WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. LABORATORY TESTING FOR 2019 NOVEL CORONAVIRUS (2019-nCoV) IN SUSPECTED HUMAN CASES. 2020. DISPONÍVEL EM: [HTTPS://WWW.WHO.INT/PUBLICATIONS/I/ITEM/10665-331501](https://www.who.int/publications/i/item/10665-331501). ACESSO EM: 29 JUN. 2020.
24. REN, L. ET AL. IDENTIFICATION OF A NOVEL CORONAVIRUS CAUSING SEVERE PNEUMONIA IN HUMAN: A DESCRIPTIVE STUDY. CHINESE MEDICAL JOURNAL, [ONLINE], v. 133, n. 9, p. 1015-1024, MAIO 2020. DISPONÍVEL EM: [HTTPS://JOURNALS.LWW.COM/CMJ/FULLTEXT/2020/05050/IDENTIFICATION_OF_A_NOVEL_CORONAVIRUS_CAUSING.3.ASPX](https://journals.lww.com/cmj/fulltext/2020/05050/identification_of_a_novel_coronavirus_causing.3.aspx). ACESSO EM: 02 JUN. 2020
25. GORBALENYA AE, BAKER SC, BARIC RS, ET AL. SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME-RELATED CORONAVIRUS: THE SPECIES AND ITS VIRUSES - A STATEMENT OF THE CORONAVIRUS STUDY GROUP. *BIORxIV* 2020; DISPONÍVEL EM: [HTTPS://DOI.ORG/10.1101/2020.02.07.937862](https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862). ACESSO EM: 10 JUN. 2020.
26. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. ESCRITÓRIO REGIONAL PARA AS AMÉRICAS DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. FOLHA INFORMATIVA SOBRE COVID-19: HISTÓRICO DA PANDEMIA DE COVID-19. HISTÓRICO DA PANDEMIA DE COVID-19. 2021. DISPONÍVEL EM: [HTTPS://WWW.PAHO.ORG/PT/COVID19/HISTORICO-DA-PANDEMIA-COVID-19](https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19). ACESSO EM: 20 AGO. 2021.
27. C. HUANG, Y. WANG, X. LI, L. REN, J. ZHAO, Y. HU, L. ZHANG, G. FAN, J. XU, X. GU, Z. CHENG, T. YU, J. XIA, Y. WEI, W. WU, X. XIE, W. YIN, H. LI, M. LIU, Y. XIAO, H. GAO, L. GUO, J. XIE, G. WANG, R. JIANG, Z. GAO, Q. JIN, J. WANG, B. CAO, CLINICAL FEATURES OF PATIENTS INFECTED WITH 2019 NOVEL CORONAVIRUS IN WUHAN, CHINA, *LANCET* 395 (2020) P.497–506 DISPONÍVEL EM: [HTTPS://WWW.THELANCET.COM/JOURNALS/LANCET/ARTICLE/PIIS0140-6736\(20\)30183-5/FULLTEXT](https://www.thelancet.com/journals/lanct/article/PIIS0140-6736(20)30183-5/fulltext) ACESSO EM: 10 JUN. 2021.
28. H. SHI, X. HAN, N. JIANG, Y. CAO, O. ALWALID, J. GU, Y. FAN, C. ZHENG, RADIOLOGICAL FINDINGS FROM 81 PATIENTS WITH COVID-19 PNEUMONIA IN WUHAN, CHINA: A DESCRIPTIVE STUDY, *LANCET INFECT DIS.* 20 (2020) P.425–434. 506 DISPONÍVEL EM: [HTTPS://WWW.THELANCET.COM/ARTICLE/S1473-3099\(20\)30086-4/FULLTEXT](https://www.thelancet.com/article/S1473-3099(20)30086-4/fulltext). ACESSO EM: 10 MAR. 2020
29. WU, ZUNYOU. CHARACTERISTICS OF AND IMPORTANT LESSONS FROM THE CORONAVIRUS DISEASE 2019 (COVID-19) OUTBREAK IN CHINA: SUMMARY OF A REPORT OF 72:314 CASES FROM THE CHINESE CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *JAMA*, [ONLINE], v. 13, n. 323, p. 1239-1242, JAN. 2020. DISPONÍVEL EM: [HTTPS://JAMANETWORK.COM/JOURNALS/JAMA/FULLARTICLE/2762130](https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2762130). ACESSO EM: 15 JUN. 2020.
30. LI, GENG ET AL. CORONAVIRUS INFECTIONS AND IMMUNE RESPONSES. *J MED VIROL*, [S. L], v. 4, n. 92, p. 424-432, FEV. 2020. DISPONÍVEL EM [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/31981224/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31981224/). ACESSO EM: 25 JUN. 2020.
31. CRUVINEL, WILSON DE MELO ET AL. SISTEMA IMUNITÁRIO: PARTE I. FUNDAMENTOS DA IMUNIDADE INATA COM ÊNFASE NOS MECANISMOS MOLECULARES E CELULARES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA. *REV. BRAS. REUMATOL.*, SÃO PAULO, v. 50, n. 4, p. 434-447, AUG. 2010. DISPONÍVEL EM: [HTTP://WWW.SCIELO.BR/SCIELO.PHP?SCRIPT=SCI_ARTTEXT&PID=S0482-50042010000400008&LNG=EN&NRM=ISO](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042010000400008&lng=en&nrm=iso)>. ACESSO EM: 28 JUN. 2020.

32. FUNG, TO SING; LIU, DING XIANG. HUMAN CORONAVIRUS: HOST-PATHOGEN INTERACTION. ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY, [S.L.], v. 73, n. 1, p. 529-557, 8 SET. 2019. ANNUAL REVIEWS. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1146/ANNUREV-MICRO-020518-115759](http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115759). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/31226023/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31226023/). ACESSO EM: 10 MAIO 2022.
33. CHADHA, KAILASH C. ET AL. INTERFERONS AND INTERFERON INHIBITORY ACTIVITY IN DISEASE AND THERAPY. EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE, [S. L.], v. 4, n. 229, p. 285-290, ABR. 2004. DISPONÍVEL EM: [HTTPS://JOURNALS.SAGEPUB.COM/DOI/10.1177/153537020422900402](https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/153537020422900402). ACESSO EM: 10 JUN. 2020.
34. KREIJTZ, J.H.C.M.; FOUCHIER, R.A.M.; RIMMELZWAAN, G.F. IMMUNE RESPONSES TO INFLUENZA VIRUS INFECTION. VIRUS RESEARCH, [S.L.], v. 162, n. 1-2, p. 19-30, DEZ. 2011. ELSEVIER BV. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.VIRUSRES.2011.09.022](http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.09.022). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/21963677/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21963677/). ACESSO EM: 10 MAIO 2022.
35. WIERSINGA WJ, RHODES A, CHENG AC, PEACOCK SJ, PRESCOTT HC. PATHOPHYSIOLOGY, TRANSMISSION, DIAGNOSIS, AND TREATMENT OF CORONAVIRUS DISEASE 2019 (COVID-19): A REVIEW. JAMA. 2020;324(8):782–793. doi:10.1001/jama.2020.12839. [HTTPS://JAMANETWORK.COM/JOURNALS/JAMA/FULLARTICLE/2768391](https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2768391) ACESSO EM 20 AGO 2021.
36. ZHENG, MEIJUAN ET AL. FUNCTIONAL EXHAUSTION OF ANTIVIRAL LYMPHOCYTES IN COVID-19 PATIENTS. CELL MOL IMMUNOL, [S. L.], v. 5, n. 17, p. 533-535, MAIO 2020. DISPONÍVEL EM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/32203188/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32203188/). ACESSO EM: 25 OUT. 2020.
37. SHARPE, ARLENE H; WHERRY, E JOHN; AHMED, RAFI; FREEMAN, GORDON J. THE FUNCTION OF PROGRAMMED CELL DEATH 1 AND ITS LIGANDS IN REGULATING AUTOIMMUNITY AND INFECTION. NATURE IMMUNOLOGY, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 239-245, 15 FEV. 2007. SPRINGER SCIENCE AND BUSINESS MEDIA LLC. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1038/NI1443](http://dx.doi.org/10.1038/ni1443). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/17304234/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17304234/). ACESSO EM: 10 MAIO 2022.
38. PARDOLL, DREW M. THE BLOCKADE OF IMMUNE CHECKPOINTS IN CANCER IMMUNOTHERAPY. NATURE REVIEWS CANCER, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 252-264, 22 MAR. 2012. SPRINGER SCIENCE AND BUSINESS MEDIA LLC. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1038/NRC3239](http://dx.doi.org/10.1038/nrc3239). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/NRC3239](https://www.nature.com/articles/nrc3239). ACESSO EM: 10 MAIO 2022.
39. SABBATINO, FRANCESCO; CONTI, VALERIA; FRANCI, GIANLUIGI; SELLITTO, CARMINE; MANZO, VALENTINA; PAGLIANO, PASQUALE; BELLIS, EMANUELA DE; MASULLO, ALFONSO; SALZANO, FRANCESCO ANTONIO; CAPUTO, ALESSANDRO. PD-L1 DYSREGULATION IN COVID-19 PATIENTS. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 01-11, 7 JUN. 2021. FRONTIERS MEDIA SA. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.3389/FIMMU.2021.695242](http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.695242). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://WWW.FRONTIERSIN.ORG/ARTICLES/10.3389/FIMMU.2021.695242/FULL](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.695242/full). ACESSO EM: 10 MAIO 2022.
40. ZHOU, DEXI; HUANG, CHENG; LIN, ZHEN; ZHAN, SHUXIANG; KONG, LINGNA; FANG, CHENGBO; LI, JUN. MACROPHAGE POLARIZATION AND FUNCTION WITH EMPHASIS ON THE EVOLVING ROLES OF COORDINATED REGULATION OF CELLULAR SIGNALING PATHWAYS. CELLULAR SIGNALLING, [S.L.], v. 26, n. 2, p. 192-197, FEV. 2014. ELSEVIER BV. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.CELLSIG.2013.11.004](http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.004). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/ABS/PII/S0898656813003252?VIA%3DIHUB](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0898656813003252?via%3DIHUB). ACESSO EM: 25 OUT 2020.
41. GARCÍA, LUIS F.. IMMUNE RESPONSE, INFLAMMATION, AND THE CLINICAL SPECTRUM OF COVID-19. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, MEDELLÍN, v. 11, n. 1, p. 1441, JUN. 2020. DISPONÍVEL

EM: [HTTPS://WWW.FRONTIERSIN.ORG/ARTICLE/10.3389/FIMMU.2020.01441](https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.01441). ACESSO EM: 25 OUT. 2021.

42. WU, ZUNYOU; MCGOOGAN, JENNIFER M.. CHARACTERISTICS OF AND IMPORTANT LESSONS FROM THE CORONAVIRUS DISEASE 2019 (COVID-19) OUTBREAK IN CHINA. *JAMA*, [S.L.], v. 323, n. 13, p. 1239, 7 ABR. 2020. AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION (AMA). [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1001/JAMA.2020.2648](http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.2648). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://JAMANETWORK.COM/JOURNALS/JAMA/FULLARTICLE/2762130](https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2762130). ACESSO EM: 10 MAIO 2022.

43. ZHU, NA; ZHANG, DINGYU; WANG, WENLING; LI, XINGWANG; YANG, BO; SONG, JINGDONG; ZHAO, XIANG; HUANG, BAoyING; SHI, WEIFENG; LU, ROUJIAN. A NOVEL CORONAVIRUS FROM PATIENTS WITH PNEUMONIA IN CHINA, 2019. *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, [S.L.], v. 382, n. 8, p. 727-733, 20 FEV. 2020. MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1056/NEJMOA2001017](http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa2001017). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/31978945/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31978945/). ACESSO EM: 10 MAIO 2022.

44. HE, FENG; DENG, YU; LI, WEINA. CORONAVIRUS DISEASE 2019: WHAT WE KNOW?. *JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY*, [S.L.], v. 92, n. 7, p. 719-725, 28 MAR. 2020. WILEY. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1002/JMV.25766](http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25766). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://ONLINELIBRARY.WILEY.COM/DOI/PDF/10.1002/JMV.25766](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jmv.25766). ACESSO EM: 10 MAIO 2022.

45. CHU, HIN; CHAN, JASPER FUK-WOO; YUEN, TERRENCE Tsz-TAI; SHUAI, HUIPING; YUAN, SHUOFENG; WANG, YIXIN; HU, BINGJIE; YIP, CYRIL CHIK-YAN; TSANG, JESSICA OI-LING; HUANG, XINER. COMPARATIVE TROPISM, REPLICATION KINETICS, AND CELL DAMAGE PROFILING OF SARS-CoV-2 AND SARS-CoV WITH IMPLICATIONS FOR CLINICAL MANIFESTATIONS, TRANSMISSIBILITY, AND LABORATORY STUDIES OF COVID-19: AN OBSERVATIONAL STUDY. *THE LANCET MICROBE*, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 14-23, MAIO 2020. ELSEVIER BV. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/S2666-5247\(20\)30004-5](http://dx.doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30004-5). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/32835326/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32835326/). ACESSO EM: 10 MAIO 2022.

46. FUNG, To SING; LIU, DING XIANG. HUMAN CORONAVIRUS: HOST-PATHOGEN INTERACTION. *ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY*, [S.L.], v. 73, n. 1, p. 529-557, 8 SET. 2019. ANNUAL REVIEWS. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1146/ANNUREV-MICRO-020518-115759](http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115759). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://WWW.ANNUALREVIEWS.ORG/DOI/10.1146/ANNUREV-MICRO-020518-115759](https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-020518-115759). ACESSO EM: 10 MAIO 2022.

47. DANDEKAR, AJAI A.; PERLMAN, STANLEY. IMMUNOPATHOGENESIS OF CORONAVIRUS INFECTIONS: IMPLICATIONS FOR SARS. *NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY*, [S.L.], v. 5, n. 12, p. 917-927, DEZ. 2005. SPRINGER SCIENCE AND BUSINESS MEDIA LLC. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1038/NRI1732](http://dx.doi.org/10.1038/nri1732). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/16322745/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16322745/). ACESSO EM: 10 MAIO 2022.

48. BOECHAT, J.L.; CHORA, I.; MORAIS, A.; DELGADO, L.. THE IMMUNE RESPONSE TO SARS-CoV-2 AND COVID-19 IMMUNOPATHOLOGY – CURRENT PERSPECTIVES. *PULMONOLOGY*, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 423-437, SET. 2021. ELSEVIER BV. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1016/J.PULMOE.2021.03.008](http://dx.doi.org/10.1016/j.pulmoe.2021.03.008). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/PII/S2531043721000842?VIA%3DIHUB](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2531043721000842?via%3DIHUB). ACESSO EM: 10 MAIO 2022.

49. MASON, ROBERT J. PATHOGENESIS OF COVID-19 FROM A CELL BIOLOGY PERSPECTIVE. *EUR RESPIR J*, [S. L.], v. 4, n. 55, p. 1-3, ABR. 2020. DISPONÍVEL EM: [HTTPS://ERJ.ERSJOURNALS.COM/CONTENT/ERJ/55/4/2000607.FULL.PDF](https://erj.ersjournals.com/content/erj/55/4/2000607.full.pdf). ACESSO EM: 15 JUN. 2020.

50. CHOUDHURY, KINGSHUK ROY; YAGLE, KEVIN J.; SWANSON, PAUL E.; KROHN, KENNETH A.; RAJENDRAN, JOSEPH G.. A ROBUST AUTOMATED MEASURE OF AVERAGE ANTIBODY STAINING IN IMMUNOHISTOCHEMISTRY IMAGES. *JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY*, [S.L.], v. 58, n. 2, p. 95-107, 17 AGO. 2009. SAGE PUBLICATIONS. [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1369/JHC.2009.953554](http://dx.doi.org/10.1369/JHC.2009.953554). DISPONÍVEL EM: [HTTPS://JOURNALS.SAGEPUB.COM/DOI/FULL/10.1369/JHC.2009.953554](https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1369/JHC.2009.953554). ACESSO EM: 02 MAIO 2022.
51. BUSATTA VAZ DE PAULA C, NAGASHIMA S, LIBERALESSO V, COLLETE M, ET AL. COVID-19: IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF TGF-B SIGNALING PATHWAYS IN PULMONARY FIBROSIS. 2021 [CITED 2022 JAN 13]; AVAILABLE FROM: [HTTPS://DOI.ORG/10.3390/IJMS23010168](https://doi.org/10.3390/IJMS23010168)
52. PARAMSOTHY A, LARTEY JALLOH S, DAVIES RA, GUTTORMSEN AB, COX RJ, MOHN KGI. HUMORAL AND CELLULAR IMMUNE RESPONSES IN CRITICALLY ILL INFLUENZA A/H1N1-INFECTED PATIENTS. *SCAND J IMMUNOL* [INTERNET]. 2021 AUG 1 [CITED 2022 APR 22];94(2). AVAILABLE FROM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/33891354/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33891354/)
53. HARIRI LP, NORTH CM, SHIH AR, ET AL. LUNG HISTOPATHOLOGY IN CORONAVIRUS DISEASE 2019 AS COMPARED WITH SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME AND H1N1 INFLUENZA: A SYSTEMATIC REVIEW. *CHEST* [INTERNET]. 2021 JAN 1 [CITED 2022 APR 22];159(1):73–84. AVAILABLE FROM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/33038391/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33038391/)
54. ZHOU S, WANG Y, ZHU T, XIA L. CT FEATURES OF CORONAVIRUS DISEASE 2019 (COVID-19) PNEUMONIA IN 62 PATIENTS IN WUHAN, CHINA. [HTTPS://DOI.ORG/102214/AJR2022975](https://doi.org/102214/AJR2022975) [INTERNET]. 2020 MAR 5 [CITED 2021 AUG 30];214(6):1287–94. AVAILABLE FROM: [WWW.AJRONLINE.ORG](http://www.ajronline.org)
55. NAGASHIMA S, MENDES MC, CAMARGO MARTINS AP, ET AL. ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AND THROMBOSIS IN PATIENTS WITH COVID-19—BRIEF REPORT. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* [INTERNET]. 2020 [CITED 2022 APR 22];40(10):2404. AVAILABLE FROM: </PMC/ARTICLES/PMC7505138/>
56. JIA L, XIE J, ZHAO J, ET AL. MECHANISMS OF SEVERE MORTALITY-ASSOCIATED BACTERIAL CO-INFECTIONS FOLLOWING INFLUENZA VIRUS INFECTION. *FRONT CELL INFECT MICROBIOL*. 2017 AUG 3;7(AUG):338.
57. RAMASAMY S, SUBBIAN S. CRITICAL DETERMINANTS OF CYTOKINE STORM AND TYPE I INTERFERON RESPONSE IN COVID-19 PATHOGENESIS. *CLIN MICROBIOL REV* [INTERNET]. 2021 JUL 1 [CITED 2022 APR 24];34(3). AVAILABLE FROM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/33980688/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33980688/)
58. DOGLIONI C, RAVAGLIA C, CHILOSI M, ET AL. COVID-19 INTERSTITIAL PNEUMONIA: HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FEATURES ON CRYOBIOPSIES. *RESPIRATION* [INTERNET]. 2021 JUN 1 [CITED 2022 APR 24];100(6):488–98. AVAILABLE FROM: [HTTPS://WWW.KARGER.COM/ARTICLE/FULLTEXT/514822](https://www.karger.com/article/fulltext/514822)
59. HALLER O, KOCHS G, WEBER F. INTERFERON, MX, AND VIRAL COUNTERMEASURES. *CYTOKINE GROWTH FACTOR REV* [INTERNET]. 2007 OCT [CITED 2022 APR 26];18(5–6):425–33. AVAILABLE FROM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/17683972/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17683972/)
60. WITKOWSKI M, TIZIAN C, FERREIRA-GOMES M, ET AL. UNTIMELY TGFβ RESPONSES IN COVID-19 LIMIT ANTIVIRAL FUNCTIONS OF NK CELLS. *NAT* 2021 6007888 [INTERNET]. 2021 OCT 25 [CITED 2022 APR 24];600(7888):295–301. AVAILABLE FROM: [HTTPS://WWW.NATURE.COM/ARTICLES/S41586-021-04142-6](https://www.nature.com/articles/s41586-021-04142-6)

61. KANEKO N, BOUCAU J, KUO H-H, ET AL. TEMPORAL CHANGES IN T CELL SUBSETS AND EXPANSION OF CYTOTOXIC CD4+ T CELLS IN THE LUNGS IN SEVERE COVID-19. *CLIN IMMUNOL* [INTERNET]. 2022 APR [CITED 2022 APR 24];237: 108991. AVAILABLE FROM: [/PMC/ARTICLES/PMC8961941/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35411411/)
62. GADOTTI AC, CASTRO M, TELLES JP, ET AL. IFN- γ IS AN INDEPENDENT RISK FACTOR ASSOCIATED WITH MORTALITY IN PATIENTS WITH MODERATE AND SEVERE COVID-19 INFECTION. *VIRUS RES*. 2020 NOV 1;289: 198171.
63. 198171.
64. SCHMIDT ME, VARGA SM. THE CD8 T CELL RESPONSE TO RESPIRATORY VIRUS INFECTIONS. *FRONT IMMUNOL*. 2018 APR 9;9(APR):678.
65. XU W, LARBI A. MARKERS OF T CELL SENESCENCE IN HUMANS. *INT J MOL SCI* 2017, VOL 18, PAGE 1742 [INTERNET]. 2017 AUG 10 [CITED 2022 APR 1];18(8):1742. AVAILABLE FROM: [HTTPS://WWW.MDPI.COM/1422-0067/18/8/1742/HTM](https://www.mdpi.com/1422-0067/18/8/1742/htm)
66. VIRGIN HW, WHERRY EJ, AHMED R. REDEFINING CHRONIC VIRAL INFECTION. *CELL* [INTERNET]. 2009 JUL 10 [CITED 2022 MAY 6];138(1):30–50. AVAILABLE FROM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/19596234/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19596234/)
67. ARCANJO A, GUIMARÃES PINTO K, LOGULLO J, ET AL. CRITICALLY ILL CORONAVIRUS DISEASE 2019 PATIENTS EXHIBIT HYPERACTIVE CYTOKINE RESPONSES ASSOCIATED WITH EFFECTOR EXHAUSTED SENESCENT T CELLS IN ACUTE INFECTION. *J INFECT DIS* [INTERNET]. 2021 NOV 22 [CITED 2022 MAY 6];224(10):1672–83. AVAILABLE FROM: [HTTPS://ACADEMIC.OUP.COM/JID/ARTICLE/224/10/1672/6357075](https://academic.oup.com/jid/article/224/10/1672/6357075)
68. WHERRY EJ. T CELL EXHAUSTION. *NAT IMMUNOL* [INTERNET]. 2011 JUN [CITED 2022 APR 2];12(6):492–9. AVAILABLE FROM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/21739672/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21739672/)
69. HOUSE IG, THIA K, BRENNAN AJ, ET AL. HETEROZYGOSITY FOR THE COMMON PERFORIN MUTATION, P.A91V, IMPAIRS THE CYTOTOXICITY OF PRIMARY NATURAL KILLER CELLS FROM HEALTHY INDIVIDUALS. *IMMUNOL CELL BIOL* [INTERNET]. 2015 JUL 8 [CITED 2022 MAY 6];93(6):575–80. AVAILABLE FROM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/25776844/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25776844/)
70. VOSKOBOINIK I, WHISSTOCK JC, TRAPANI JA. PERFORIN AND GRANZYMES: FUNCTION, DYSFUNCTION AND HUMAN PATHOLOGY. *NAT REV IMMUNOL* [INTERNET]. 2015 JUN 27 [CITED 2022 MAY 6];15(6):388–400. AVAILABLE FROM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/25998963/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25998963/)
71. CABRERA-MARANTE O, FRÍAS ER, PLEGUEZUELO DE, ET AL. PERFORIN GENE VARIANT A91V IN YOUNG PATIENTS WITH SEVERE COVID-19. *HAEMATOLOGICA* [INTERNET]. 2020 DEC 1 [CITED 2022 MAY 6];105(12):2844–6. AVAILABLE FROM: [HTTPS://PUBMED.NCBI.NLM.NIH.GOV/33256384/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33256384/)
72. FEDOR, HELEN L.; MARZO, ANGELO M. DE. PRACTICAL METHODS FOR TISSUE MICROARRAY CONSTRUCTION. *PANCREATIC CANCER*, [S.L.], p. 089-102, 2005. HUMANA PRESS. <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-780-7:089>.
73. ZANCHETTIN, ALINE CRISTINA; BARBOSA, LEONARDO VINICIUS; DUTRA, ANDERSON AZEVEDO; PRÁ, DANIELE MARGARITA MARANI; PEREIRA, MARCOS ROBERTO CURCIO; STOCCO, REBECCA BENICIO; MARTINS, ANA PAULA CAMARGO; PAULA, CAROLINE BUSATTA

VAZ DE; NAGASHIMA, SEIGO; NORONHA, LUCIA DE. ROLE OF GENETIC POLYMORPHISM PRESENT IN MACROPHAGE ACTIVATION SYNDROME PATHWAY IN POST MORTEM BIOPSIES OF PATIENTS WITH COVID-19. *VIRUSES*, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 1699, 31 JUL. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v14081699>.

74. NAGASHIMA, SEIGO; MENDES, MONALISA CASTILHO; MARTINS, ANA PAULA CAMARGO; BORGES, NÍCOLAS HENRIQUE; GODOY, THIAGO MATEUS; MIGGIOLARO, ANNA FLAVIA RIBEIRO DOS SANTOS; DEZIDÉRIO, FELIPE DA SILVA; MACHADO-SOUZA, CLEBER; NORONHA, LUCIA DE. ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AND THROMBOSIS IN PATIENTS WITH COVID-19—BRIEF REPORT. *ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY*, [S.L.], v. 40, n. 10, p. 2404-2407, OUT. 2020. OVID TECHNOLOGIES (WOLTERS KLUWER HEALTH). <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.120.314860>.

75. WEIGERT, ANDREAS; OLESCH, CATHERINE; BRÜNE, BERNHARD. SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE AND MACROPHAGE BIOLOGY—HOW THE SPHINX TAMES THE BIG EATER. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY*, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-19, 19 JUL. 2019. FRONTIERS MEDIA SA. <HTTP://DX.DOI.ORG/10.3389/FIMMU.2019.01706>.

13 ANEXOS

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: COVID19

Caracterização clínica e epidemiológica de pacientes atendidos em Curitiba-PR

Pesquisador: Cristina Pellegrino Baena

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 1

CAAE: 30188020.7.1001.0020

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.944.734

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram encontrados óbices éticos nos documentos do protocolo.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 31 de Março de 2020

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão tecidual de moléculas de adesão e de interleucinas, em amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por pneumopatias graves pandêmicas (Influenza A H1N1) e não-pandêmicas.

Pesquisador: Lúcia de Noronha

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 76401717.0.3001.0020

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.550.445

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está objetivamente relatada, não havendo qualquer necessidade de outros esclarecimentos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos necessários para a realização do projeto foram apresentados e estão em conformidade com a Resolução CNS N° 466 de 2012.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 466/2012, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou ementas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 19 de Março de 2018

Assinado por:
NAIM AKEL FILHO
 (Coordenador)

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho **CEP:** 80.215-901
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 **Fax:** (41)3271-2103 **E-mail:** nep@pucpr.br

Termo de consentimento livre e esclarecido

Post-Mortem

O objetivo deste estudo é descrever sinais, sintomas, e demais aspectos da apresentação do quadro clínico, exames laboratoriais, evolução da doença, juntamente com alterações da pulmonares em pacientes com COVID-19.

O vírus SARS-CoV-2 emergiu no último bimestre de 2019, em que a doença provocada por este microrganismo foi reportada inicialmente na China, espalhando-se rapidamente pelos continentes, até que em 11 de março de 2020, a Organização Mundial de Saúde decretou estado de pandemia. O surto foi identificado como uma série de casos de pneumonia em que muitos pacientes evoluíram para insuficiência respiratória e óbito.

Embora existam muitos estudos em andamento para busca de tratamento e vacina, ainda não existe evidência definitiva de cura para toda a população.

PROCEDIMENTOS:

1. Biópsia minimamente invasiva de fragmento pulmonar (dimensões de 3x3 cm), através de incisão com corte sobre a pele com comprimento entre 5 e 10 cm, em face anterior de tórax (peito) à esquerda.
2. Biópsia minimamente invasiva de fragmento de miocárdio (músculo do coração), com dimensões de 1x1 cm, quando acessível pela mesma abertura no tórax.
3. Biópsia minimamente invasiva de fragmento de músculo esquelético intercostal, com dimensões de 1x1 cm, quando acessível pela mesma abertura no tórax.
4. Biópsia de rim minimamente invasiva, guiada por Ultrassom, com punção por agulha para tecidos, com fragmentos de aproximadamente 10 a 20 mm.
5. Biópsia de fígado minimamente invasiva, guiada por Ultrassom, com punção por agulha para tecidos, com fragmentos de aproximadamente 10 a 20 mm.

ANÁLISES:

A partir dos fragmentos de pulmão, coração, rim, músculo esquelético e fígado (quando coletados) serão realizados preparos em formato de lâminas para estudo de células, proteínas, anticorpos, presença do vírus, estudos genéticos e imunológicos.

RISCOS:

Não há existência de qualquer risco biológico ao doador ou familiares em decorrência dos procedimentos a serem realizadas pela pesquisa.

BENEFÍCIOS:

A autorização de coleta destas amostras de sangue e tecido pelos familiares do doador trazem como benefício a possibilidade de execução de estudos em busca de compreensão da nova doença provocada pelo vírus SARS-CoV2, além de contribuição para o desenvolvimento de linhas de tratamento e prevenção, como descrito acima.

SÍGILO E PRIVACIDADE:

Estou ciente de minha privacidade respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma me identificar será mantido em sigilo. Os pesquisadores se responsabilizam pela guarda e confidencialidade dos dados, bem como a não exposição dos dados de pesquisa.

RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO:

Todas as despesas serão de responsabilidade dos Pesquisadores. Os participantes da pesquisa bem como seu acompanhante (se houver) não arcarão com nenhum custo referente a procedimento, exames, transporte, alimentação ou outros. Caso ocorra qualquer despesa, haverá ressarcimento dos valores gastos na forma seguinte: depósito em conta. Caso ocorra algum dano decorrente da minha da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado.

CONTATO

Os pesquisadores envolvidos com o estudo são Juliano Gasparetto, Cristina Baena, Anna Flavia Miggiolaro, Felipe Tuon, Andrea Moreno, Lucia Noronha, Thyago Moraes, Lidia Moura, José Faria, Gustavo Lenci, que são pesquisadores e professores na Escola de Medicina da PUCPR e com eles poderei manter contato pelos telefones (41)3271-2979. O Conselho Nacional de Pesquisa (CONEP) é composto por um grupo de pessoas que estão trabalhando para garantir que seus direitos como participante de pesquisa sejam respeitados. Ele tem a obrigação de avaliar se a pesquisa foi planejada e se está sendo executada de forma ética. Se você achar que a pesquisa não está sendo realizada da forma como você imaginou ou que está sendo prejudicado de alguma forma, você pode entrar em contato com o CONEP pelo telefone (61)3315-5877 entre segunda e sexta-feira das 08h às 18h ou pelo e-mail conep@saude.gov.br Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, Lote D 3º andar Brasília.

Por meio deste instrumento eu
 _____ (nome completo),
 _____ (grau de parentesco com o paciente), RG
 _____ autorizo a biópsia post-mortem do paciente após seu
 óbito para fins de determinação da causa de morte, doenças primárias, doenças não
 diagnosticadas e relacionar com a suspeita de infecção por Coronavírus (COVID-19).

Nome _____ do
 paciente: _____

BENEFÍCIOS:

A autorização de coleta destas amostras de sangue e tecido pelos familiares do doador trazem como benefício a possibilidade de execução de estudos em busca de compreensão da nova doença provocada pelo vírus SARS-CoV2, além de contribuição para o desenvolvimento de linhas de tratamento e prevenção, como descrito acima.

SIGILO E PRIVACIDADE:

Estou ciente de minha privacidade respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma me identificar será mantido em sigilo. Os pesquisadores se responsabilizam pela guarda e confidencialidade dos dados, bem como a não exposição dos dados de pesquisa.

RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO:

Todas as despesas serão de responsabilidade dos Pesquisadores. Os participantes da pesquisa bem como seu acompanhante (se houver) não arcarão com nenhum custo referente a procedimento, exames, transporte, alimentação ou outros. Caso ocorra qualquer despesa, haverá ressarcimento dos valores gastos na forma seguinte: depósito em conta. Caso ocorra algum dano decorrente da minha da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado.

CONTATO

Os pesquisadores envolvidos com o estudo são Juliano Gasparetto, Cristina Baena, Anna Flavia Miggiolaro, Felipe Tuon, Andrea Moreno, Lucia Noronha, Thyago Moraes, Lidia Moura, José Faria, Gustavo Lenci, que são pesquisadores e professores na Escola de Medicina da PUCPR e com eles poderei manter contato pelos telefones (41)3271-2979. O Conselho Nacional de Pesquisa (CONEP) é composto por um grupo de pessoas que estão trabalhando para garantir que seus direitos como participante de pesquisa sejam respeitados. Ele tem a obrigação de avaliar se a pesquisa foi planejada e se está sendo executada de forma ética. Se você achar que a pesquisa não está sendo realizada da forma como você imaginou ou que está sendo prejudicado de alguma forma, você pode entrar em contato com o CONEP pelo telefone (61)3315-5877 entre segunda e sexta-feira das 08h às 18h ou pelo e-mail conep@saude.gov.br Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, Lote D 3º andar Brasília.

Por meio deste instrumento eu
 _____ (nome completo),
 _____ (grau de parentesco com o paciente), RG
 _____ autorizo a biópsia post-mortem do paciente após seu
 óbito para fins de determinação da causa de morte, doenças primárias, doenças não
 diagnosticadas e relacionar com a suspeita de infecção por Coronavirus (COVID-19).

Nome _____ do
 paciente: _____

Data de óbito: ___/___/___ Hora de óbito: _____
 Hospital em que ocorreu o óbito:

Declaro estar ciente que:

- O procedimento implica na retirada de amostras de órgãos do paciente de maneira minimamente invasiva.
- As amostras retiradas serão mantidas e acondicionadas respeitando o sigilo médico-paciente assim como as normas e padrões de confidencialidade e ética aplicadas a pesquisa científica.
- Esta biópsia post-mortem **não tem caráter pericial**, não sendo indicada para causas de morte não naturais ou suspeita, não importando o tempo entre o evento e a morte do paciente.
- Também autorizo o uso das amostras coletadas provenientes do exame de biópsia post-mortem para ensino e pesquisa, desde que sejam cumpridas as normas vigentes no país para esse fim.
- Declaro que tive respostas para minhas perguntas e que fui informado de forma satisfatória sobre o(s) procedimento(s) acima descrito(s).

Sendo assim expresse meu livre consentimento esclarecido para a biópsia post-mortem no Hospital:

Assinatura do parente ou responsável: _____

Assinatura e CRM do médico solicitante: _____

Curitiba de de _____

Este documento deve ser preenchido em uma única via, assinado por todos, e anexado ao prontuário do paciente.