

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

LUCAS FERNANDES ANANIAS

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE FATORES GÊNICOS, TRANSCRICIONAIS E  
SÉRICOS RELACIONADOS ÀS CÉLULAS *NATURAL KILLER* SOBRE O DESFECHO  
CLÍNICO E A GRAVIDADE EM PACIENTES COM COVID-19

UBERABA  
2025

LUCAS FERNANDES ANANIAS

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE FATORES GÊNICOS, TRANSCRICIONAIS E  
SÉRICOS RELACIONADOS ÀS CÉLULAS *NATURAL KILLER* SOBRE O DESFECHO  
CLÍNICO E A GRAVIDADE EM PACIENTES COM COVID-19

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Imunologia Básica e Aplicada, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Fernanda Bernadelli De Vito

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka

Colaborador: Prof. Dr. Helio Moraes de Souza

UBERABA  
2025

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

A551a Ananias, Lucas Fernandes  
Avaliação da influência de fatores gênicos, transcricionais e séricos relacionados às células natural killer sobre o desfecho clínico e a gravidade em pacientes com COVID-19 / Lucas Fernandes Ananias. – 2025.  
61 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2025

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Bernadelli De Vito

Coorientadora: Profa. Dra. Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka

1. COVID-19. 2. Linfócitos T citotóxicos. 3. Células matadoras naturais. 4. Expressão gênica. 5. Imunomodulação. I. De Vito, Fernanda Bernadelli. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.98:578.834

LUCAS FERNANDES ANANIAS

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE FATORES GÊNICOS, TRANSCRICIONAIS E  
SÉRICOS RELACIONADOS ÀS CÉLULAS *NATURAL KILLER* SOBRE O DESFECHO  
CLÍNICO E A GRAVIDADE EM PACIENTES COM COVID-19

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Imunologia Básica e Aplicada, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Fernanda Bernadelli De Vito

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka

Colaborador: Prof. Dr. Helio Moraes de Souza

\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Fernanda Bernadelli De Vito - Orientadora  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Prof. Dr. Ronaldo Bragança Martins Júnior  
Universidade de São Paulo



Aos meus pais, Dirlene e Antônio, ao meu irmão, Mateus, e à minha namorada, Fran, que sempre apoiaram minhas escolhas e me deram forças para prosseguir.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me abençoado e me iluminado por toda a minha trajetória até aqui, por todo o discernimento para fazer as melhores escolhas e por todas as boas pessoas que colocou em meu caminho.

Agradeço a toda a minha família: minha mãe Dirlene, meu pai Antônio, meu irmão Mateus, minha avó, tios, tias etc. que mesmo 250 km de distância, se bastando apenas de suas vozes através do celular, puderam me fornecer a energia e o amor necessários para que tivesse forças para trilhar essa jornada e desempenhar o melhor que podia.

Agradeço aos grandes amigos de Uberaba e do laboratório de hematologia, Luis Fernando, Daniel, Tiago, Lucas, Lorryne, Marianne, Stéfani, Roberto, Juliana, Rhanaira, Sansão, que foram capazes de tornar essa longa caminhada mais leve e divertida, além dos diversos conselhos e troca de experiências que impactaram positivamente toda a minha formação.

Agradeço, profundamente, a minha namorada, Franciele, por estar do meu lado a cada momento desses 2 anos, acalmando meus receios e incentivando as minhas aspirações. Eu te amo!

Agradeço também a todo o pessoal do Conservatório Estadual de Música Renato Frateschi e aos colegas e professores da licenciatura em química da UFTM, que foram (e estão sendo) fontes de novos conhecimentos que me desafiam e me incentivam a buscá-lo cada vez mais.

Agradeço, especialmente, aqueles responsáveis por me guiar durante essa caminhada, compartilhando o melhor dos seus conhecimentos e de terem me dado essa oportunidade valiosa, Prof<sup>ª</sup>. Fernanda Bernadelli, Prof<sup>ª</sup>. Sarah Tanaka, Prof<sup>ª</sup>. Anna Cecília, Prof. Hélio Moraes e tantos outros colegas do laboratório de hematologia e hemoterapia, alunos de iniciação científica, mestrados, doutorandos e pós-doutorandos, que, nem que fosse com uma simples opinião, ajudaram a construir o título de mestre que venho a conquistar.

Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo financiamento da minha bolsa de mestrado que me possibilitou viver em Uberaba/MG independente de outras fontes de renda e a UFTM, por toda a estrutura fornecida.

Espero que essa jornada só esteja começando e que o futuro nos reserve o melhor!

“Para isso existem as escolas: não para ensinar as respostas, mas para ensinar as perguntas. As respostas nos permitem andar sobre a terra firme. Mas somente as perguntas nos permitem entrar pelo mar desconhecido.”

Rubem Alves

## RESUMO

**Introdução:** A COVID-19 é uma doença respiratória de elevada transmissibilidade que, embora tenha se tornado menos grave na maior parte do mundo, continua a representar um desafio significativo para a saúde pública. Isso se deve ao fato de que ainda resulta em milhares de mortes e gera preocupações devido ao surgimento de novas variantes, além das lacunas no conhecimento sobre a complexa interação entre o vírus e o hospedeiro. As células *natural killer* (NK) têm um importante papel dentre os mecanismos de defesa contra os vírus. Apesar de estudos relatarem diminuição na contagem de células NK em pacientes com COVID-19, principalmente nos casos de maior gravidade, a contribuição de suas proteínas citotóxicas na patogênese da doença ainda não foi devidamente elucidada. **Objetivo:** Esse estudo do tipo coorte visou avaliar o papel de genes relacionados à ativação, ao desenvolvimento e aos mecanismos efetores das células NK e do potencial papel imunomodulador da infecção viral. **Métodos:** Foram incluídos no estudo 140 pacientes com COVID-19 atendidos em hospitais de Uberaba/MG nos anos de 2020 e 2021. A análise foi feita por meio da avaliação da presença do polimorfismo A91V, no gene da perforina, e do polimorfismo Q48R, no gene da granzima B, além da quantificação da expressão gênica de *PRF1*, *GZMB*, *TBX21*, *EOMES*, *IL15*, *RUNX3* e *IFNG* e a consequente associação desses dados com o desfecho clínico e a gravidade dos pacientes infectados. Além disso, foi realizado um ensaio funcional das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) frente ao estímulo do plasma de pacientes infectados por meio da quantificação das proteínas citotóxicas perforina e granzima B e das citocinas IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2, além da quantificação da expressão gênica dessas células sob estímulo. **Resultados e discussão:** A presença dos polimorfismos analisados não diferiu entre os parâmetros de gravidade e desfecho. Além disso, pacientes que obtiveram alta apresentaram maior expressão dos genes da perforina, granzima B, Eomes e IL-15 em relação aos pacientes que foram a óbito. O mesmo foi observado naqueles pacientes de menor gravidade, seja para perforina, granzima B e IL-15, indicando uma maior ativação linfocitária e consequentemente uma maior expressão desses genes, levando a um melhor prognóstico. Adicionalmente, células incubadas com o plasma de indivíduos infectados mostraram uma menor expressão de proteínas citotóxicas e uma maior expressão de citocinas com perfil pró-inflamatório. Considerando esses aspectos, a presente pesquisa embasa uma melhor compreensão da relação vírus-hospedeiro, o que poderá ser útil em um manejo mais adequado dos pacientes,

identificando aqueles de maior risco, bem como no desenvolvimento ou identificação de drogas mais eficazes.

**Palavras-chave:** COVID-19, Linfócitos T citotóxicos, células *natural killer*; Expressão gênica, Imunomodulação.

## ABSTRACT

**Introduction:** COVID-19 is a highly transmissible respiratory disease that, although it has become less severe in most parts of the world, continues to pose a significant challenge to public health. This is due to the fact that it still results in thousands of deaths and raises concerns because of the emergence of new variants, in addition to gaps in knowledge regarding the complex interaction between the virus and the host. Natural killer (NK) cells play a crucial role in host defense against viruses. Despite reports of decreased NK cell counts in COVID-19 patients, particularly in severe cases, the contribution of their cytotoxic proteins to the pathogenesis of the disease remains unclear. **Objective:** This cohort study aimed to evaluate the role of genes related to the activation, development, and effector mechanisms of NK cells, as well as the potential immunomodulatory role of viral infection. **Methods:** The study included 140 COVID-19 patients from hospitals in Uberaba, MG, Brazil, in 2020 and 2021. The analysis involved assessing the presence of the A91V polymorphism in the perforin gene, the Q48R polymorphism in the granzyme B gene, and quantifying the gene expression of *PRF1*, *GZMB*, *TBX21*, *EOMES*, *IL15*, *RUNX3*, and *IFNG*. The association of these data with clinical outcomes and disease severity was evaluated. Additionally, a functional assay was performed on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) stimulated with plasma from infected patients, quantifying the cytotoxic proteins perforin and granzyme B, and the cytokines IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4, and IL-2, as well as gene expression under stimulation. **Results and discussion:** The presence of the analyzed polymorphisms did not differ between severity parameters and outcomes. Furthermore, patients who were discharged had higher expression of perforin, granzyme B, Eomes, and IL-15 genes compared to those who died. The same was observed in patients with less severe disease, for perforin, granzyme B, and IL-15, indicating greater lymphocyte activation and consequently higher expression of these genes, leading to a better prognosis. Additionally, cells incubated with plasma from infected individuals showed lower expression of cytotoxic proteins and higher expression of pro-inflammatory cytokines. Considering these aspects, the present research provides a better understanding of the virus-host relationship, which may be useful in more appropriate patient management, identifying those at higher risk, as well as in the development or identification of more effective drugs.

**Keywords:** COVID-19, Cytotoxic T lymphocytes, Natural killer cells, Gene expression, Immunomodulation.

## LISTA DE SIGLAS

ACE-2: Enzima conversora de angiotensina 2

ACTB: Beta Actina

ADCC: Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

APAF-1: fator-1 apoptótico ativador da peptidase

BID: Agonista de morte de domínio de interação BH3

COVID-19: Doença do Coronavírus 2019

DAMP: Padrão Molecular Associado a Dano

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

EOMES: Eomesodermina

IFN- $\gamma$ : interferon-gamma

IL: interleucina

ILC: Células Linfoides Inatas

IRF: Fator Regulador de Intérferon

MERS-CoV: Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio

MHC: major histocompatibility complex - complexo de histocompatibilidade principal

MPR: Receptor de Manose-6-Fosfato

NET: Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos

NF-KB: Fator Nuclear Kappa B

NK: Natural Killer

OMS: Organização Mundial da Saúde

ORF: Open Reading Frame - Fase de Leitura Aberta

PAMP: Padrão Molecular Associado a Patógeno

PRR: Receptor de Reconhecimento Padrão

RIG-I: Gene I indutível por ácido retinoico

RNA: Ácido Ribonucleico

RUNX3: Fator de Transcrição 3 relacionado com Runt

SARS-CoV: Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave

STAT: transdutores de sinal e ativadores das proteínas de transcrição

T-bet: Fator transcricional T-Box

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformador- $\beta$

TLR: Receptores toll-like

TNF: fator de necrose tumoral

Treg: T reguladora

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>15</b>
2.1	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1.1	A COVID-19 (SARS-CoV-2).....	15
2.1.2	Células <i>natural killer</i> .....	20
2.1.2.1	Resposta imune mediada por grânulos contra vírus.....	23
2.1.2.2	Células <i>natural killer</i> em pacientes com COVID-19.....	26
2.2	OBJETIVOS.....	28
2.2.1	Objetivo geral.....	28
2.2.2	Objetivos específicos.....	28
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE.....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
4.1	CASUÍSTICA.....	30
4.2	EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM.....	30
4.3	EXTRAÇÃO DE RNA E EXPRESSÃO GÊNICA.....	31
4.4	ANÁLISE FUNCIONAL DAS CÉLULAS <i>NATURAL KILLER</i> .....	31
4.5	ANÁLISE DE DADOS.....	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
5.1	POLIMORFISMOS NOS GENES PRF1 E GZMB.....	34
5.2	EXPRESSÃO GÊNICA.....	35
5.3	EFEITO IMUNOMODULADOR.....	39
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>
	<b>ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

Os coronavírus (CoV) constituem uma família de RNAs virais, sendo que dois dos seus subtipos, *SARS-CoV* e *MERS-CoV* causam infecções do trato respiratório graves e potencialmente fatais (Guo, 2020). Em dezembro de 2019, uma doença respiratória aguda desconhecida surgiu pela primeira vez em Wuhan, China. O agente etiológico foi designado como *SARS-CoV-2*, devido compartilhar quase 80% de identidade para o *SARS-CoV* (Zhou, 2020). Clinicamente, a infecção pode cursar com febre, fadiga, tosse seca, falta de ar e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (Huang, 2020). No entanto, estima-se que mais de 80% dos indivíduos infectados sejam assintomáticos.

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra a infecção, sendo que as células *natural killer* (NK) desempenham um papel importante na imunidade inata antiviral (Deng, 2022). As células NK promovem a destruição de seus alvos celulares por meio de diversos mecanismos, como liberação de proteínas citotóxicas, ligação a receptores de morte celular e produção de citocinas inflamatórias (Van Eeden, 2020).

Alterações em fatores associados ao desenvolvimento e ativação das células NK, assim como em suas moléculas efetoras podem impactar na resistência ou suscetibilidade à infecção grave por COVID-19. A linfopenia em pacientes com COVID-19, associada a uma redução significativa na contagem de células NK no sangue periférico, apresenta uma correlação inversa e significativa com a gravidade da doença, conforme demonstrado pelos estudos de Kramer e colaboradores (2021). Esses achados sugerem que a contagem de células NK pode ser um indicador prognóstico adverso na COVID-19. Além disso, evidências mostram que pacientes com COVID-19 têm uma desregulação da resposta imune (Huang, 2020; Mehta, 2020), o que leva ao desenvolvimento de uma hiperinflamação cuja avaliação prévia ajudaria a evitar a mortalidade.

Uma vez que as células NK possuem função chave no combate a células infectadas por patógenos intracelulares, infere-se que alterações em genes que codificam suas proteínas citotóxicas, como a perforina e a granzima B, e em moléculas associadas a esses linfócitos, como fatores de transcrição e citocinas, poderiam interferir na resposta imune e na susceptibilidade a infecções devido a uma menor reação contra os invasores (Biron, 1999; Vivier, 2011; Cunningham, 2021).

Além disso, a investigação dos fatores que podem agir modificando e inibindo as células NK, como a expressão de fatores de transcrição, bem como o detalhamento do

processo de produção e ativação destas células (incluindo a análise da estrutura de genes, a transcrição do RNA mensageiro e a quantidade de proteínas contidas no arsenal destas células) são estratégias úteis que podem auxiliar na compreensão dos mecanismos imunológicos de resposta ao *SARS-CoV-2*. A melhor compreensão desses mecanismos poderá ser útil na abordagem mais adequada dos pacientes, identificando aqueles de maior risco, bem como no desenvolvimento de novas terapias para a COVID-19.

Ademais, embora a pandemia tenha se tornado menos grave em grande parte do mundo e visto que mais da metade da população mundial foi imunizada com ao menos uma dose da vacina (OMS, 2025), a COVID-19 ainda se mostra um desafio para a saúde pública. O surgimento de novas variantes e subvariantes a cada ano, como a JN.1, XEC e Arcturus, dotadas de maior potencial transmissível e virulento, reforça a importância de mais pesquisas e estudos sobre a doença, considerando que essa doença ainda ocasiona milhares de mortes e o mundo carece de métodos e marcadores preditivos de gravidade, o que poderia levar a uma terapêutica mais adequada.

Além disso, a COVID-19 longa ainda demanda mais pesquisas para entender os impactos e possíveis sequelas trazidas. O boletim epidemiológico do Ministério da Saúde também mostrou que a COVID-19 é a segunda doença infecciosa que mais mata, logo atrás da tuberculose (Ministério da Saúde do Brasil, 2024), o que mostra a ainda relevância da doença e a necessidade em aprofundar seus mecanismos e formas terapêuticas mais eficazes. Assim, esse estudo visa uma melhor compreensão desses mecanismos antivirais notadamente importantes, fornecendo conhecimento para o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 2.1.1 A COVID-19 (*SARS-CoV-2*)

*SARS-CoV-2* pertence ao gênero Betacoronavirus da família Coronaviridae e da ordem Nidovirales. Estes vírus pertencentes a esse gênero caracterizam-se por serem envelopados e serem RNA-vírus de sentido positivo (Ochani, 2021), que infectam humanos e muitas espécies de animais, como morcegos, guaxinins, macacos, porcos dentre outros. Este gênero também inclui os patógenos respiratórios humanos *SARS-CoV-1*, coronavírus da síndrome respiratória do oriente médio (MERS) (*MERS-CoV*), coronavírus humano HCoV-229E e HCoV-OC43 (Chan, 2015).

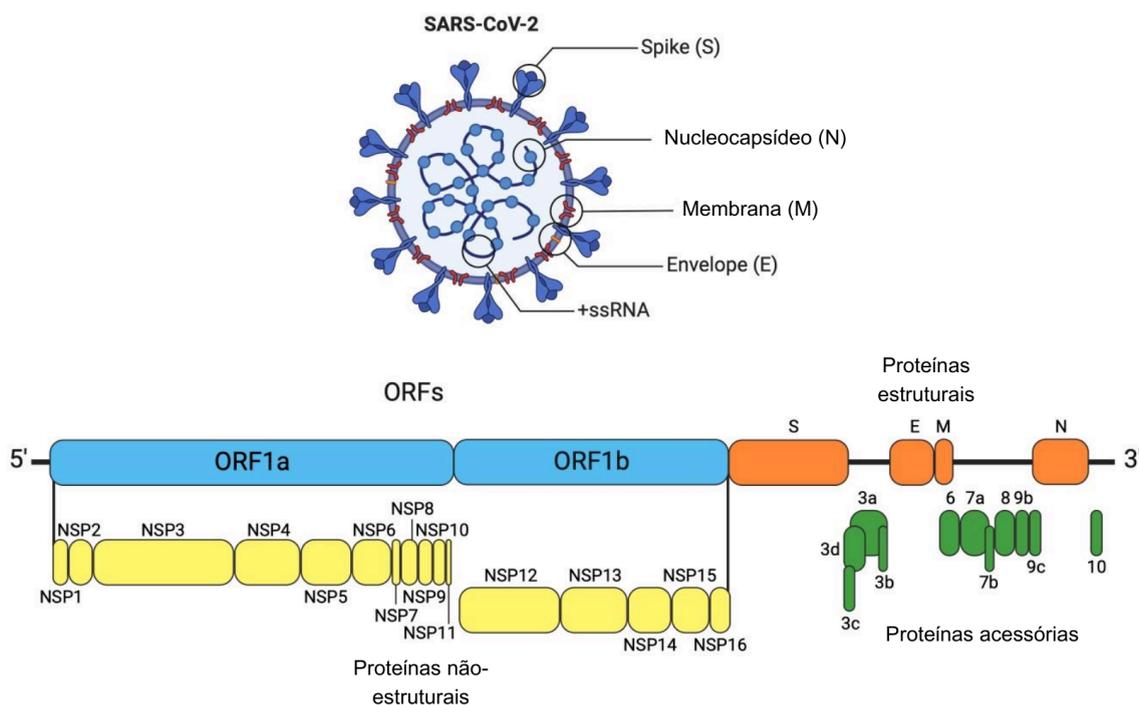
Em 2012 o *MERS-CoV* emergiu, sendo identificado em amostras de escarro de habitantes da Arábia Saudita diagnosticados com pneumonia (Ramadan, 2019). Vários casos e mortes foram confirmados devido a esta infecção, principalmente no país asiático. Anos depois, um surto de pneumonia de etiologia desconhecida foi relatado em Wuhan, capital da província de Hubei, no centro da China, em dezembro de 2019. O conjunto inicial de casos estava relacionado ao mercado atacadista de frutos do mar de Huanan, onde também eram vendidos animais de caça selvagens (National Geographic, 2020). Durante a investigação subsequente, o coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (*SARS*) (*SARS-CoV-2*) foi detectado em 33 das 585 amostras ambientais retiradas do mercado (Tang, 2020).

Casos subsequentes em outros países de diversos continentes sugeriram a disseminação global da enfermidade, até que em 11 de março de 2020 a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou pandemia global. O neologismo “sindemia” (sinergia + pandemia), termo cunhado pelo antropólogo médico americano Merrill Singer em 1990, foi sugerido como definição desta problemática, de modo que ele considera, além do vírus em si, também as condições sociais, ambientais e de saúde e como isso torna populações mais vulneráveis à prognósticos mais adversos da doença (CEE-FIOCRUZ, 2020). Atualmente, o número de total de casos ultrapassa os 750 milhões, e as mortes, mais de 7 milhões mundialmente (WHO, 2025). Especificamente no Brasil, o número de casos se aproxima dos 40 milhões, e o número de óbitos já superou os 700 mil (Ministério da Saúde do Brasil, 2025).

O genoma desse novo coronavírus compartilha cerca de 80% de similaridade com o *SARS-CoV* e cerca de 50% com o *MERS-CoV* (Lu, 2020). É composto por 14 fases de leitura

aberta (ORFs - *Open Reading Frame*), a qual é uma sequência contínua de nucleotídeos que pode ser traduzida em uma proteína. Dentre essas, dois terços codificam 16 proteínas não estruturais que compõem o complexo replicase do vírus (Zhang, 2020). O restante codifica 9 proteínas acessórias e 4 estruturais: Spike (S), Envelope (E), Membrana (M) e Nucleocapsídeo (N) (Figura 1).

**Figura 1** - Estrutura típica do *SARS-CoV-2* (80-120 nm) evidenciando suas proteínas estruturais e sua organização genômica

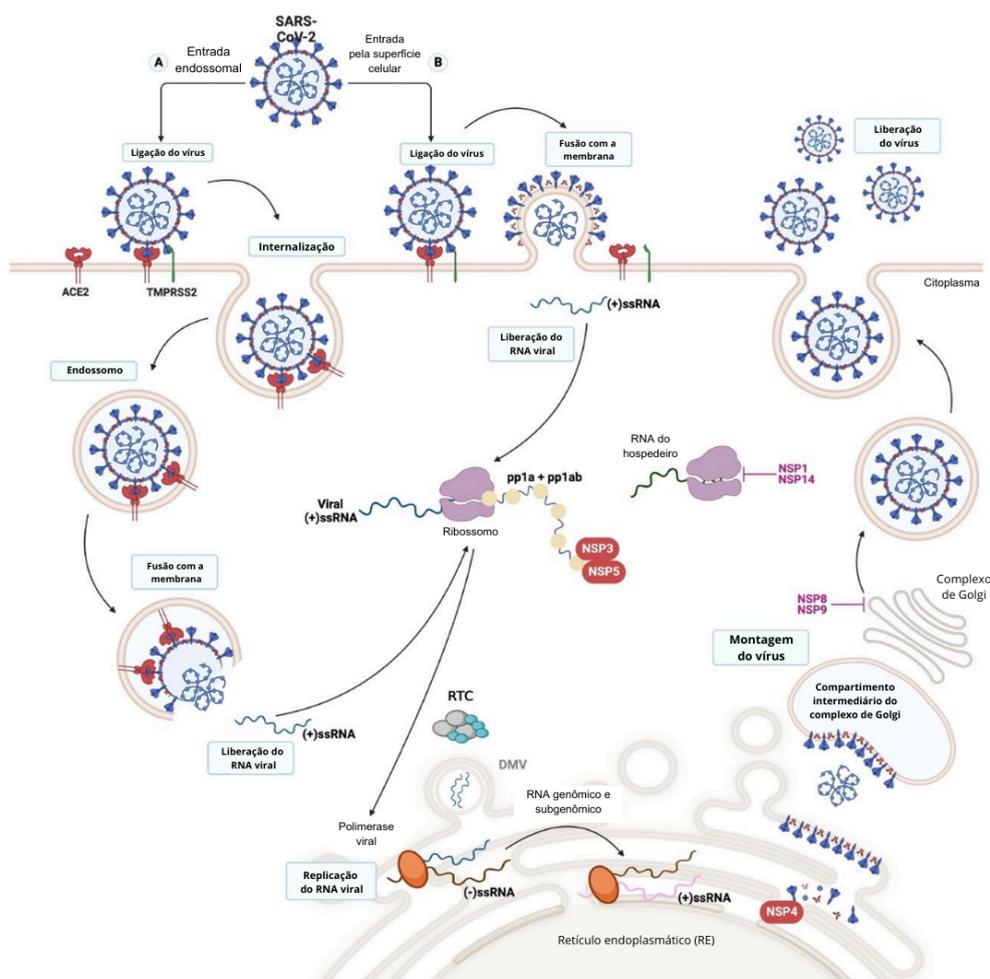


Fonte: Adaptado de Carvajal, 2024

A proteína do envelope (E) é importante para a montagem e liberação do vírus, além de ser um importante fator de virulências (Mandala, 2020). A proteína de membrana (M) é abundantemente expressa dentro do envelope lipídico, sendo essencial para a morfologia viral e para a supressão do interferon (Zheng, 2020). Por último, a proteína do nucleocapsídeo (N) estabiliza o genoma de RNA em um complexo helicoidal (Peng, 2020), sendo um alvo chave para a imunidade adaptativa do hospedeiro. Além destas principais, algumas outras proteínas acessórias não têm suas funções muito bem elucidadas.

A proteína *Spike* (S) contém os principais epítomos imunogênicos, presentes no domínio N-terminal e no domínio de ligação ao receptor, sendo alvos ideais de anticorpos neutralizantes. Ela também colabora com a entrada do vírus na célula, através da sua ligação com o receptor de angiotensina 2 (ACE-2), presente nas células humanas. A protease TMPRSS2 (Serina protease transmembrana 2) medeia a fusão do vírus com a membrana celular por meio da clivagem da proteína S. Uma vez dentro da célula hospedeira, o vírus libera seu genoma no citosol, após a remoção do nucleocapsídeo viral, onde é submetido à replicação e tradução. Em vesículas derivadas do retículo endoplasmático, o genoma de fita negativa serve como molde para gerar todo o genoma de fita positiva e o RNA subgenômico (sgRNA). A tradução deste resulta na síntese das proteínas estruturais do vírus. Quanto ao genoma de fita positiva, ele é encapsulado em vírions recém-sintetizados, que são liberados da célula por exocitose (Carvajal, 2024) (Figura 2).

**Figura 2** - O ciclo de vida do *SARS-CoV-2* na célula hospedeira.



Fonte: Adaptado de Carvajal, 2024

O tropismo viral irá depender da susceptibilidade e permissibilidade de uma célula hospedeira específica. Rememorando à epidemia de *SARS*, os indivíduos infectados frequentemente apresentavam doenças respiratórias que evoluíram para pneumonia grave, assim como na COVID-19, sugerindo que o pulmão era o tropismo primário do vírus (Peiris, 2003). Isso pode ser evidenciado pela ampla distribuição de receptores ACE2 nas células epiteliais da traqueia, brônquios e alvéolos (Liu, 2011), bem como em macrófagos alveolares (Kuba, 2005). Porém, com o avanço da pandemia, evidencia-se que a COVID-19 não abrange apenas doenças respiratórias, como o SARS, mas também pode afetar outros sistemas, como contribuir para a inflamação do miocárdio. Isso se dá visto a expressão difusa do receptor ACE2 também em células cardíacas, além de células renais, da mucosa intestinal e células imunes (Guo, 2007), o que deu ao *SARS-CoV-2* uma grande variedade de alvos suscetíveis à infecção.

A alta transmissibilidade da COVID-19 pode ser explicada pela diversidade de vias de infecção. Embora a transmissão por gotículas maiores que 5 µm seja a mais frequentemente relatada, outras formas de contágio também desempenham um papel importante. O contato direto com indivíduos infectados, a contaminação por meio de objetos e superfícies (fômites) e a dispersão de partículas virais menores no ar (aerossóis) constituem rotas relevantes de transmissão. (Chan, 2020; Doremalen, 2020; Ferrett, 2020).

Quanto à visão diagnóstica, já foram observados alguns índices marcadores da infecção no qual, segundo a Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (2020), se destaca a linfocitopenia, presente em 83,2% dos casos e o aumento da proteína C reativa, presente em 60,7% dos casos (Figura 3).

**Figura 3** - Alterações em parâmetros hematológicos e bioquímicos em pacientes com COVID-19

<b>Hematologia</b>	<b>Bioquímica</b>
Aumento de dímero-D	Aumento de bilirrubinas
Aumento do VHS	Aumento de creatinina
Leucocitose	Aumento de cTn
Linfopenia	Aumento de LDH
Microcitose	Aumento de PCR
Plaquetopenia	Aumento de procalcitonina
Prolongamento do TP	Diminuição da albumina

LDH: Lactato desidrogenase; PCR: Proteína C reativa; TP: Tempo de protrombina; cTn: Troponinas cardíacas; VHS: velocidade de hemossedimentação.

Fonte: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, 2020.

O genoma viral, já presente no citoplasma da célula hospedeira, gera Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMPs) e Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs), que são posteriormente detectados pelos Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs) da célula, tais como Gene I indutível por ácido retinoico (RIG-I) e Receptores do tipo Toll (TLRs). A ativação desses receptores direciona à ativação de fatores de transcrição como o Fator Regulatório de Interferon 3 (IRF3) e o Fator Nuclear Kappa B (NF-KB), que levam a expressão de interferons dos tipos 1 e 3, juntamente com agentes pró-inflamatórios assim como Fator de Necrose Tumoral (TNF), Interleucinas dos tipos 6, 8, 12 e 18 e quimiocinas tais como CCL2, CCL3 e CXCL10 (Birra, 2020). Os interferons produzidos ligam-se à superfície de células vizinhas objetivando aumentar a expressão dos Genes Estimulados por Interferon (ISGs), via Sinal de Transdução e Ativação para Transcrição (STAT), levando a um estado antiviral (Cheemarla, 2021).

Um dos principais quadros que caracteriza um maior dano tecidual e consequente maior gravidade na COVID-19 é a ocorrência da hiperinflamação ou tempestade de citocinas (Land, 2021). Ocorre devido ao recrutamento de células imunes pelas citocinas pró-inflamatórias liberadas, o que ocasiona secreção de outras citocinas, assim como IL-6, IL-8, TNF e IL-1B, contribuindo para um acúmulo de espécies reativas de oxigênio e consequente dano tecidual, gerando um “*looping*” inflamatório, onde mais e mais citocinas e quimiocinas são liberadas (Tay, 2020).

A contínua replicação do vírus exacerba ainda mais a resposta imune, influenciando a atividade das células NK, macrófagos e neutrófilos. Isso faz com que haja uma crescente liberação de TGF- $\beta$ , o que eleva o dano e a permeabilidade tecidual, permitindo a invasão de mais células imunes, tais como os neutrófilos, levando a formação das Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs), responsáveis por aumentar o dano no tecido (Wong, 2021).

Em relação à resposta imune adaptativa, o *SARS-CoV-2* pode induzir uma resposta de células T helper 1 (Th1), por meio do aumento de sinais de transdução como o T-bet, e uma ativação precoce de macrófagos, células B, células *natural killer* e linfócitos T CD8+ que, inicialmente, ajudam a eliminar o vírus por meio da liberação de grânulos citotóxicos. Esse padrão imune é caracterizado pela produção de citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF, por exemplo (Luckheeram, 2012). No entanto, com a estimulação contínua, essa resposta pode levar a um quadro de hiperinflamação (McMahan, 2021). Quanto aos padrões de resposta Th2 (citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) e Th17 (citocinas IL-17A, IL-21 e IL-22) foram

associados a lesão pulmonar e contribuição para a síndrome respiratória aguda grave (SARS) devido à facilitação do recrutamento de neutrófilos (Neidleman, 2020). Em contraste, as células Treg são essenciais em inibir a resposta imune por meio da produção de citocinas anti-inflamatórias como TGF- $\beta$  e IL-10 (Lee, 2018).

Como mencionado anteriormente, o vírus *SARS-CoV-2* afeta notadamente o trato respiratório e pode levar o acometido à SARS (15% dos casos), a qual é uma das principais causas de morte em pacientes com COVID-19. A SARS é desencadeada, em sua maioria, pela elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, condição chamada de tempestade de citocinas (Montazersaheb, 2022).

Citocinas como IL-6, TNF, IL-6, IL-2 e IL-10 desempenham um papel significativo na patogênese da COVID-19 visto o aumento nos danos ao epitélio respiratório e a consequente lesão pulmonar (Hirano, 2020), enquanto que Liu e colaboradores (2020) mostraram que as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A dentre outras tiveram forte associação com um grave dano pulmonar.

A produção de citocinas pelas células NK é importante para o desempenho de sua função. IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF aumentam ainda mais a citotoxicidade dessas células e modulam o sistema imunológico, direcionando as respostas imunes para o fenótipo Th1 (Chalifour, 2004).

Nesse contexto, as células NK, que fazem parte da resposta imune inata e também regulam a resposta imune adaptativa (Waggoner, 2011), desempenham um papel crucial na imunovigilância contra patógenos virais (Deng, 2021), assim como na COVID-19, uma vez que desregulações dessas células foram associadas com a gravidade dessa infecção (Kramer, 2021).

### **2.1.2 Células *natural killer***

As células NK se originam de um progenitor linfóide comum e pertencem à família das Células Linfóides Inatas (ILCs). Elas desempenham uma função fundamental na defesa contra infecções virais e malignidades, atuando tanto por meio de mecanismos diretos contra antígenos quanto auxiliando na regulação das respostas imunes inata e adaptativa (Vivier, 2018). Seu desenvolvimento ocorre principalmente via estímulo da citocina IL-15, produzida por monócitos, macrófagos e células dendríticas, se ligando ao CD122, cuja função é transduzir seu sinal para o meio intracelular (Kennedy, 2000). Estudos apontam o papel de fatores de transcrição que se ligam diretamente à região promotora do gene que induz a expressão de CD122, tais como *RUNX3*, *TBX21* e *EOMES*, funcionando em diferentes

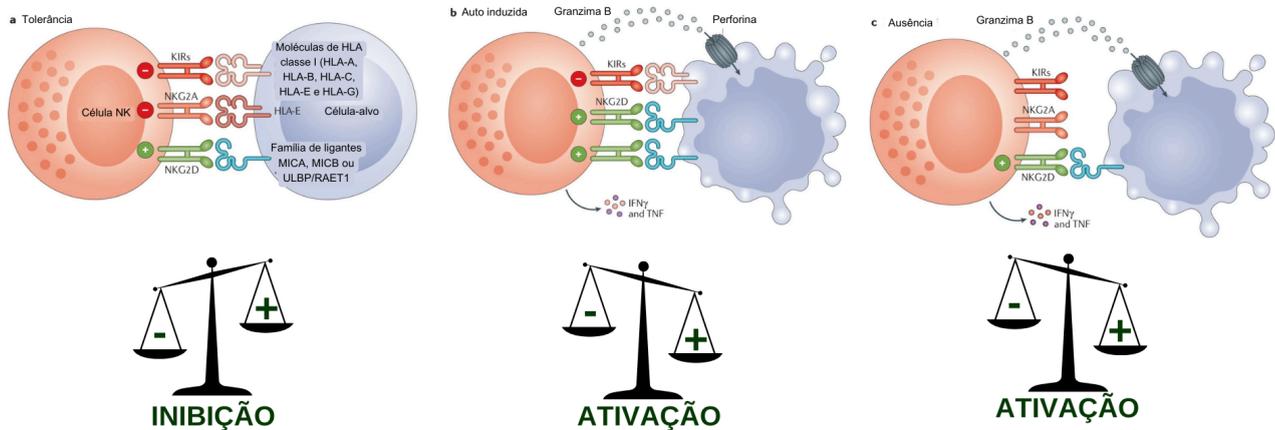
estágios do desenvolvimento das células NK (Ohno, 2008). Além disso, a quimiocina CXCL12 e o receptor de quimiocina CXCR4 são essenciais para a sua maturação e proliferação (Sugiyama, 2006).

Notadamente, essas células são marcadas pela presença da proteína de superfície *Cluster of Differentiation 56* (CD56) e pela ausência do CD3. São divididas em dois subtipos principais: CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> e CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>. O primeiro subtipo é caracterizado por apresentar uma menor citotoxicidade e uma maior capacidade de produção de citocinas, associado com funções regulatórias; já o segundo apresenta alta citotoxicidade e capacidade de induzir citotoxicidade celular mediada por anticorpo (ADCC) (Pauken, 2016; Zhao, 2018).

Células NK possuem uma grande variedade de receptores que podem induzir a ativação, inibição ou ambos. Por exemplo, membros da família 2 da proteína D (NKG2D) e receptores citotóxicos (NKp30, NKp46 e NKp44) estão envolvidos na ativação das células NK; já os membros da família 2 da proteína A (NKG2A) proteína de morte celular programada (PD-1), por exemplo, estão envolvidos na inibição dessas células (Fernández, 2019). Além disso, seu desfecho funcional será determinado pela integração e balanço entre esses receptores que ditarão características de tolerância ou ativação da citotoxicidade (Myers, 2020).

À medida em que o nível de sinais inibitórios sobressaem sobre os sinais de ativação, a ativação da célula NK é inibida, levando à tolerância da célula; em uma situação de infecção ou malignidade, essas células superexpressam ligantes dos receptores de ativação das células NK, resultando na liberação de citocinas e citotoxicidade contra a célula-alvo; e quando há uma subexpressão de ligantes do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) I de receptores inibitórios, comumente ocorrido em células tumorais, também leva à ativação das células NK (Figura 4).

**Figura 4** - Resposta das células *natural killer* por balanceamento de sinais de ativação e inibição

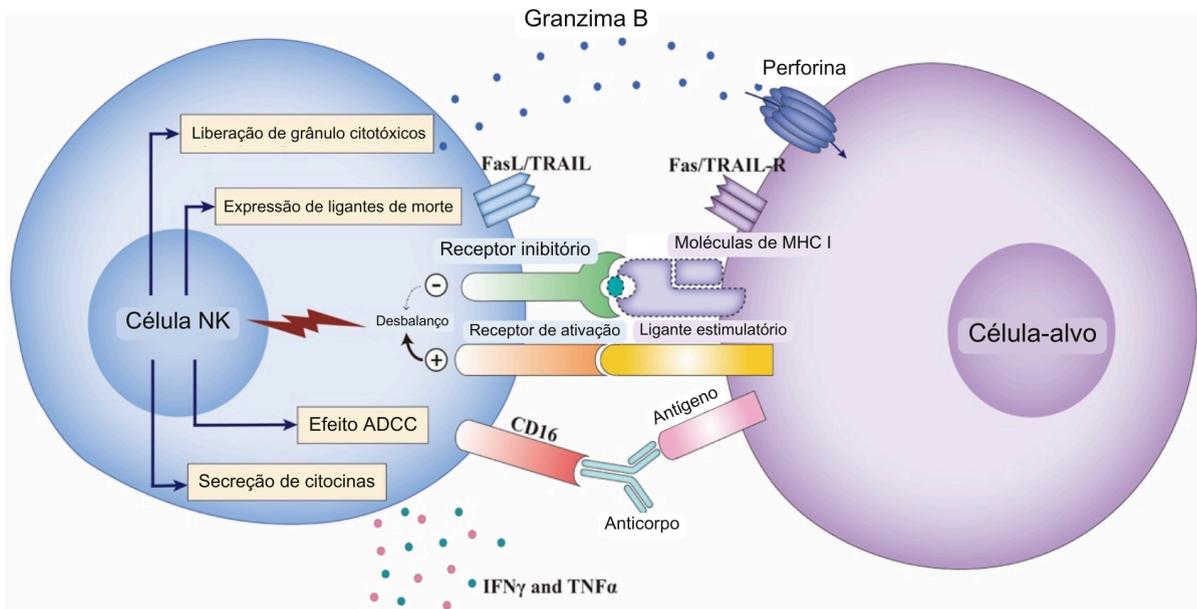


Fonte: Adaptado de Myers, 2020.

Normalmente, a presença de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC)-1 nas células inibe a atividade das células NK. No entanto, quando uma célula está infectada por um vírus, ela perde a expressão dessas moléculas, permitindo que as células NK sejam ativadas decorrentes da diminuição da frequência de sinais inibitórios (Wiertz, 1997). Além disso, as células infectadas expressam moléculas sinalizadoras que ligam-se a receptores específicos nas células NK, como os receptores de citotoxicidade natural, a citar NKp30 e NKG2D (Duev-Cohen, 2016), estimulando ainda mais a sua atividade. Outro mecanismo de ativação das células NK envolve o reconhecimento direto de moléculas virais (PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógeno) (Adib-Conquy, 2014) ou por receptores de ativação transmembrana, como o NKG2C (Herrera, 2022). Ademais, essas células podem ser ativadas por interleucinas (IL), tais como IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 e interferons do tipo 1, que podem ser produzidas pelas células virais infectadas ou pelas células apresentadoras de antígeno (Nguyen, 2002).

As células NK dispõem de vários mecanismos para destruir as células-alvo: lise direta por meio da degranulação de proteínas citotóxicas (perforina e granzima) ou por receptores de morte celular, como o FAS/FAS ligante; produção de citocinas inflamatórias, levando à eliminação indireta das células-alvo, como por meio da produção de citocinas da família do TNF; ADCC via CD16; e interagindo com outras células imunológicas, induzindo a produção de IFN- $\gamma$  (Van Eeden, 2020) (Figura 5).

**Figura 5** - Mecanismos efetores das células *Natural Killer*.



Fonte: Adaptado de Nawen, 2021

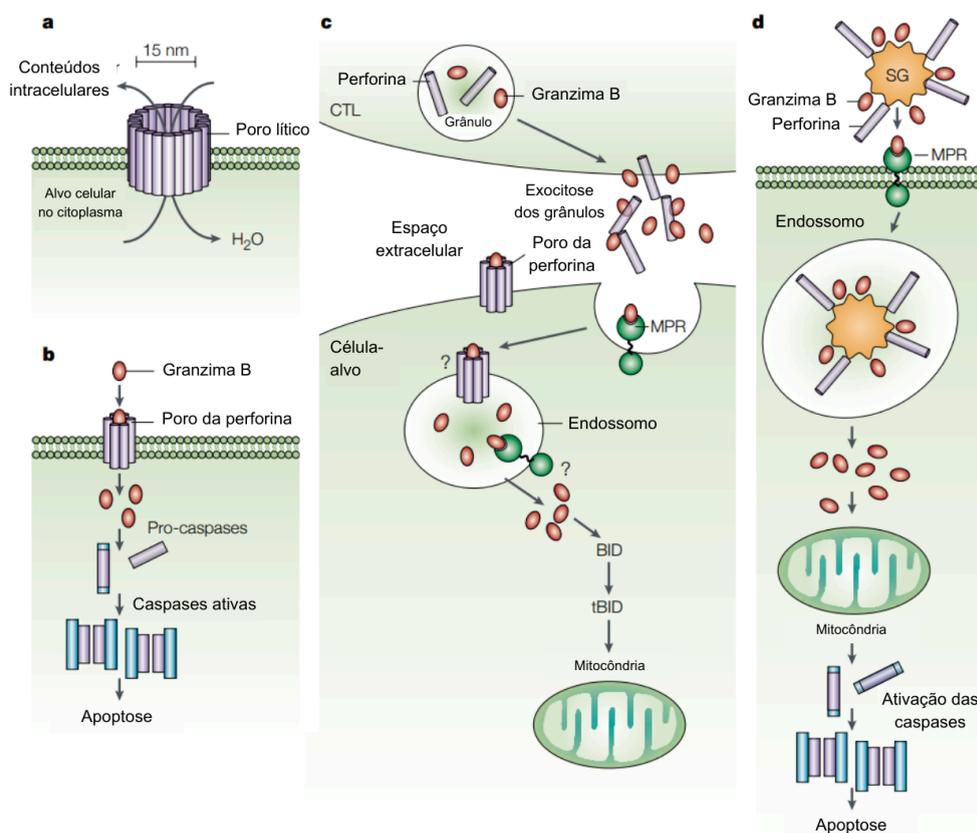
### 2.1.2.1 Resposta imune mediada por grânulos contra vírus

O principal mecanismo utilizado pelas células NK para eliminar células infectadas por vírus envolve a liberação de grânulos contendo proteínas citotóxicas (Lopes-Verges, 2011), expressando como marcador o CD107a (Aktas, 2008). Toxinas granulares citoplasmáticas - principalmente uma proteína de ruptura de membrana conhecida como perforina - e um grupo de serino-proteases (granzimas) estruturalmente relacionadas com várias especificidades de substrato são secretadas por exocitose e induzem a apoptose da célula-alvo (Smyth;Trapani, 1995).

O processo de liberação dos grânulos citotóxicos inicia-se após o reconhecimento dos peptídeos associados ao MHC na célula-alvo pelos receptores de antígenos dos linfócitos citotóxicos. Após essa ligação, os grânulos polarizam-se próximo ao local da sinapse imunológica, tendo migrado ao longo do aparato microtubular da célula. A ruptura da membrana da célula-alvo pela perforina é um requisito para o acesso das granzimas a substratos no citosol da célula-alvo, levando direta ou indiretamente à ativação das caspases (Trapani, 2012).

Há diferentes mecanismos conhecidos pelos quais a perforina pode ser capaz de levar a célula-alvo à morte celular, sendo que, na maioria deles, há a participação da granzima B (Trapani, 2002). O primeiro mecanismo conhecido (Figura 6a) destacou a perforina como sendo uma molécula lítica que destrói a célula-alvo devido a perda da homeostase da membrana plasmática, com captação excessiva de água e perda conteúdo celular; o segundo mecanismo (Figura 6b) envolve o papel das granzimas que, de forma cooperativa à perforina, se difunde passivamente para o citosol, onde podem acessar seus substratos, as caspases, levando a célula-alvo à apoptose; o terceiro mecanismo conhecido cita a capacidade das granzimas entrar nas células-alvo por endocitose sem necessariamente a atuação da perforina, mas atuando de forma sinérgica na indução da apoptose com a presença desta (Figura 6c); por fim, o mecanismo mais recente descoberto diz que o receptor de manose-6-fosfato (MPR) atuaria como um receptor de superfície para a granzima B e que, complexos macromoleculares que contenham perforina, granzimas e moléculas como a serglicina, podem ser endocitados pela célula-alvo sem necessariamente a formação significativa do poro de perforina (Figura 6d).

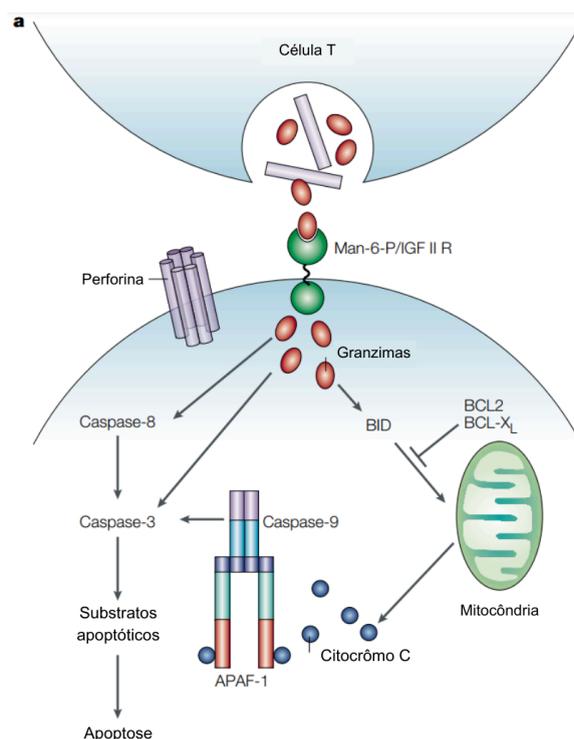
**Figura 6** - Mecanismos de morte celular direcionados pela perforina e pela granzima B.



Fonte: Adaptado de Trapani, 2002

Já no interior da célula-alvo, a granzima B induz a apoptose por meio das vias caspase-dependente e independente (Hengartner, 2000). Quanto à via dependente, a granzima B cliva as pró-caspases, ativando-as. Assim, elas agora são capazes de clivar uma série de proteínas que irão levar à fragmentação do DNA e consequente apoptose da célula-alvo. Já na via independente, as granzimas ativam o BID, membro pró-apoptótico da família BCL2, que leva à liberação do citocromo C das mitocôndrias, fazendo com que haja a formação de um complexo de alto peso molecular constituído pelo citocromo, APAF-1 e caspase-9, cuja função é ativar caspases que também levarão à fragmentação do DNA e apoptose (Stassi; De Maria, 2002) (Figura 7).

**Figura 7** - Indução da apoptose via caspase-dependente e independente, mediada pela granzima B.



Fonte: Adaptado de Stassi, 2002

Quanto ao papel da perforina na resposta imune do hospedeiro contra vírus com tropismo pelo sistema respiratório, esta proteína é conhecida como um componente importante da resposta imune humana a infecções virais respiratórias. Em camundongos nocaute para a perforina, foi observado que os animais não foram capazes de se defender

contra os vírus (Voskoboinik, 2018). Liu e colaboradores (2003) também demonstraram que camundongos nocaute para o gene *PRFI* infectados pelo vírus da gripe eram mais suscetíveis à infecção, evidenciando o importante papel dessa proteína na indução da morte de células infectadas. As granzimas também exibem um papel muito importante no combate às infecções virais, como observado na infecção pelo vírus Influenza, na qual os linfócitos citotóxicos com especificidade para o vírus regulam positivamente a expressão da granzima, que interfere na replicação viral por meio da clivagem de proteínas importantes nesse processo (Jenkins, 2008).

#### 2.1.2.2 Células *natural killer* em pacientes com COVID-19

As células NK mostram-se importantes na defesa antiviral contra o *SARS-CoV-2*, expressando marcadores de ativação (HLA-DR, CD69 e CD38) e moléculas inibitórias (TIM3 e PD-1) (Bjorkstrom, 2022). A redução da contagem de células NK no sangue periférico poderia ser devida à mobilização dessas células para os tecidos infectados ou por causa de sua morte procedente da ativação pelo *SARS-CoV-2* (Khawar, 2021).

Deficiências associadas ao interferon do tipo 1 (Hadjadj, 2020) ou elevados níveis de IL-6, podem causar uma hiperinflamação o que resulta numa deficiência das células NK (Kramer, 2021). Em relação às citocinas secretadas pelas NK, foi visto que na COVID-19 elas estão reduzidas, diminuindo sua funcionalidade perante as células infectadas (Zheng, 2020). Isso pode ser devido a fatores solúveis presentes no plasma de indivíduos infectados que ocasionam essa produção defeituosa (Bi, 2022). A exposição prolongada das células NK a altos níveis de IL-15 circulantes em pacientes com COVID-19 também pode levar a uma disfunção dessas células (Liu, 2021). Além disso, estudos indicam que o marcador de degranulação dos linfócitos, o CD107a, aparece diminuído e correlacionado negativamente com a proteína-C-reativa, indicativo de serem disfuncionais em condições de inflamação sistêmica (Varchetta, 2020).

Aumentos ou diminuições na expressão de perforina e granzima, provavelmente terão impacto na resistência ou suscetibilidade à infecção grave por COVID-19 (Cunningham, 2021). Os dados da literatura ainda são conflitantes em relação à alteração na expressão dessas proteínas, o que pode ser causado pela diferença no período de amostragem durante o curso da doença e sua gravidade (Petrov, 2024). Além da alteração na expressão dessas proteínas, também deve ser dada uma atenção especial aos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs).

Os SNPs podem influenciar a regulação gênica, a estrutura, estabilidade e expressão de RNAs ou proteínas e a conformação e função de proteínas. O polimorfismo A91V (rs35947132) compromete a função da perforina e reduz em pelo menos 35% o potencial citotóxico das células efectoras (Schulert, 2016).

Hipóteses sobre a relação entre o polimorfismo A91V e a COVID-19 já foram levantadas. Em estudo conduzido por Cabrera-Marante e colaboradores (2020), foram avaliados vinte e dois pacientes sem histórico de comorbidades, com idades entre 24 e 52 anos, internados em terapia intensiva devido à infecção por COVID-19, os quais foram testados para o polimorfismo A91V do gene da perforina. Dentre esses pacientes, dois apresentaram a variante A91V em homozigose e ambos faleceram, enquanto apenas um dos pacientes sem essa variante também foi a óbito. Entretanto, a amostra estudada é insuficiente para permitir qualquer conclusão robusta.

Sabendo da importância das granzimas na indução da morte celular, variantes nos genes que a codificam poderiam contribuir para uma resposta imune deficiente. Oboshi e colaboradores (2018) avaliaram a citotoxicidade das células *natural killer* frente a células K562 e viram que aquelas portadoras da variação genética Q48R (rs8192917) apresentaram menor citotoxicidade comparados com aqueles sem mutação.

Essa desregulação nas células NK resulta não só na falha em eliminar células infectadas, mas também impacta na interação com outras células do sistema imunológico (Molgora, 2018). Isso permite a persistente replicação e disseminação do vírus, levando ao recrutamento acelerado de monócitos e granulócitos, resultando em uma alta estimulação da imunidade, levando a uma produção aumentada de citocinas inflamatórias, que contribuem para a formação da tempestade de citocinas, um dos principais fatores que podem levar a COVID-19 até sua forma grave (Schultze, 2021).

A investigação de fatores que possam agir modificando as células efectoras, bem como o detalhamento do processo de produção e ativação destas células, são estratégias úteis que podem auxiliar na compreensão dos mecanismos imunológicos de resposta ao *SARS-CoV-2* e na influência de fatores genéticos envolvidos na patobiologia da COVID-19. Assim, este estudo buscou avaliar o papel de genes importantes para a resposta imune antiviral e também o impacto do estímulo do plasma de pacientes infectados pelo *SARS-CoV-2* em células de indivíduos saudáveis.

## 2.2 OBJETIVOS

### 2.2.1 Objetivo geral

Avaliar a associação entre os fatores envolvidos no desenvolvimento e ativação das células *natural killer*, bem como de seus mecanismos efetores, com o desfecho e gravidade em amostras de indivíduos com COVID-19.

### 2.2.2 Objetivos específicos

- Investigar a presença das variantes genéticas A91V (rs35947132), no gene *PRF1*, e Q48R (rs8192917) no gene *GZMB*, em pacientes com COVID-19;
- Quantificar a expressão dos genes *PRF1*, *GZMB*, *IL15*, *RUNX3*, *TBX21*, *EOMES* e *IFNG* em pacientes com COVID-19;
- Quantificar a produção de perforina e granzima B nas células citotóxicas de pacientes com COVID-19 após estímulo com o plasma de indivíduos infectados com COVID-19;
- Quantificar a expressão dos genes *PRF1*, *GZMB*, *IL15*, *RUNX3*, *TBX21*, *EOMES* e *IFNG* após estímulo com o plasma de indivíduos infectados com COVID-19;
- Quantificar as citocinas IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 em pacientes com COVID-19;
- Associar os dados de expressão gênica, variantes genéticas, expressão de marcadores e dosagem de citocinas e compará-los com o desfecho e a gravidade de indivíduos com COVID-19.

### **3 HIPÓTESE**

Os fatores envolvidos no desenvolvimento e ativação das células *natural killer*, bem como de seus mecanismos efetores, estarão alterados em amostras de pacientes com COVID-19 grave e/ou que foram a óbito.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CASUÍSTICA

Foi realizado um cálculo amostral para determinar um número mínimo representativo para a pesquisa. Considerando que foram atendidos 655 pacientes em período determinado e utilizando-se de um grau de confiança de 95% e margem de erro de 5%, obteve-se um número de 243 indivíduos. Contudo, devido a intercorrências na coleta, em procedimentos e/ou em técnicas, este estudo foi capaz de incluir 140 pacientes. Assim, este estudo incluiu amostras de sangue de 140 indivíduos diagnosticados com COVID-19, de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Ministério da Saúde brasileiro, atendidos em hospitais da cidade de Uberaba, Minas Gerais, Brasil, cujo período de coleta das amostras ocorreu de maio de 2020 até junho de 2021.

Dos indivíduos, 56% eram do sexo masculino, com mediana de idade de 63 anos (26-100 anos). Os 140 pacientes foram classificados, quanto à gravidade, naqueles considerados leves que procuraram o serviço hospitalar ou moderados (61 pacientes) e graves (79 pacientes) e também foram caracterizados quanto ao desfecho em alta (69) e óbito (71), quanto a presença (96) ou não (44) de comorbidades, idade e sexo. A gravidade foi definida segundo os seguintes critérios preconizados pela OMS (2021): leve - sinais clínicos de síndrome gripal, como febre, tosse, dor de garganta, dispneia, frequência respiratória entre 20 e 30, saturação de oxigênio  $\geq 90\%$  ou grave - sinais clínicos de pneumonia, como febre, tosse, dispneia, taquipneia (maior que 30 rpm), saturação de oxigênio  $< 90\%$ , ventilação mecânica, complicações pulmonares e óbito. Pacientes com menos de 18 anos, com imunodeficiências, doenças autoimunes ou neoplasias foram excluídos do estudo.

As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos de coleta estéril com EDTA, após assinatura do TCLE pelo paciente ou responsável. Dados clínicos e laboratoriais foram obtidos por meio de levantamento dos prontuários médicos. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (protocolo: CAAE: 31328220.8.0000.8667).

### 4.2 EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM

A genotipagem do polimorfismo A91V (rs35947132), do gene *PRF1*, e do polimorfismo Q48R (rs8192917) do gene *GZMB*, foi realizada por meio da técnica de discriminação alélica por PCR em tempo real. A escolha dos polimorfismos foi baseada na estratégia do gene candidato, em que estudos anteriores destacavam suas alterações

associadas a condições patológicas, muitas vezes relacionadas com a tempestade de citocinas, fator de risco para a COVID-19 grave. Além disso, esses polimorfismos já foram relatados como capazes de alterar a estrutura da proteína e, potencialmente, alterar sua função.

Para isso, o DNA genômico dos pacientes foi obtido a partir da camada leucoplaquetária, após centrifugação do sangue total, utilizando-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA, EUA), segundo as recomendações do fabricante. As sondas e os iniciadores utilizados na genotipagem foram confeccionados pela Applied Biosystems (ABI, EUA), cujos IDs dos ensaios são: C\_1799201\_10; C\_25600964\_20; C\_2815152\_20). A discriminação alélica foi feita utilizando o kit TaqMan™ Genotyping Master Mix, conforme orientação do fabricante, utilizando o equipamento 7500 Real Time PCR System (AppliedBiosystems™, EUA).

#### 4.3 EXTRAÇÃO DE RNA E EXPRESSÃO GÊNICA

O RNA dos pacientes foi obtido a partir da camada leucoplaquetária, após centrifugação do sangue total, utilizando-se o kit SV Total RNA Isolation System (PROMEGA, EUA), segundo as recomendações do fabricante. Para a obtenção do cDNA foi realizada a reação de transcrição reversa com kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, EUA), também seguindo as recomendações do fabricante.

A quantificação relativa dos genes *PRF1* (perforina), *GZMB* (granzima B), *EOMES* (eomesodermina), *IL15* (interleucina-15), *RUNX3*, *TBX21* (T-bet) e *IFNG* (*IFN-γ*) foi avaliada por PCR em tempo real, com o kit Gotaq® qPCR Master Mix (PROMEGA), no equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems™). O gene de referência *ACTB* foi utilizado como controle endógeno e os ensaios contendo primers e sondas específicas para cada gene foram confeccionados pela Applied Biosystems (ABI, EUA) (ID dos ensaios: *PRF1* (Hs00169473\_ml), *GZMB* (Hs01554355\_ml), *TBX21* (Hs00203436), *IL15* (Hs01003716\_ml), *RUNX3* (Hs01091094\_ml), *EOMES* (Hs00172872), *IFNG* (Hs00989291\_ml) e *ACTB* (Hs99999903\_ml)). A quantificação relativa dos genes foi realizada pelo método  $2^{-\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

#### 4.4 ANÁLISES FUNCIONAIS DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER*

Foram coletadas amostras de sangue periférico de 12 indivíduos saudáveis, com sexos e idades pareadas (média=35 anos  $\pm$ 6), das quais foram separadas as células mononucleares do sangue periférico por centrifugação em gradiente de concentração com Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Posteriormente, as células foram incubadas em

diferentes condições, sendo em um *pool* de plasma de seis pacientes com COVID-19 grave que foram a óbito, em um *pool* de plasma de seis indivíduos saudáveis e em uma solução salina (0,9%), a qual foi submetida aos mesmos procedimentos, exceto exposição ao plasma, ambas em diluição 1:20. Estas células foram mantidas em cultura por 72 horas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino em incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C. Todos os tratamentos foram realizados em triplicatas.

Foram analisadas a expressão da perforina, em suas formas total e ativa, e da granzima B, em células mononucleadas CD56<sup>+</sup> e em células CD8<sup>+</sup> por citometria de fluxo. Foram utilizados os anticorpos anti-CD3 APC, anti-CD56 PE-Cy7, anti-granzima B FITC, anti-perforina clone DG9 PE, anti-perforina total/ clone B-D48 PerCP e anti-CD8 PE-Cy5. As células NK foram identificadas como CD3-CD56<sup>+</sup> e os linfócitos citotóxicos como CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>.

A quantificação de citocinas também foi determinada pela citometria de fluxo usando a técnica CBA (*Cytometric Bead Array*) utilizando o kit *Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (BD Biosciences™), segundo as orientações do fabricante. O kit foi utilizado para quantificar, no sobrenadante das células em cultura, as concentrações de IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 das quais foram determinadas baseadas em uma curva padrão. As amostras foram processadas segundo as instruções do fabricante.

As amostras foram adquiridas e analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto II™, por meio do software Diva 6.0 (BD Biosciences™).

#### 4.5 ANÁLISE DE DADOS

As variáveis contínuas foram descritas por média  $\pm$  desvio padrão e pelas medianas, e as variáveis categóricas através de porcentagem. Os dados quantitativos foram submetidos aos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk e as comparações estatísticas entre dois grupos realizadas com emprego do teste de t Student (para dados paramétricos) ou Mann-Whitney ou Wilcoxon (para dados não paramétricos). Para análises com mais de dois grupos, foi utilizado o teste ANOVA one-way com pós-teste de Tukey, para dados paramétricos, ou o teste de Friedman com pós-teste de Dunn, para dados não-paramétricos. Para variáveis qualitativas, as comparações estatísticas foram realizadas através do teste de Qui-Quadrado. A associação das frequências genótípicas dos polimorfismos avaliados e o risco e/ou gravidade para o desenvolvimento da COVID-19 foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher ou o qui-quadrado. As análises foram

consideradas estatisticamente significantes quando o valor de  $p$  foi menor que 0,05, para análises entre dois grupos, e significantes quando  $p < 0,01$  em análises com mais de três grupos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 POLIMORFISMOS NOS GENES *PRF1* E *GZMB*

A análise dos polimorfismos dos genes *PRF1* e *GZMB* mostrou não haver associação entre desfecho ou gravidade, indicando que essas variantes parecem não influenciar diretamente esses parâmetros (Tabela 1).

A Tabela 1 mostra que a maior parte das amostras para o polimorfismo A91V era homocigoto CC em ambos os grupos quanto ao desfecho e gravidade. O genótipo AA do polimorfismo Q48R do gene *GZMB* foram os mais prevalentes em todos os grupos.

Já em relação a frequência alélica, o alelo selvagem foi o mais frequente nos polimorfismos A91V e Q48R em todos os grupos analisados (Tabela 1).

**Tabela 1** - Genotipagem dos genes *PRF1* e *GZMB* quanto ao desfecho e quanto à gravidade

Polimorfismo	Grave n(%)	Leve n(%)	Valor p	Alta n(%)	Óbito n(%)	Valor p
A91V						
CC	60 (86,9)	49 (90,7)	0,326	53 (88,3)	56 (88,8)	0,580
CT	9 (13,0)	4 (7,4)		6 (10,0)	7 (11,1)	
TT	0	1 (1,8)		1 (1,6)	0	
Q48R						
GG	6 (9,2)	7 (14,0)	0,664	7 (12,5)	6 (10,2)	0,810
GA	23 (35,4)	15 (30,0)		17 (30,4)	21 (35,6)	
AA	36 (55,4)	28 (56,0)		32 (57,1)	32 (54,2)	
<b>Frequência Alélica</b>						
A91V						
C	129 (93,5)	102 (92,10)	0,753	112 (93,3)	119 (94,4)	0,715
T	9 (6,5)	6 (7,89)		8 (6,7)	7 (5,6)	
Q48R						
G	35 (27,0)	29 (29,0)	0,727	31 (27,7)	33 (28,0)	0,961
A	95 (73,1)	71 (71,0)		81 (72,3)	85 (72,0)	

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

## 5.2 EXPRESSÃO GÊNICA DE *PRF1*, *GZMB*, *TBX21*, *EOMES*, *RUNX3*, *IL15* E *IFNG*

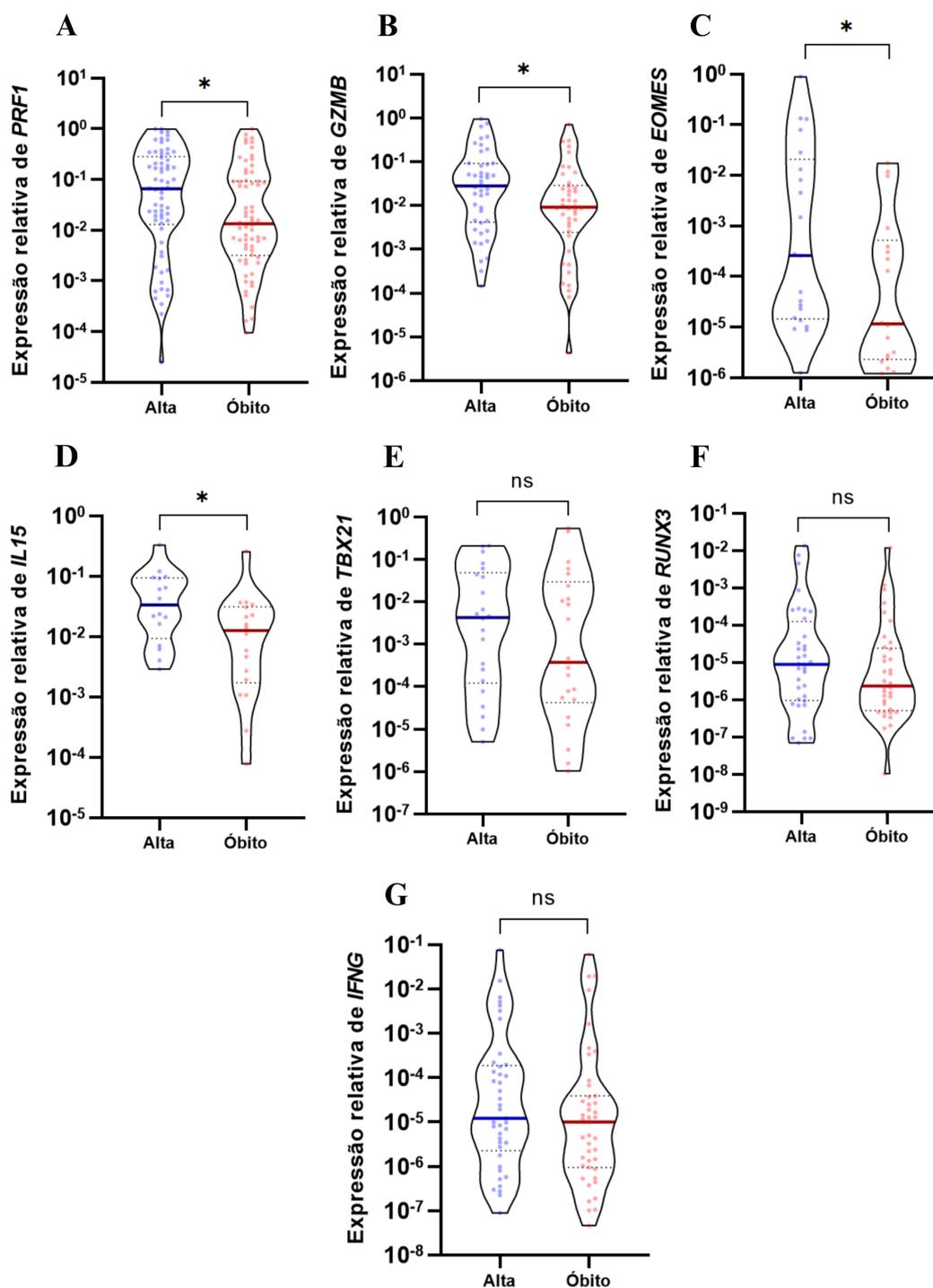
Para avaliar se alterações na expressão relativa de genes relacionados com as células NK estavam associadas com o desfecho ou gravidade em indivíduos com COVID-19, foi realizada a quantificação por qPCR.

Em relação aos genes relacionados com os mecanismos efetores das células NK, os resultados obtidos mostraram que pacientes que receberam alta expressaram mais os genes *PRF1* ( $p=0,01$ ) e *GZMB* ( $p=0,04$ ) do que aqueles que foram a óbito (Figura 8).

Quanto aos genes que codificam fatores de transcrição importantes para o desenvolvimento e maturação das células, os resultados mostraram que pacientes que receberam alta expressaram mais o gene *EOMES* ( $p=0,04$ ) do que indivíduos que foram a óbito, o que não foi observado para *TBX21* ( $p=0,42$ ) e *RUNX3* ( $p=0,23$ ) (Figura 8).

Por fim, considerando aqueles responsáveis por codificar citocinas, indivíduos que receberam alta tiveram uma maior expressão do gene *IL15* ( $p=0,01$ ) do que aqueles que foram a óbito, mas isso não foi observado em relação ao gene *IFNG* ( $p=0,27$ ) (Figura 8).

**Figura 8** - Expressão relativa de genes quanto ao desfecho de indivíduos com COVID-19



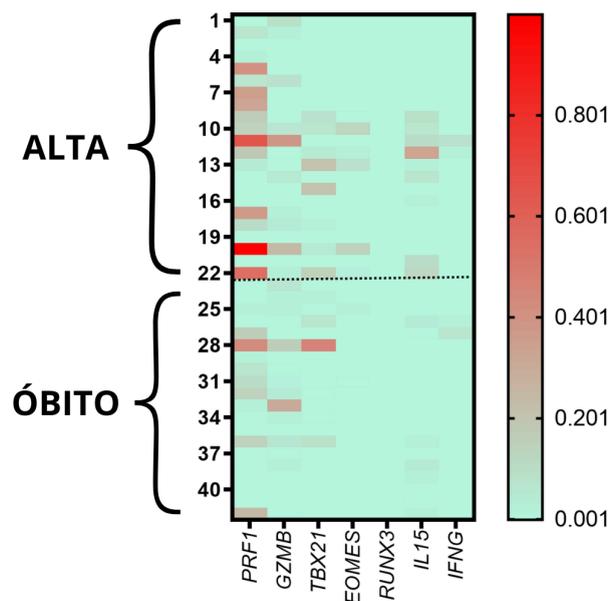
Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software *GraphPad Prism 8*, 2024

Nota<sup>1</sup>: A - Expressão relativa do gene *PRF1* (n=140) (Teste Mann-Whitney: p=0,01); B - Expressão relativa do gene *GZMB* (n=88) (Teste Mann-Whitney: p=0,04); C - Expressão relativa do gene *EOMES* (n=48) (Teste Mann-Whitney: p=0,04); D - Expressão relativa do gene *IL15* (n=34) (Teste Mann-Whitney: p=0,01); E - Expressão relativa do gene *TBX21* (n=48) (Teste Mann-Whitney: p=0,42); F - Expressão relativa do gene *RUNX3* (n=73) (Teste Mann-Whitney: p=0,23); G - Expressão relativa do gene *IFNG* (n=84) (Teste Mann-Whitney: p=0,27).

Nota<sup>2</sup>: A linha central contínua representa os valores de mediana; as linhas pontilhadas acima e abaixo da linha central representam os intervalos interquartil; \* - p<0,05; ns - sem diferença significativa.

Com o objetivo de sumarizar o resultado da expressão relativa dos sete genes analisados, foi construído um gráfico do tipo mapa de calor (*HeatMap*) para uma diferenciação visual da expressão dos genes divididos entre os grupos “alta” e “óbito”, em que se percebe a maior expressão dos genes por indivíduos com melhor prognóstico (Figura 9).

**Figura 9** - Mapa de calor da expressão relativa dos genes analisados quanto ao desfecho.



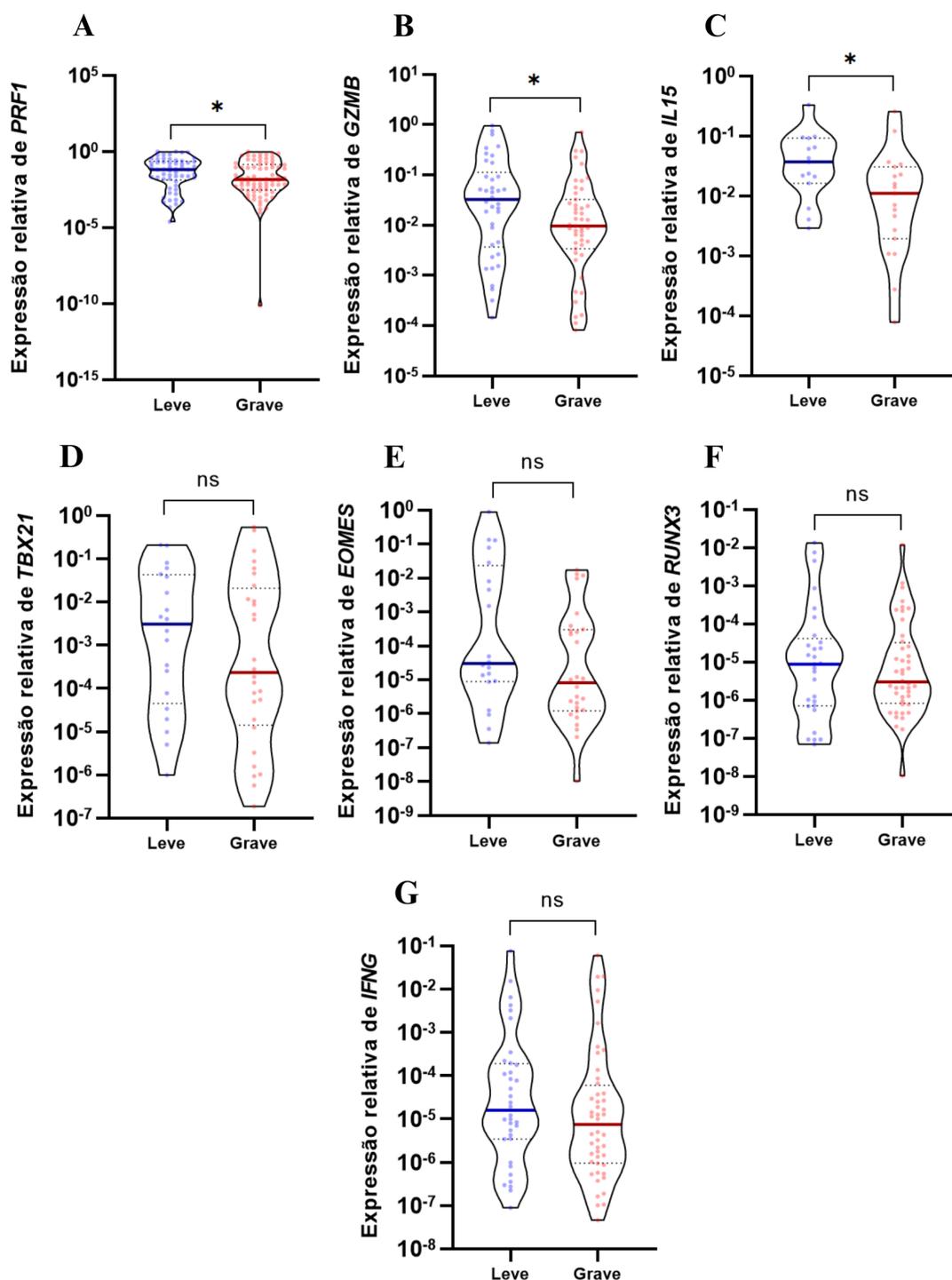
Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software GraphPad Prism 8, 2024*

Nota<sup>1</sup>: No eixo horizontal estão nomeados os genes investigados e no eixo vertical, os indivíduos considerados para a análise, sendo que do 1 ao 22 são indivíduos que receberam alta e do 23 ao 42, indivíduos que foram a óbito

Nota<sup>2</sup>: As amostras consideradas no *heatmap* levaram em conta apenas aquelas em que foi observada amplificação para todos os genes sob análise para fins de comparação.

Já em relação à gravidade, os resultados mostraram que pacientes com quadro clínico de maior gravidade apresentaram menor expressão dos genes que codificam proteínas efetoras, sendo *PRF1* ( $p=0,04$ ) e *GZMB* ( $p=0,04$ ), do que aqueles com quadro mais leve. Quanto aos genes que codificam fatores de transcrição, não foram observadas diferenças significativas: *TBX21* ( $p=0,42$ ), *EOMES* ( $p=0,10$ ), *RUNX3* ( $p=0,75$ ). Por fim, considerando aqueles responsáveis por codificar citocinas, indivíduos com um quadro mais grave expressaram menos *IL15* ( $p=0,02$ ) comparados àqueles com um quadro mais grave, o que não foi visto para *IFNG* ( $p=0,26$ ) (Figura 10).

**Figura 10** - Expressão relativa do genes quanto a gravidade de indivíduos com COVID-19



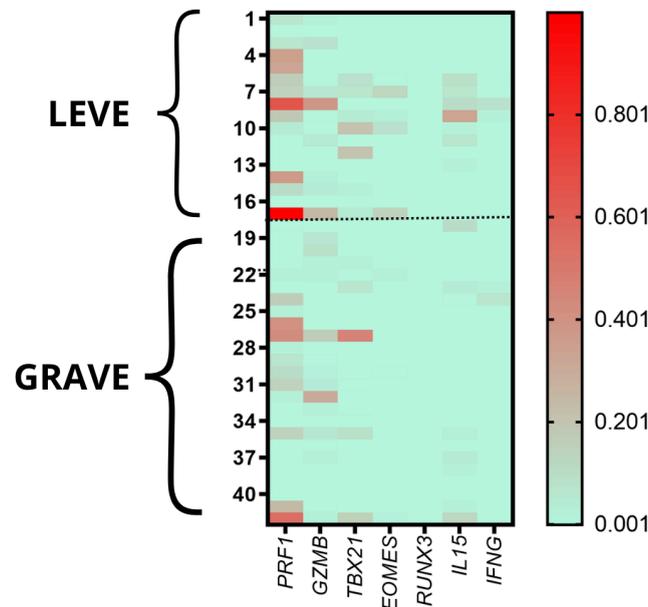
Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software *GraphPad Prism 8*, 2024

Nota<sup>1</sup>: A - Expressão relativa do gene *PRF1* (n=140) (Teste Mann-Whitney: p=0,04); B - Expressão relativa do gene *GZMB* (n=88) (Teste Mann-Whitney: p=0,04); C - Expressão relativa do gene *IL15* (n=34) (Teste Mann-Whitney: p=0,02); D - Expressão relativa do gene *TBX21* (n=48) (Teste Mann-Whitney: p=0,42); E - Expressão relativa do gene *EOMES* (n=48) (Teste Mann-Whitney: p=0,10); F - Expressão relativa do gene *RUNX3* (n=73) (Teste Mann-Whitney: p=0,75); G - Expressão relativa do gene *IFNG* (n=84) (Teste Mann-Whitney: p=0,26).

Nota<sup>2</sup>: A linha central contínua representa os valores de mediana; as linhas pontilhadas acima e abaixo da linha central representam os intervalos interquartil; \* - p<0,05; ns - sem diferença significativa.

Um mapa de calor também foi construído em relação à gravidade dos indivíduos com COVID-19, sendo divididos naqueles considerados com o quadro leve ou moderado e grave (Figura 11).

**Figura 11** - Mapa de calor da expressão relativa dos genes analisados quanto à gravidade



Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software GraphPad Prism 8*, 2024

Nota<sup>1</sup>: No eixo horizontal estão nomeados os genes investigados e no eixo vertical, os indivíduos considerados para a análise, sendo que do 1 ao 18 são indivíduos com o quadro leve e do 19 ao 42, indivíduos com um pior quadro.

Nota<sup>2</sup>: As amostras consideradas no *heatmap* levaram em conta apenas aquelas em que foi observada amplificação para todos os genes sob análise para fins de comparação.

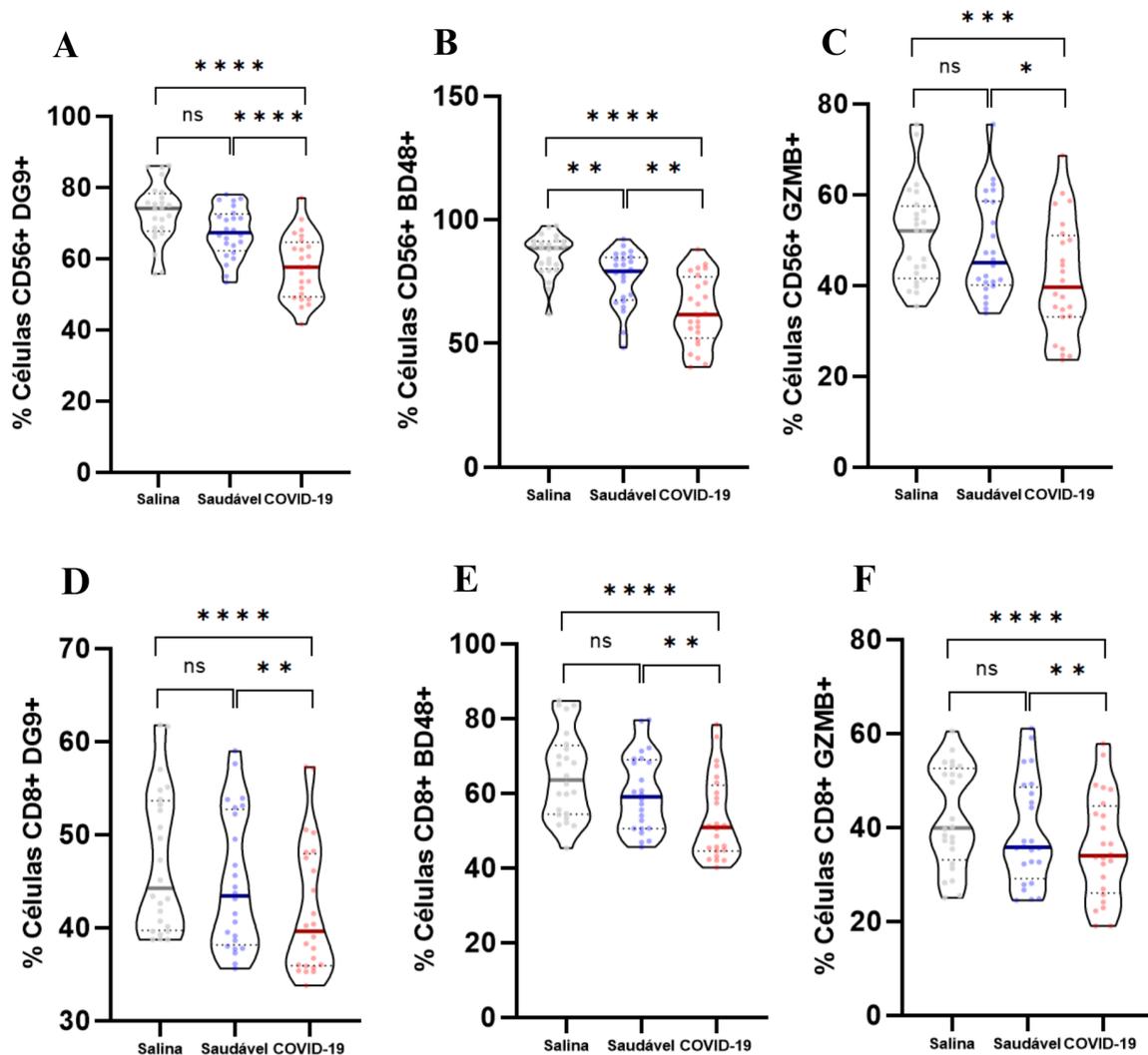
### 5.3 EFEITO IMUNOMODULATÓRIO DO PLASMA DE PACIENTES COM COVID-19

Buscando investigar se haveria algum componente presente no plasma de indivíduos infectados pelo *SARS-CoV-2*, potencialmente induzidos por este, que levaria a um cenário imunorregulador sobre a resposta contra o vírus, foi realizada uma incubação de células saudáveis com o plasma de indivíduos infectados.

Ao avaliar o efeito na produção de proteínas citotóxicas de células saudáveis após o contato com o plasma de pacientes com COVID-19, observou-se uma diminuição significativa tanto na quantidade de perforina ativa ( $p=0,001$ ) quanto de perforina total ( $p<0,0001$ ) em células NK incubadas com o plasma de pacientes com COVID-19. Além disso, a porcentagem de granzima B também foi inferior naquelas células submetidas à cultura com o plasma de indivíduos infectados ( $p<0,0001$ ) (Figura 12).

Buscando avaliar se os linfócitos T CD8+ reagiriam de forma semelhante ao estímulo, também foi analisado o efeito do plasma na produção de proteínas citotóxicas, o que foi observado: observou-se uma diminuição significativa tanto na quantidade de perforina ativa ( $p=0,001$ ) quanto na de perforina total ( $p<0,001$ ) em células TCD8+ incubadas com o plasma de pacientes com COVID-19. Além disso, a porcentagem de granzima B também foi inferior naquelas células submetidas à cultura com o plasma de indivíduos infectados ( $p<0,001$ ) (Figura 12).

**Figura 12** - Quantificação intracelular de proteínas citotóxicas em células *natural killer* e em células T citotóxicas



Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software GraphPad Prism 8*, 2024

Nota<sup>1</sup>: A - Porcentagem de células NK expressando perforina ativa (teste ANOVA de medidas repetidas:  $p < 0,0001$ ); B - Porcentagem de células NK expressando perforina total (teste ANOVA de medidas repetidas:  $p < 0,0001$ ); C - Porcentagem de células NK expressando granzima B (teste ANOVA de medidas repetidas:  $p = 0,0001$ ); D - Porcentagem de linfócitos TCD8+ expressando perforina ativa (teste ANOVA:  $p < 0,0001$ ); E - Porcentagem de linfócitos TCD8+ expressando perforina total (teste ANOVA de medidas repetidas:  $p < 0,0001$ ); F - Porcentagem de linfócitos TCD8+ expressando granzima B (teste ANOVA de medidas repetidas:  $p < 0,0001$ ).

Nota<sup>2</sup>: CD56+: marcação para células *natural killer*; DG9+: marcação para perforina ativa; B-D48+: marcação para perforina total; GZMB+: marcação para granzima B; CD8+: marcação para linfócito citotóxico; \* -  $p < 0,01$ , \*\* -  $p < 0,001$ ; \*\*\* -  $p < 0,0001$ ; \*\*\*\* -  $p < 0,00001$ ; ns - sem diferença significativa.

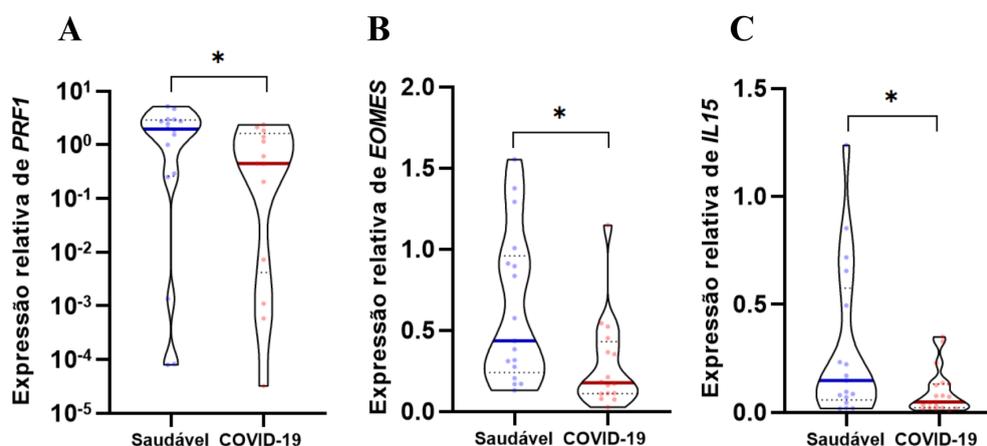
Nota<sup>3</sup>: As porcentagens das marcações foram obtidas referentes às PBMCs totais.

Nota<sup>4</sup>: N amostral = 12

Na avaliação da influência do contato de células mononucleares de indivíduos saudáveis com o plasma de indivíduos infectados e a expressão dos genes, os resultados mostraram que as células dos indivíduos que entraram em contato com o plasma de pessoas

infectadas pelo *SARS-CoV-2* apresentaram menor expressão dos genes *PRF1* ( $p=0,03$ ), *EOMES* ( $p=0,01$ ) e *IL15* ( $p=0,03$ ) quando comparada com a expressão nas células em contato com o plasma de pessoas saudáveis (Figura 13).

**Figura 13** - Expressão relativa do genes *PRF1*, *EOMES* e *IL15* em células mononucleares após contato com o plasma de indivíduos saudáveis e após contato com o plasma de indivíduos contaminados pelo *SARS-CoV-2*



Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software *GraphPad Prism 8*, 2024

Nota<sup>1</sup>: A - Expressão relativa do gene *PRF1* (Teste Wilcoxon:  $p=0,03$ ); B - Expressão relativa do gene *EOMES* (Teste Wilcoxon:  $p=0,01$ ); C - Expressão relativa do gene *IL15* (Teste Wilcoxon:  $p=0,03$ )

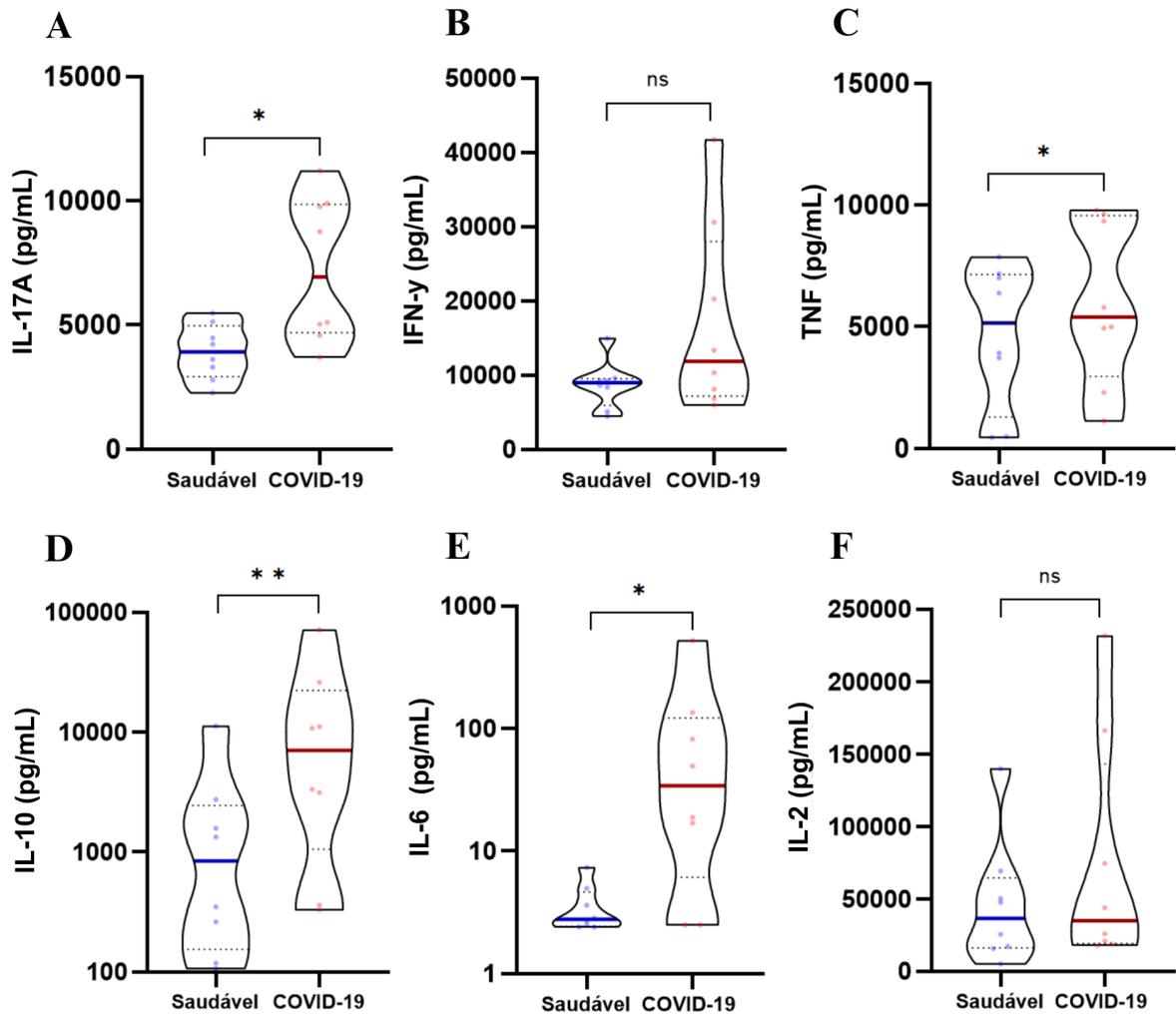
Nota<sup>2</sup>: A linha central contínua representa os valores de mediana; as linhas pontilhadas acima e abaixo da linha central representam os intervalos interquartil; \* -  $p<0,05$ .

Nota<sup>3</sup>: N amostral = 12

Nota<sup>4</sup>: The genes *GZMB*, *TBX21*, *RUNX3*, and *IFNG* did not show statistical significance.

Também foi analisada a quantidade das citocinas IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 produzidas após a cultura com o plasma de pacientes saudáveis e com o plasma de pacientes infectados pelo *SARS-CoV-2*. Foi observada maior produção das citocinas IL-17A ( $p=0,01$ ), TNF ( $p=0,03$ ), IL-10 ( $p=0,007$ ) e IL-6 ( $p=0,03$ ) pelas células em contato com o plasma de indivíduos infectados, enquanto que para IFN- $\gamma$  ( $p=0,22$ ) e IL-2 ( $p=0,2$ ), não foram encontradas diferenças significativas (Figura 14).

**Figura 14** - Quantificação da produção das citocinas



Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software GraphPad Prism 8*, 2024

Nota<sup>1</sup>: A - Quantificação da citocina IL-17A (Teste t pareado:  $p=0,01$ ); B - Quantificação da citocina IFN- $\gamma$  (Teste t pareado:  $p=0,1$ ); C - Quantificação da citocina TNF (teste t pareado:  $p=0,02$ ); D - Quantificação da citocina IL-10 (Teste Wilcoxon:  $p=0,007$ ); E - Quantificação da citocina IL-6 (Teste Wilcoxon:  $p=0,03$ ); F - Quantificação da citocina IL-2 (Teste Wilcoxon:  $p=0,2$ );

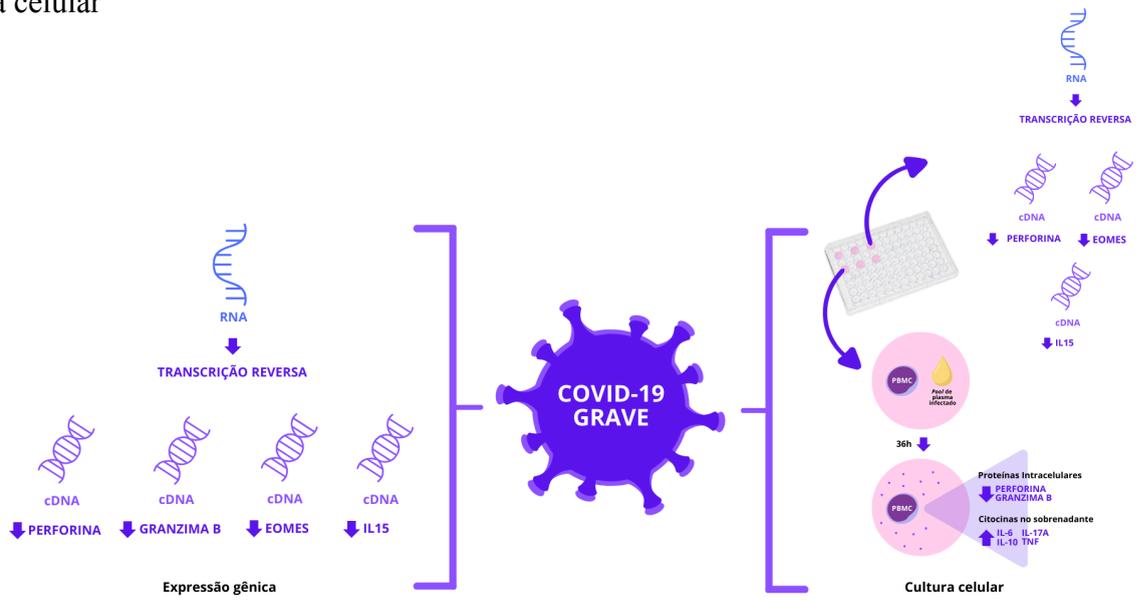
Nota<sup>2</sup>: A citocina IL-4 apresentou detecção irrisória ou não apresentou detecção;

Nota<sup>3</sup>: A linha central contínua representa os valores de mediana; as linhas pontilhadas acima e abaixo da linha central representam os intervalos interquartil; \* -  $p<0,05$ ; \*\* -  $p<0,01$ ; ns - sem diferença significativa.

Nota<sup>4</sup>: N amostral = 12

Os principais achados deste estudo foram esquematizados na figura 15:

**Figura 15** - Principais achados do estudo, considerando os ensaios de expressão gênica e de cultura celular



Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software Canva*, 2024

## 6 DISCUSSÃO

A função dos linfócitos citotóxicos no combate às infecções virais é amplamente reconhecida, destacando-se o papel crucial de suas proteínas citotóxicas, como perforina e granzima B, que são secretadas em resposta às células infectadas (Cunningham, 2021). Portanto, diminuições ou alterações na estrutura dessas proteínas podem estar associadas a um aumento na gravidade dos quadros clínicos em pacientes afetados por diversas doenças, incluindo a COVID-19, que é o foco deste estudo.

Não foram observadas diferenças em relação aos polimorfismos analisados quanto ao desfecho e gravidade. Por outro lado, foi visto uma menor expressão de genes relacionados com os mecanismos efetores e de desenvolvimento dos linfócitos citotóxicos, além de uma maior quantidade de citocinas com um perfil mais pró-inflamatório.

Cabrera-Marante (2020) indica que a alteração A91V no gene da perforina, reduzindo sua estabilidade, pode resultar em um efeito reduzido da atividade das células citotóxicas. Na infecção viral, essas células são responsáveis por impedir a sua replicação e eliminar o vírus, utilizando o maquinário de secreção de suas proteínas citotóxicas, tal como a perforina. Caso as células infectadas não sejam eliminadas por algum defeito nessas proteínas, isso poderia levar a um aumento da ativação de linfócitos e macrófagos, contribuindo para a tempestade de citocinas, frequentemente observada em quadros graves de COVID-19. O genótipo homocigoto mutado deste mesmo polimorfismo já foi associado a condições patológicas, como a linfocitose hemofagocítica familiar, que está ligada à tempestade de citocinas. Além disso, um potencial papel patogênico foi descrito para indivíduos heterocigotos compostos (Martinez-Pomar, 2013). Como foi encontrado apenas um caso com a variante TT entre os pacientes aqui avaliados, não foi possível comprovar essa informação.

Em relação ao polimorfismo Q48R, presente no éxon 2 do gene da granzima B, Oboshi e colaboradores (2018) relataram que a presença dessa variante em heterocigose levou a uma menor citotoxicidade de células *natural killer* colocadas em cultura com células de linhagem K562, sugerindo que essa variante cause uma alteração na capacidade de ligação da proteína (McIlroy, 2003). Apesar de não haver estudos relacionando essa variante com a COVID-19, a relação com uma menor citotoxicidade dessas células pode indicar uma desregulação negativa da resposta imune contra outras infecções.

Assim como no caso das variantes no gene *PRF1*, foi levantada, também, a hipótese de que apenas a presença do alelo polimórfico, G, no polimorfismo avaliado, poderia influenciar na expressão do gene da granzima, o que, de acordo com o presente estudo, não foi

observado. Apesar de Oboshi e colaboradores (2018) terem relatado uma associação entre a presença da variante e uma menor citotoxicidade das células NK, também foi demonstrado não haver diferença significativa entre a expressão dos transcritos de *GZMB* e os genótipos analisados, o que corroboram os resultados do presente trabalho. Esses resultados sugerem que o polimorfismo Q48R não está em desequilíbrio de ligação com reguladores do gene *GZMB* (Oboshi, 2018).

Interessantemente, foi observado que a expressão dos genes *PRFI* e da *GZMB* diferiu quanto ao desfecho dos pacientes com COVID-19 aqui avaliados, sendo mais expressos naqueles que receberam alta que naqueles que foram a óbito. Além disso, ambos os genes mostraram diferenças significativas em relação à gravidade, uma vez que foram menos expressos em pacientes com quadro clínico grave, assim como observaram Li e colaboradores (2020), onde níveis séricos de perforina e granzima foram significativamente menores nos casos graves em comparação aos casos leves, reforçando a hipótese de que as células efectoras citotóxicas são disfuncionais em pacientes com COVID-19 grave.

Além da perforina e granzima, também foi observada uma diminuição significativa na expressão dos genes *EOMES* e *IL15* pelos indivíduos com COVID-19 que foram a óbito. O *EOMES* codifica um fator de transcrição de mesmo nome que é essencial para o desenvolvimento da célula NK. Tanto é que experimentos de Gordon e colaboradores (2012) mostraram que animais *knockout* para o *EOMES* apresentaram deficiência da maturação das células NK. Além disso, foi vista a sua importância, não só regulando seu desenvolvimento, mas também na manutenção da programação funcional, proliferação, sobrevivência, citotoxicidade e produção de citocinas. Ademais, Gill e colaboradores (2012) relataram que a inibição de fatores de transcrição, como o *EOMES*, leva a uma exaustão da célula NK em um modelo murino de linfoma. Portanto, considerando a contribuição desse fator em diversas etapas no desenvolvimento da célula NK, uma menor expressão em pacientes com o pior prognóstico pode levar a crer em uma resposta deficiente perante a infecção.

Por outro lado, foi observado um aumento na expressão de *EOMES*, *TBX21* e outros fatores de transcrição em indivíduos que deram entrada em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (Saeedifar, 2023). Esses fatores desempenham um papel crucial na diferenciação e funcionalidade das células T e NK e, embora esses indivíduos possam estar tentando mobilizar uma resposta imunológica robusta, a ativação excessiva ou prolongada pode levar à exaustão das células imunes. Novos estudos ainda são necessários para elucidar melhor essas questões.

A expressão do gene *TBX21*, que codifica um outro fator de transcrição importante no desenvolvimento das células NK, não diferiu significativamente entre os grupos, evidenciando a possibilidade de não interferir tanto na resposta antiviral das células em questão. Como o *TBX21* tem motivos de ligação no DNA similares ao *EOMES*, eles desempenham papéis muitas vezes redundantes, o que pode contribuir para uma diminuição da gravidade e melhor resposta em casos de defeitos em algum deles (Wong, 2023). Isto justificaria a não observação de diferenças ao se comparar indivíduos com quadro grave com indivíduos com quadro leve. Gordon e colaboradores (2012) também sugerem que as células NK são menos citotóxicas na ausência do *TBX21*, o que é possivelmente causada por uma diminuição na produção de perforina e granzima B.

Em relação a interleucina-15 (IL-15), foi vista uma diminuição na expressão nos indivíduos que foram a óbito. Essa molécula desempenha uma função indispensável no desenvolvimento e homeostase da célula NK (Wang, 2021). Assim, semelhantemente ao *EOMES*, seu papel crucial no início da maturação dessas células seria evidenciado na menor expressão do gene *IL15* em indivíduos com pior prognóstico, uma vez que, provavelmente, há um desenvolvimento defeituoso nessa célula, impedindo uma resposta efetiva contra o alvo.

Li e colaboradores (2020) descrevem que há uma diminuição significativa de perforina e granzima B em pacientes com quadros mais graves, indicando que isso se deveria a uma disfunção das células imunes efetoras, diminuindo a habilidade do hospedeiro de controlar a replicação viral. Para elucidar essa questão, foi realizada a quantificação de perforina, granzima B e citocinas produzidas por linfócitos expostos a amostras de plasma de indivíduos infectados pelo *SARS-CoV-2*. Considerando perforina e granzima B, foi visto que a expressão dessas proteínas citolíticas foi significativamente menor após o contato com o plasma de indivíduos infectados.

Esses resultados sugerem a presença de algum componente no plasma desses indivíduos que possa ter um efeito imunoregulador nas células saudáveis, induzido pelo *SARS-CoV-2*. Diante disso, foi realizada a dosagem de citocinas e foi percebido um aumento da produção de IL-17A, TNF, IL-10 e IL-6 pelas células em contato com plasma infectado nas amostras de pacientes com COVID-19, assim como foi visto por Queiroz e colaboradores (2022), Liu e colaboradores (2020) e Hirano e colaboradores (2020).

A interleucina-17A é uma citocina pró-inflamatória secretada por células do perfil Th17 e tem um papel fundamental no recrutamento de monócitos e neutrófilos para o local da infecção (Montazersaheb, 2022). Considerando que o membro IL-17A pode exacerbar

reações inflamatórias por meio da ativação *downstream* de outras citocinas, como IL-1 e IL-6 (Rokni, 2020) e de já ter sido relacionada com aumento da gravidade em infecções respiratórias (Mangodt, 2015), é de se esperar uma relação negativa com o quadro de COVID-19, justamente por agravar o quadro inflamatório do indivíduo, fator agravante dessa doença, o que pode ser relacionado com o presente estudo na medida em que células expostas ao plasma de indivíduos infectados tiveram maior produção dessa citocina. Essa relação foi vista por Xu e colaboradores (2020), pois mostrou que pacientes com COVID-19 admitidos na UTI tiveram elevados níveis de células do perfil Th17 devido à excessiva produção de citocinas como IL-17A.

O TNF, segundo McElvaney e colaboradores (2020) foi associado a um aumento na gravidade de pacientes com COVID-19, além de estar relacionado com complicações como aumento de secreção intestinal, tosse seca, asma dentre outras (Costela-Ruiz, 2020). No presente estudo, foi visto um aumento na produção de TNF pelas células em contato com o plasma contaminado, o que também sugere um possível desbalanço na resposta imune frente o vírus. Ainda há de se ressaltar, que o TNF aumenta ainda mais a citotoxicidade das células NK e modulam o sistema imunológico, direcionando as respostas imunes para o fenótipo Th1 (Chalifour, 2004).

A IL-6 está associada a uma redução na função das células NK, justamente devido a uma regulação negativa na expressão das proteínas perforina e de granzima B (Cifaldi, 2015), além de, como também observado no estudo, contribuir para uma menor expressão do gene *PRFI*. Além disso, a IL-6 é um forte preditor da progressão da COVID-19, pois é uma das principais citocinas indutoras da tempestade de citocinas (Rostamian, 2020), refletindo o que foi visto neste estudo, em que aparece aumentada após contato com plasma infectado, e em estudos de Coomes e colaboradores (2020), na medida em que observou elevados níveis de IL-6 em indivíduos com COVID-19 grave.

Já a IL-10 está relacionada a uma inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e IL-2 (Nishimura, 2008), que também foram dosadas, ou seja, apresenta um caráter anti-inflamatório e imunossupressor. Entretanto, seus níveis estiveram aumentados em pacientes com COVID-19 grave (Huang, 2021) sendo que, muitas vezes, é um dos critérios mais importantes para identificar a gravidade e o curso da doença (Dhar, 2021) e isso pode estar relacionado a uma inibição da resposta antiviral contra a infecção, levando a um pior prognóstico do indivíduo.

O uso de plasma de indivíduos convalescentes da COVID-19 foi amplamente difundido nos últimos anos. Foi observado que essa terapia diminuiu a necessidade de

hospitalização em pacientes ambulatoriais, principalmente por meio da imunomodulação promovida pelos componentes presentes no plasma. Além disso, foi visto que os níveis de IL-6, citocina associada a morbidade e mortalidade em indivíduos com COVID-19, diminuíram após utilização do plasma de indivíduos que se recuperaram da infecção (Habtehyimer, 2024). O mecanismo que promove essa redução ainda é incerto, mas é hipotetizado que seja devido a uma redução da carga viral (Marconato, 2022). No presente estudo foi observado um aumento da IL-6 produzida por células mononucleares saudáveis estimuladas pelo plasma de indivíduos infectados, comparado ao estímulo de plasma saudável, o que corrobora o papel negativo dessa interleucina no prognóstico de indivíduos infectados pelos *SARS-CoV-2*.

Além disso, análises de Hou e colaboradores (2014) mostraram que a IL-17A e a IL-6 podem agir sinergicamente promovendo a persistência da infecção viral por meio da inibição da apoptose e da função dos linfócitos T citotóxicos.

Quanto à citocina IL-10, Bonny e colaboradores (2020) relataram um aumento significativo da interleucina no plasma de indivíduos convalescentes comparado ao plasma utilizado como controle. É importante destacar que a IL-10 está relacionada à sobrevivência das células B, à sua diferenciação em plasmócitos e à troca de classe dos anticorpos (Moore, 2001). No presente estudo, foi visto um aumento dessa citocina na cultura celular cujas células mononucleares saudáveis foram estimuladas pelo plasma de indivíduos contaminados, comparados ao estímulo de plasma saudável, o que pode indicar uma tentativa do sistema imune em fortalecer a resposta contra a infecção.

Apesar do resultado não significativo, observa-se um aumento discreto na quantidade de IFN- $\gamma$  nas células expostas ao plasma de pacientes infectados. Estudos como o de Huang e colaboradores (2020) e de Qin e colaboradores (2020), mostraram que o aumento de citocinas como IFN- $\gamma$  está correlacionado com a gravidade da doença na COVID-19. Isso poderia ser atribuído à formação de uma inflamação sistêmica, resultante do recrutamento excessivo de células imunes e da subsequente liberação de citocinas pró-inflamatórias (McGonagle, 2020).

Quanto à citocina IL-2, já foi observado que essa citocina é capaz de estimular a população de células NK e aumentar a expressão de marcadores de ativação (Sharma, 2018) e, conseqüentemente, reforçar o combate à infecção. Neste trabalho, o estímulo com o plasma infectado não foi capaz de induzir uma maior secreção dessa citocina, o que pode ser devido a algum mecanismo de escape utilizado pelo vírus, o que levaria a uma falha no recrutamento e indução de expansão das células imunes.

Também foi investigado se esse possível componente imunorregulador poderia atuar na expressão transcricional dos genes analisados. o que foi visto para os genes *PRF1*, *EOMES* e *IL15*, podendo indicar um possível mecanismo de escape viral, na medida em que são genes codificadores de proteínas e fatores de transcrição importantes tanto para o desenvolvimento e ativação das células NK como para seus mecanismos efetores.

Ainda hoje, não estão claros todos os mecanismos que predispõem a um pior prognóstico em pacientes com COVID-19. Assim, a investigação minuciosa dos fatores que podem interferir no funcionamento adequado das células efectoras contra o vírus, bem como influência de fatores genéticos, são essenciais para direcionar a uma abordagem mais adequada desses pacientes, identificando aqueles de maior risco, bem como no desenvolvimento de novas terapias para esta enfermidade.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos mostraram que pacientes que estavam em melhor estado clínico e que tiveram um melhor desfecho apresentaram uma maior expressão gênica de *PRF1*, *GZMB*, *EOMES* e *IL15*. Além disso, o presente estudo conclui que não há associação entre os polimorfismos A91V e Q48R e a gravidade ou desfecho de indivíduos infectados com *SARS-CoV-2*. Quanto à análise funcional relacionada à exposição de PBMCs ao plasma de pacientes com COVID-19, houve diminuição da quantidade de perforina e de granzima B nas células NK, além de redução na expressão dos genes *PRF1*, *EOMES* e *IL15* indicando potenciais componentes no plasma desses indivíduos infectados que podem contribuir com uma supressão da resposta imune. Após dosagem das citocinas, observou-se que houve um aumento da IL-17A, TNF, IL-10 e IL-6 nas células em contato com o plasma infectado, citocinas estas caracterizadas por ter uma influência importante na ocorrência da tempestade de citocinas, fator agravante da doença e indicador de mau prognóstico.

## 8 REFERÊNCIAS

- ADIB-CONQUY, M; et al. TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals. **Immunology and cell biology**, v. 92, n. 3, p.256-262, 2014.
- AKTAS, E; et al. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. **Cellular immunology**, v. 254, n.2, p.149-154, 2009.
- BI, J. NK cell dysfunction in patients with COVID-19. **Cellular & molecular immunology**, v. 19, n. 2, p.127-129, 2022.
- BIRON, C. A; et al. Innate immunity to viral infections. **Nature Immunology**, v. 2, n. 2, p.1-8, 1999.(2), 1-8.
- BIRRA, D; et al. COVID 19: a clue from innate immunity. **Immunologic research**, v. 68, n. 3, p.161-168, 2020.
- BJÖRKSTRÖM, N, K; et al. Natural killer cells in antiviral immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 22, n. 2, p.112-123, 2022.
- BONNY, T. S; et al. Cytokine and Chemokine Levels in Coronavirus Disease 2019 Convalescent Plasma. **Open forum infectious diseases**, v. 8, n. 2, 2020.
- CABRERA-MARANTE, O; et al. Perforin gene variant A91V in Young patients with severe COVID-19. **Haematologica**, v. 105, n. 12, p.2844-2846, 2020.
- CABRERA-MARANTE, O; et al. Perforin gene variant A91V in Young patients with severe COVID-19. **Haematologica**, v. 105, n. 12, p.2844-2846, 2020.
- CARVAJAL, J; et al. New insights into the pathogenesis of SARS-CoV-2 during and after the COVID-19 pandemic. **Frontiers in immunology**, v. 15, n. 1363572, 2024.
- CHALIFOUR, A; et al. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. **Blood**, v. 104, n. 6, p.1778-1783, 2004.
- CHAN, J.F.W; et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. **Lancet**, v. 395, n. 10223, p.514–523, 2020.
- CHAN, J.F; et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. **Clin Microbiol Rev**, v.28, n.2, p.465-522, 2015.
- CHEEMARLA, N. R; et al. Dynamic innate immune response determines susceptibility to SARS-CoV-2 infection and early replication kinetics. **The Journal of experimental medicine**, v. 218, n. 8, 2021.
- CIFALDI, L; et al. Inhibition of natural killer cell cytotoxicity by interleukin-6: implications for the pathogenesis of macrophage activation syndrome. **Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)**, v. 67, n. 11, p.3037-3046, 2015.
- COOMES, E. A.; HAGHBAYAN, H. Interleukin-6 in Covid-19: A systematic review and meta-analysis. **Rev Med Virol**, v. 30, n. 6, p.1-9, 2020.

COSTELA-RUIZ, V. J; et al. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 54, p.62-75, 2020.

**COVID-19 não é pandemia, mas sindemia: o que essa perspectiva científica muda no tratamento.** Centro de Estudos Estratégicos da Fiocruz, 2020. Disponível em: [https://cee.fiocruz.br/?q=node/1264#:~:text=O%20termo%20sindemia%20\(um%20neologismo,mera%20soma%20dessas%20duas%20doen%C3%A7as%E2%80%9D](https://cee.fiocruz.br/?q=node/1264#:~:text=O%20termo%20sindemia%20(um%20neologismo,mera%20soma%20dessas%20duas%20doen%C3%A7as%E2%80%9D). Acesso em: 23 dez 2024.

CUNNINGHAM, L; et al. Perforin and resistance to SARS coronavirus 2. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 146, n. 1, p.52-53, 2020.

CUNNINGHAM, L; et al. Perforin, COVID-19 and a possible pathogenic auto-inflammatory feedback loop. **Scand J Immunol**, v. 94, n. 5, p. e13102, 2021.

DELLA CHIESA, M; et al. Human NK Cells and Herpesviruses: Mechanisms of Recognition, Response and Adaptation. **Frontiers in microbiology**, v. 10, n. 2297, 2019.

DENG, X; et al. Exploring the Utility of NK Cells in COVID-19. **Biomedicines**, v. 10, n. 5, 2022.

DENG, X; et al. Immunosurveillance of Cancer and Viral Infections with Regard to Alterations of Human NK Cells Originating from Lifestyle and Aging. **Biomedicines**, v. 9, n. 5, 2021.

DHAR, S. K; et al. IL-6 and IL-10 as predictors of disease severity in COVID-19 patients: results from meta-analysis and regression. **Heliyon**, v. 7, n. 2, 2021.

DOREMALEN, N. V; et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. **N. Engl. J. Med**, v. 382, n. 16, p.1564-1567, 2020.

DU, N; *et al.* Cui J. NK Cell Therapy: A Rising Star in Cancer Treatment. **Cancers**, v. 13. n. 16, 2021.

DUEV-COHEN, A; et al. The human 2B4 and NTB-A receptors bind the influenza viral hemagglutinin and co-stimulate NK cell cytotoxicity. **Oncotarget**, v. 7, n. 11, p.13093-13105, 2016.

FERNÁNDEZ, I. Z; et al. A novel human *IL2RB* mutation results in T and NK cell-driven immune dysregulation. **The Journal of experimental medicine**, v. 216, n. 6, p.1255-1267, 2019.

FERRETT, L; et al. Quantifying SARS-CoV-2 transmission suggests epidemic control with digital contact tracing. **Science**, v. 368, n. 6491, 2020.

FLEURY, Marcos; ISFER, Mauren. Alterações laboratoriais em pacientes com COVID-19. **Sociedade Brasileira de Análises Clínicas**. Disponível em: <https://www.sbac.org.br/alteracoes-laboratoriais-em-pacientes-com-covid19/>. Acesso em 10 set. 2024.

GILL, S; et al. Rapid development of exhaustion and down-regulation of eomesodermin limit the antitumor activity of adoptively transferred murine natural killer cells. **Blood**, v. 119, n. 24, p.5758-5768, 2012.

GORDON, S. M; et al. The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. **Immunity**, v. 36, n. 1, p.55-67, 2012.

GRIFONI, A; et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. **Cell**, v. 181, n. 7, p.1489-1501, 2020.

GRIFONI, A; et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. **Cell**, v. 181, n. 7, p.1489–1501, 2020.

GUO, Y. R; *et al.* The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. **Military Med Res**, v. 7, n. 10, 2020.

HABTEHYIMER, F; et al. COVID-19 convalescent plasma therapy decreases inflammatory cytokines: a randomized controlled trial. **Microbiology spectrum**, v. 12, n. 1, 2024.

HADJADJ, J; et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. **Science (New York, N.Y.)**, v. 369, n. 6504, p.718-724, 2020.

HENGARTNER, M.O; The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p.770-776, 2000.

HERRERA, L; et al. Identifying SARS-CoV-2 'memory' NK cells from COVID-19 convalescent donors for adoptive cell therapy. **Immunology**, v. 165, n. 2, p.234-249, 2022.

HIRANO, T.; MURAKAMI, M. COVID-19: A New Virus, but a Familiar Receptor and Cytokine Release Syndrome. **Immunity**, v. 52, n. 5, 2020.

HOU, W; et al. Interleukin-6 (IL-6) and IL-17 synergistically promote viral persistence by inhibiting cellular apoptosis and cytotoxic T cell function. **J Virol**, v. 88, n. 15, p.8479-8489, 2014.

HOUSE, I. G; et al. Heterozygosity for the common perforin mutation, p.A91V, impairs the cytotoxicity of primary natural killer cells from healthy individuals. **Immunol Cell Biol**, v. 93, n. 6, p.575-580, 2015.

HUANG, C; et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10223, p.497-506, 2020.

HUANG, C; et al. Enhancement of the IFN- $\beta$ -induced host signature informs repurposed drugs for COVID-19. **Heliyon**, v. 6, n. 12, 2020.

HUANG, F; et al. IL-10 served as an indicator in severe COVID-19 patients. **J Med Virol**, v. 93, n. 3, p.1233-1235, 2021.

JENKINS, M. R; TRAPANI, J. A; DOHERTY, P.C; *et al.* Granzyme K expressing cytotoxic T lymphocytes protects against influenza virus in granzyme AB  $-/-$  mice. **Viral Immunol**, v. 21, n. 3, p.341–346, 2008.

KENNEDY, M. K; et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 191, n. 5, 2000.

KHAWAR, M. B; HAIBO, S. CAR-NK Cells: From Natural Basis to Design for Kill. **Frontiers in immunology**, v. 12, n. 707542, 2021.

KRÄMER, B; et al. Early IFN- $\alpha$  signatures and persistent dysfunction are distinguishing features of NK cells in severe COVID-19. **Immunity**, v. 54, n. 11, 2021.

KUBA, K; et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. **Nat Med**, v. 11, p. 875-879, 2005.

KUMAR, N. P; et al. Type 2 diabetes mellitus is associated with altered CD8+ T and natural killer cell function in pulmonary tuberculosis. **Immunology**, v. 144, n. 4, p.677-686, 2015.

LAND, W. G. Role of DAMPs in respiratory virus-induced acute respiratory distress syndrome-with a preliminary reference to SARS-CoV-2 pneumonia. **Genes and immunity**, v. 22, n. 3, p.141-160, 2021.

LEE, G. R. The balance of Th17 versus treg cells in autoimmunity. **Int. J. Mol. Sci**, v. 19, 2018.

LI, M; et al. Elevated Exhaustion Levels of NK and CD8+ T Cells as Indicators for Progression and Prognosis of COVID-19 Disease. **Frontiers in immunology**, v. 11, n. 580237, 2020.

LI, Q; et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. **N. Engl. J. Med**, v. 382, n. 13, p.1199–1207, 2020.

LIU, B; MORI, I; HOSSAIN, M.J; et al. Local immune responses to influenza virus infection in mice with a targeted disruption of perforin gene. **Microb Pathog**, v. 34, n. 4, p. 161-167, 2003.

LIU, C. X; et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) 2 overexpression ameliorates glomerular injury in a rat model of diabetic nephropathy: a comparison with ACE inhibition. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 17, v. 1-2, p.59-69, 2011.

LIU, C; et al. Time-resolved systems immunology reveals a late juncture linked to fatal COVID-19. **Cell**, v. 184, n. 7, p.1836-1857, 2021.

LIVAK, K. J; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p.402-408, 2001.

LOPEZ-VERGÈS, S; et al. Expansion of a unique CD57<sup>+</sup>NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 36, p.14735-14732, 2011.

LU, R; et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **Lancet**, v. 395, n. 10224, p.565-574, 2020.

LUCKHEERAM, R. V; et al. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. **Clin. Dev. Immunol**, v. 2012, 2012.

MANDALA, V.S; et al. Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. **Nat Struct Mol Biol**, v.27, p.1202-1208, 2020.

MANGODT, T; et al. The role of Th17 and Treg responses in the pathogenesis of RSV infection. **Pediatric Research**, v. 78, p.483-491, 2015.

MARCONATO, M; et al. Antibodies from convalescent plasma promote SARS-CoV-2 clearance in individuals with and without endogenous antibody response. **The Journal of clinical investigation**, v. 132, n. 12, 2022.

MARIANI, E; et al. Perforins in human cytolytic cells: the effect of age. **Mech Ageing Dev**, v. 92, n. 2-3, p.195-209, 1996.

MARTÍNEZ-POMAR, N; et al. Functional impact of A91V mutation of the *PRF1* perforin gene. **Human Immunology**, v. 74, n. 1, p.14-17, 2013.

MASTERS, P. S; et al. Genetic and molecular biological analysis of protein-protein interactions in coronavirus assembly. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 581, p.163-173, 2006.

MAUCOURANT, C; et al. Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. **Science immunology**, v. 5, n. 50, 2020.

McELVANEY, O. J; et al. Characterization of the Inflammatory Response to Severe COVID-19 Illness. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 202, n. 6, p.812-821, 2020.

McGONAGLE, D; et al. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. **Autoimmunity reviews**, v. 19, n. 6, 2020.

McILROY, D; et al. A triple-mutated allele of granzyme B incapable of inducing apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 5, p.2562-2567, 2003

McILROY D; et al. Polymorphism in the proximal promoter region of the perforin gene and its impact on the course of HIV infection. **International Journal of Immunogenetics**, v. 33, p.73-79, 2006.

McMAHAN, K; *et al.* Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. **Nature**, v. 590, n. 7847, p.630-364, 2021.

MEHTA, P; et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. **The Lancet**, v.395, n. 10229, p.1033-1034, 2020.

MICHELET, X; et al. Metabolic reprogramming of natural killer cells in obesity limits antitumor responses. **Nat Immunol**, v. 19, p.1330-1340, 2018.

Ministério da Saúde - COVID-19 no Brasil. **Ministério da Saúde do Brasil**, 2025. Disponível em: [https://infoms.saude.gov.br/extensions/covid-19\\_html/covid-19\\_html.html](https://infoms.saude.gov.br/extensions/covid-19_html/covid-19_html.html). Acesso em : 05 jan. 2025.

MOLGORA, M; et al. The yin-yang of the interaction between myelomonocytic cells and NK cells. **Scandinavian journal of immunology**, v. 88, n. 3, 2018.

MONTAZERSAHEB, S; et al. COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions, **Virology Journal**, v. 19, n. 92, 2022.

MOORE, K. W; et al. Interleukin-10 and the regulation of immune responses. **Immunological Reviews**, v. 202, n. 1, p.10-21, 2001.

MYERS, J, A; JEFFREY, S. M. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 18, n. 2, p.85-100, 2021.

NEIDLEMAN, J; et al. SARS-CoV-2-Specific T Cells Exhibit Phenotypic Features of Helper Function, Lack of Terminal Differentiation, and High Proliferation Potential. **Cell Rep. Med**, 2020.

NGUYEN, K, B; et al. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. **Journal of immunology** (Baltimore, Md. : 1950), v. 169, n. 8, p.4279-4287, 2002.

NISHIMURA, M; et al. Interleukin-10 containing normal human serum inhibits granzyme B release but not perforin release from alloreactive and EBV-specific T cell clones. **Cellular immunology**, v. 251, n. 1, p.31-36, 2008.

OBOSHI, W; *et al.* QPY/RAH haplotypes of the *GZMB* gene are associated with natural killer cell cytotoxicity. **Immunogenetics**, v. 70, p.29–36, 2018.

OCHANI, R; et al. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. **Le infezioni in medicina**, v. 29, n. 1, p.20-36, 2021.

OHNO, S; et al. Runx proteins are involved in regulation of CD122, Ly49 family and IFN-gamma expression during NK cell differentiation. **International immunology**, v. 20, n. 1, p.71-79, 2008.

PADOVAN, L.; SEGAT, L.; CROVELLA, S. A polymorphism in PRF1 gene is associated with HIV-1 vertical transmission in Brazilian children. **AIDS**, v. 25, p.535-539, 2011.

PAUKEN, K. E; et al. The CD56bright and CD56dim subsets of human NK cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 3, p.147-160, 2016.

PEIRIS, J; et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. **Lancet**, v. 361, n. 9371, p.1767–1772, 2003.

PENG, Y; et al. Structures of the SARS-CoV-2 nucleocapsid and their perspectives for drug design. **Embo j**, v.39, n.20, 2020.

PETROV, S; et al. Guardians of immunity: NK cell-mediated defense in COVID-19 and post-COVID scenarios. **Folia medica**, v. 66, n. 1, p.12-18, 2024.

QIN, C; et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 71, n. 15, p.762-768, 2020.

QUEIROZ, M. A. F; et al. Cytokine Profiles Associated With Acute COVID-19 and Long COVID-19 Syndrome. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, n. 922422, 2022.

RAMADAN, N; HOUSSAM, S. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): A review. **Germs**, v. 9, n. 1, p.35-42, 2019.

RAMIREZ-BELLO, J; JIMENEZ-MORALEZ, M. Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases. **Gac. Med. Mex**, v. 153, n. 2, p.238–250, 2017.

ROKNI, M.; HAMBLIN, M. R.; REZAEI, N. Cytokines and COVID-19: friends or foes? **Hum Vaccin Immunother**, v. 16, n. 10, 2020.

ROSTAMIAN, A; et al. Interleukin-6 as a Potential Predictor of COVID-19 Disease Severity in Hospitalized Patients and its Association with Clinical Laboratory Routine Tests. **Immunoregulation**, v. 3, n. 1, p.29-36, 2020.

RUKAVINA, D; et al. Age-related decline of perforin expression in human cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. **Blood**, v. 92, n. 7, p.2410-2420, 1998.

SAEEDIFAR, A. M; et al. Evaluation of Tcell exhaustion based on the expression of EOMES, Tbet and co-inhibitory receptors in severe and non-severe covid-19 patients. **Gene reports**, v. 31, 2023.

SHARMA, R.; DAS, A. IL-2 mediates NK cell proliferation but not hyperactivity. **Immunologic Research**, v. 66, p.151-157, 2018.

SCHULERT, G.S; CRON, R.Q. The genetics of macrophage activation syndrome. **Genes Immun**, v. 21, n. 3, p.169-181, 2020.

SCHULERT, G.S; et al. Whole exome sequencing reveals mutations in genes linked to hemophagocytic lymphohistiocytosis and macrophage activation syndrome in fatal cases of H1N1 influenza. **J Infect Dis**, v. 213, n. 7, p.1180-1188, 2016.

SCHULTZE, J. L; ASCHENBRENNER, A. C. COVID-19 and the human innate immune system. **Cell**, v. 184, n. 7, p.1671-1692, 2021.

SMYTH, M. J; TRAPANI, J. A. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. **Immunol Today**, v. 16, n. 4, p.202–206, 1995.

SOLOMOU, E. E; et al. Perforin gene mutations in patients with acquired aplastic anemia. **Blood**, v. 109, n. 12, p.5234-5237, 2007.

STASSI, G; DE MARIA, R. **Nat Rev Immunol**, v.2, n.3, p.195-204, 2002.

SUGIYAMA, T; et al. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. **Immunity**, v. 25, n. 6, p.977-988, 2006.

TANG, D; et al. The hallmarks of COVID-19 disease. **PLoS pathogens**, v. 16, n.5. 2020

TAY, M. Z; et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature reviews. Immunology**, v. 20, n. 6, p.363-374, 2020.

TRAPANI, J.A. Granzymes, cytotoxic granules and cell death: the early work of Dr. Jurg Tschopp. **Cell Death Differ**. v.19, n.1, p.21-7, 2012.

TRAPANI, J. A.; SMYTH, M. J. Funcional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature reviews. Immunology*, v. 2, p.735-747, 2002.

**TUBERCULOSE 2024.** Ministério da Saúde - Boletim Epidemiológico, 2024. Disponível em: <https://multisite.unicamp.br/wp-content/uploads/sites/52/2024/03/Boletim-Epidemiologico-de-Tuberculose-Numero-Especial-Mar.-2024-1.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2025.

VAN EEDEN, C; et al. Natural Killer Cell Dysfunction and Its Role in COVID-19. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 17, 2020.

VARCHETTA, S; et al. Unique immunological profile in patients with COVID-19. **Cellular & molecular immunology**, v. 18, n. 3, p.604-612, 2021.

VIVIER, E; et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. **Cell**, v. 174, n. 5, p.1054-1066, 2018.

VOSKOBOINIK, I; et al. Perforin activity and immune homeostasis: the common A91V polymorphism in perforin results in both presynaptic and postsynaptic defects in function. **Blood**, v. 110, n. 4, p.1184-1190, 2007.

VOSKOBOINIK, I; WHISSTOCK, J.C; TRAPANI, J.A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 6, p.388-400, 2015.

WAGGONER, S. N; et al. Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells. **Nature**, v. 481, n.7381, p.394-398, 2011.

WANG, X;, ZHAO,X. Transcription Factors Associated With IL-15 Cytokine Signaling During NK Cell Development. **Frontiers in immunology**, v. 12, n. 610789, 2021.

WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard. **World Health Organization**, 2025. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em : 05 jan. 2025.

World Health Organization. **COVID-19 clinical management: living guidance**, 25 January 2021. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/338882>. Acesso em: 05 jan. 2025

WIERTZ, E; et al. Cytomegaloviruses use multiple mechanisms to elude the host immune response. **Immunology letters**, v. 57, n. 1-3, p.213-216, 1997.

WILLENBRING, R. C; JOHNSON, A. J. Finding a balance between protection and pathology: the dual role of perforin in human disease. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 8, p.1608. 2017.

WONG, P; et al. T-BET and EOMES sustain mature human NK cell identity and antitumor function. **The Journal of clinical investigation**, v. 133, n. 13, 2023.

WONG, T. L; WEITZER, D. J.. Long COVID and Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS)-A Systemic Review and Comparison of Clinical Presentation and Symptomatology. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 57, n. 5, p.418, 2021.

XU, M. D; et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **Lancet Respir Med**, v. 8, p.420-422, 2020.

YAN, L; et al. Dynamics of NK, CD8 and Tfh cell mediated the production of cytokines and antiviral antibodies in Chinese patients with moderate COVID-19. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 24, n. 24, 2020.

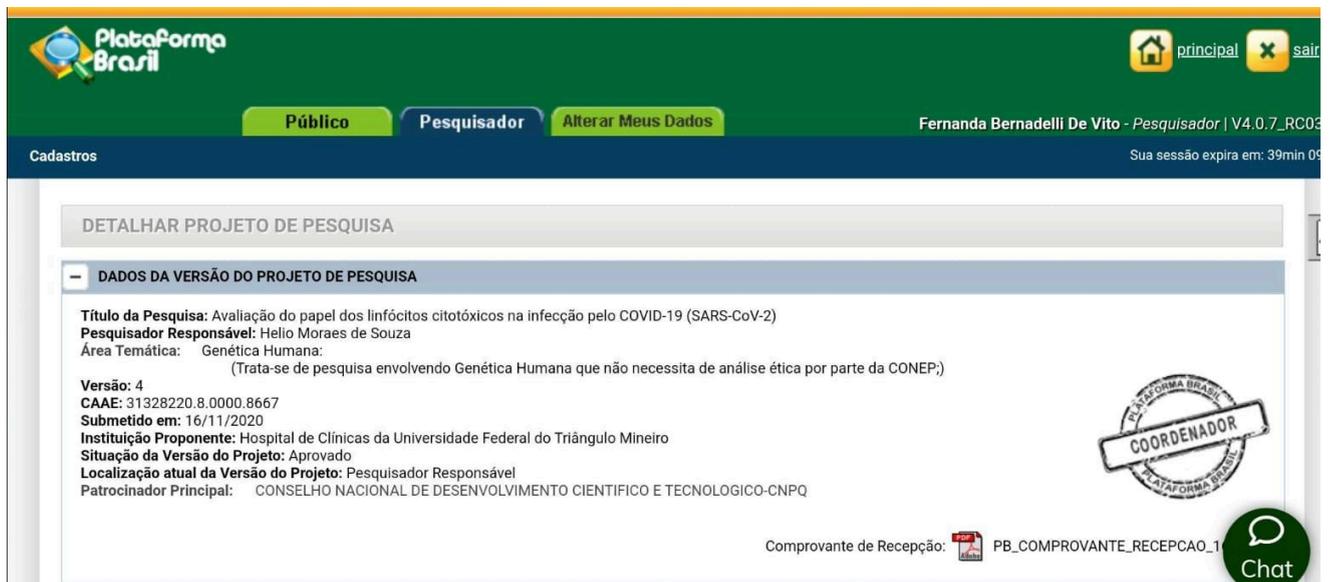
ZHANG, Y.Z; HOLMES, E.C. A genomic perspective on the origin and emergence of SARS-CoV-2. **Cell**, v. 181, n.2, p.223-227, 2020.

ZHENG, Y; et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) membrane (M) protein inhibits type I and III interferon production by targeting RIG-I/MDA-5 signaling. **Signal Transduct Target Ther**, v. 5, n.1, p.299, 2020.

ZHAO, J; et al. Natural killer cells: Development, maturation, and function. **Journal of Immunology Research**, 2018.

ZHOU, P; et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p.270-273, 2020.

## ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



The screenshot displays the 'Plataforma Brasil' web application interface. At the top, there is a navigation bar with the logo on the left and user options 'principal' and 'sair' on the right. Below this is a secondary bar with buttons for 'Público', 'Pesquisador', and 'Alterar Meus Dados'. The user's name 'Fernanda Bernadelli De Vito - Pesquisador' and version 'V4.0.7\_RC03' are shown on the right, along with a session expiration timer 'Sua sessão expira em: 39min 09'. The main content area is titled 'DETALHAR PROJETO DE PESQUISA' and contains a section 'DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA'. This section lists the following information: 'Título da Pesquisa: Avaliação do papel dos linfócitos citotóxicos na infecção pelo COVID-19 (SARS-CoV-2)', 'Pesquisador Responsável: Helio Moraes de Souza', 'Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;)', 'Versão: 4', 'CAAE: 31328220.8.0000.8667', 'Submetido em: 16/11/2020', 'Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro', 'Situação da Versão do Projeto: Aprovado', 'Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável', and 'Patrocinador Principal: CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ'. A circular stamp with the text 'COORDENADOR' is visible on the right side of the project details. At the bottom right, there is a 'Comprovante de Recepção' section with a PDF icon and the filename 'PB\_COMPROVANTE\_RECEPCAO\_1', and a 'Chat' button.

**Plataforma Brasil** principal sair

**Público** **Pesquisador** **Alterar Meus Dados** Fernanda Bernadelli De Vito - Pesquisador | V4.0.7\_RC03

Cadastros Sua sessão expira em: 39min 09

### DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

#### DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação do papel dos linfócitos citotóxicos na infecção pelo COVID-19 (SARS-CoV-2)  
**Pesquisador Responsável:** Helio Moraes de Souza  
**Área Temática:** Genética Humana:  
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;)

**Versão:** 4  
**CAAE:** 31328220.8.0000.8667  
**Submetido em:** 16/11/2020  
**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
**Situação da Versão do Projeto:** Aprovado  
**Localização atual da Versão do Projeto:** Pesquisador Responsável  
**Patrocinador Principal:** CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ

COORDENADOR

Comprovante de Recepção: PB\_COMPROVANTE\_RECEPCAO\_1

Chat