

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

WLADEMIR BRAGA SALGADO SOBRINHO

**Atividade da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase na resposta imune em
Covid-19**

MANAUS
JUNHO/2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

WLADEMIR BRAGA SALGADO SOBRINHO

**ATIVIDADE DA ENZIMA INDOLEAMINA-2,3-DIOXIGENASE NA RESPOSTA
IMUNE EM COVID-19.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Pritesh Jaychand Lalwani

MANAUS
JUNHO/2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S164a Salgado Sobrinho, Wladimir Braga
Atividade da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase na resposta imune em Covid-19 / Wladimir Braga Salgado Sobrinho . 2021
67 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Pritesh Jaychand Lalwani
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Covid-19. 2. Sars-CoV-2. 3. Quinurenina. 4. IDO - Indoleamina-2,3-dioxigenase. I. Lalwani, Pritesh Jaychand. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

RESUMO

A pandemia de COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, iniciada em dezembro de 2019, já se tornou a maior crise sanitária do último século. Nos casos mais graves, COVID-19 gera uma reação inflamatória desbalanceada que, além de ser pouco eficaz na contenção da replicação de SARS-CoV-2, acarreta danos ao hospedeiro, particularmente nos pulmões. A enzima IDO, capaz de converter triptofano em quinurenina, é uma enzima imunomoduladora cuja atividade está relacionada à diferenciação de células T reguladoras e supressão de respostas T efetoras, ajudando a estabelecer, então, um ambiente imunossupressor. O objetivo deste trabalho é elucidar o papel de IDO e de quinurenina na imunopatologia de COVID-19. Obtiveram-se amostras de sangue, soro e plasma de pacientes graves e leves, de onde se extraíram os metabólitos quinurenina e triptofano, que foram quantificados em HPLC e comparados com os níveis dos metabólitos em controles saudáveis. Por imunohistoquímica, detectou-se a presença de IDO em amostras de necrópsia do pulmão de pacientes graves que faleceram com COVID-19. Os resultados obtidos mostram elevação nos níveis de quinurenina em pacientes graves, particularmente daqueles que evoluem para óbito, em relação a pacientes com manifestação leve. Os níveis de quinurenina e a razão KYN/TRP também se correlacionam positivamente à elevação de marcadores inflamatórios e de prognóstico, como IL-6 e a da razão de neutrófilos/linfócitos, e sugerem que o aumento da atividade de IDO seja consequência da inflamação severa observada na COVID-19 grave. Quinurenina e razão KYN/TRP também foram visualizadas como fortes preditores de gravidade, mas não de desfecho clínico. Também se detectou aumento na expressão de IDO em amostras de necrópsias pulmonar de pacientes falecidos por COVID-19 em relação ao pulmão de camundongos saudáveis. Estes mostram elevação da atividade de IDO na COVID-19 grave.

Palavras-chaves: Covid-19, Sars-CoV-2, quinurenina, Ido.

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic, caused by SARS-CoV-2, began in December 2019, and already is the biggest sanitary crisis of the past century. In the most severe cases, COVID-19 generates a strong and uncontrolled inflammatory response, that, aside from being unable to hamper viral replication, damages the host, particularly at the lungs. IDO is an enzyme responsible for converting tryptophan in kynurenine and has an immunomodulatory activity that is related to T regulatory cells differentiation and suppression of effector T cell responses, establishing, therefore, an immunosuppressive environment. This study aims to elucidate the role of IDO and kynurenine in the immunopathogenesis of COVID-19. Blood, serum and plasma samples were obtained from severe and non-severe COVID-19 patients, from which kynurenine and tryptophan were extracted, then measured by HPLC and finally compared to the levels found in healthy controls. Through immunohistochemistry, IDO was detected in lung necropsy samples from patients with COVID-19. The results showed increase of kynurenine levels in severe patients, particularly of those who perished, in comparison to those found in non-severe patients. Kynurenine levels and KYN/TRP ratio were positively correlated with the augmentation of inflammatory markers and prognostic factors, such as IL-6 and neutrophil/lymphocyte ratio, suggesting that the increase in IDO activity is driven by the uncontrollable inflammation typical of severe COVID-19. Kynurenine and KYN/TRP ratio were also efficient as severity predictors but not clinical outcome. Increased IDO expression was also found on the lung of deceased COVID-19 patients, in relation to that of healthy mice controls. These results display increase of IDO activity in severe COVID-19.

Keywords: Covid-19, Sars-CoV-2, kynurenine, Ido.

LISTA DE ABREVIações

ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2
AhR	Receptor aril-hidrocarboneto
ALT	Alamina aminotransferase
ARDS	Síndrome do desconforto respiratório agudo
AST	Transaminase glutâmico-oxalacética
AUC	Área sob a curva
CBA	Cytometric bead array
CRP	Proteína C reativa
FoxP3	Forkhead box P3
gRNA	RNA genômico
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IDO	Indoleamina-2,3-dioxigenase
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ISG	Genes estimulados por interferon
KYN	Quinurenina
KYN/TRP	Razão quinurenina/triptofano
LDH	Lactato desidrogenase
MERS	Síndrome respiratória do Oriente Médio
mRNA	RNA mensageiro
NF-κB	Fator nuclear kappa-B
PCR	Reação em cadeia da polimerase
R0	Número básico de reprodução
RBD	Domínio de ligação de receptor
RLR	Receptor do tipo RIG
RSV	Virus sincicial respiratório
SARS	Síndrome respiratória aguda grave
SARS-CoV-2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral

TRP	Triptofano
Treg	Célula T reguladora
sgRNA	RNA subgenômico
sTREM-1	Receptor desencadeador expresso em células mieloides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa global de casos de COVID-19 registrados por país (18.05.2021).....	14
Figura 2: Curva de casos novos de COVID-19 no Brasil, por semana epidemiológica, de maio de 2020 a maio de 2021 (17.05.2021)	15
Figura 3: Curva de óbitos por COVID-19 no Brasil, por semana epidemiológica, de maio de 2020 a maio de 2021 (17.05.2021). Fonte: Ministério da Saúde, 2021.	15
Figura 4: Estrutura geral de SARS-CoV-2, observando as proteínas estruturais N, S, E e M e o genoma de RNA.	18
Figura 5: Ciclo de replicação de SARS-CoV-2.....	21
Figura 6: Tomografia computadorizada de paciente com COVID-19.....	22
Figura 7: Modelo da ação deIDO sobre a resposta imunológica.....	29
Figura 8: Quantificação das populações celulares no sangue periférico de pacientes graves e leves com COVID-19 e controles saudáveis.	38
Figura 9: Medidas de KYN, TRP e razão KYN/TRP comparando os três grupos (controles, leves e graves).....	40
Figura 10: Comparação entre os níveis dos metabólitos de pacientes graves que receberam alta ou foram a óbito	45
Figura 11: Análises comparativas entre os subgrupos de pacientes graves que receberam alta versus que foram a óbito.	46
Figura 12: Marcação de IDO em amostras de tecido pulmonar de pacientes com óbito por COVID-19	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados epidemiológicos dos controles saudáveis e pacientes leves e graves com COVID-19.....	35
Tabela 2: Parâmetros laboratoriais em controles saudáveis e pacientes leves e graves com COVID-19 no dia do recrutamento (D1).	36
Tabela 3: Níveis de citocinas séricas em controles saudáveis e pacientes leves e graves com COVID-19 no dia do recrutamento (D1).....	37
Tabela 4: Compilado de testes de correlação de Spearman entre as medições dos metabólitos(quinurenina e razão KYN/TRP) e os valores de outras variáveis relevantes enquanto marcadores de gravidade em COVID-19. Em cada correlação encontra-se o respectivo valor de p e r.	42

Sumário

INTRODUÇÃO.....	10
REFERENCIAL TEÓRICO	12
EPIDEMIOLOGIA.....	12
Primeiros casos	12
Transmissão global.....	13
No Brasil.....	14
VIROLOGIA.....	17
Estrutura viral.....	17
Transmissão e ciclo infeccioso	19
Apresentação clínica	21
Imunologia	24
IDO e metabolismo do triptofano.....	28
OBJETIVOS	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
Aprovação ética.....	32
Coleta de amostras.....	32
Quantificação de KYN e TRP	32
Imunohistoquímica.....	33
Análise Estatística.....	34
RESULTADOS	35
Dados demográficos e parâmetros clínico-hematológicos.....	35
Atividade de IDO em COVID-19	39
Valores de quinurenina e razão KYN/TRP estão significativamente correlacionados a marcadores de gravidade em COVID-19.....	42
A elevação na conversão de triptofano em quinurenina em pacientes com COVID-19 grave acompanha o quadro inflamatório associado ao óbito	43
IDO está amplamente expressa em amostras de necrópsia de tecido pulmonar oriundas de pacientes COVID-19.....	48
DISCUSSÃO	50
CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57

INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), a pandemia de *Coronavirus disease 2019* (COVID-19) causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, cujos primeiros casos foram registrados na China em dezembro de 2019, já registra mais de 163 milhões de casos confirmados, os quais culminaram em mais de 3,3 milhões de óbitos (WHO, 2021). A doença é altamente transmissível por contato próximo entre humanos, o que levou países do mundo inteiro a adotarem medidas de isolamento social a fim de tentar frear a disseminação do vírus.

A apresentação clínica de COVID-19 pode ser expressa em um largo espectro; de pacientes graves em cuidado intensivo que requerem ventilação mecânica, passando por casos leves com sintomas similares à gripe, até pacientes assintomáticos. De maneira geral, sua sintomatologia é similar à de outras infecções respiratórias, cujos sintomas mais característicos são tosse, febre e fadiga (Grant et al. 2020; Guan et al. 2020). Aproximadamente 20% dos infectados por SARS-CoV-2 progridem para a forma grave de COVID-19, com desenvolvimento ou não de síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS), e precisam ser internados. Estes pacientes costumam apresentar dispnéia, frequência respiratória superior a 30 por minuto e saturação de oxigênio no sangue maior que 93%; podendo evoluir para falha respiratória, choque séptico e falência múltipla de órgãos, o que requer cuidados intensivos (WHO, 2020).

Um ponto importante na evolução e gravidade de COVID-19 é a ocorrência de comorbidades. Três meta-análises independentes apontam hipertensão e diabetes como as comorbidades mais fortemente associadas à gravidade. Outras doenças relevantes incluem doenças respiratórias pré-existentes, obesidade e doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (Gold et al. 2020; Yang et al. 2020).

No contexto imunopatológico, os efeitos deletérios da COVID-19 se manifestam em decorrência de uma hiperinflamação sistêmica desbalanceada, que alguns definem como “tempestade de citocinas”, uma produção de múltiplos mediadores inflamatórios que estaria contribuindo diretamente com a progressão da imunopatologia (Wang. 2020a). Uma vez que a imunidade possui variados *checkpoints*, pontos dentro de vias sinalizatórias que modulam a alternância entre estados anti- e pró-inflamatórios, é provável que COVID-19 estimule

desregulação de alguns destes *checkpoints* durante a evolução da doença. A enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) é o primeiro ponto do metabolismo do triptofano convergindo para a via das quinureninas, e age convertendo o aminoácido em N-formilquinurenina, que espontaneamente se transforma em quinurenina (Hornýák et al. 2018). Por meio de interação do receptor aril-hidrocarboneto (AhR) com quinurenina, a atividade de IDO possui ação imunossupressora, podendo promover a exaustão de células T CD4+ e a geração de células T reguladoras (Mezrich et al. 2010; Pour et al. 2019).

A ativação de IDO no contexto de doenças infecciosas e câncer está normalmente relacionada à persistência da doença em decorrência da supressão da resposta imunológica (Katz et al. 2008), embora seu papel imunorregulador tem ação protetora e previne danos decorrentes de inflamação pulmonar (Lee et al. 2017). Desta forma, a proposta deste projeto de dissertação é de investigar o papel de IDO na imunopatogênese da COVID-19, verificando se este efeito protetor da enzima influencia a evolução e o prognóstico da doença.

Este projeto se justifica pela necessidade de entender os mecanismos imunológicos envolvidos na imunopatogênese de COVID-19. Já se sabe que a gravidade da doença deriva de uma resposta imune desbalanceada, que dispara uma hiperinflamação sistêmica, levando, então, ao dano tecidual, comprometimento da função pulmonar e outras consequências. A enzima IDO é um importante agente imunorregulatório, logo, avaliar a atividade de IDO no contexto de COVID-19 possibilita desvendar até que ponto esta enzima pode influenciar ou não a imunidade e o desfecho clínico nestes pacientes.

REFERENCIAL TEÓRICO

EPIDEMIOLOGIA

Primeiros casos

Os primeiros casos do que seria nomeada COVID-19 (do inglês, Coronavirus Disease 2019) foram primeiramente notificados em Wuhan, cidade localizada na província chinesa de Hubei. Inicialmente descrita como pneumonia idiopática, clínicos logo suspeitaram que o agente etiológico por trás desta doença era de natureza viral, devido, em grande parte, às características clínicas apresentadas pelos pacientes; incluindo elevação da temperatura corporal, depleção do número de linfócitos e infiltração pulmonar. Investigações moleculares conduzidas ainda em Wuhan revelaram, então, que o vírus em questão era pertencente à família dos coronavírus, com 79,6% de similaridade à variante SARS-CoV BJ01, que infecta humanos (Zhou et al. 2020).

Estudos filogenéticos posteriores destrincharam ainda mais a identidade e a origem deste novo coronavírus. Grupos de pesquisa distintos reportaram similaridades ainda maiores entre o novo coronavírus e outros oriundos de morcegos de regiões da China e sugeriram que a transmissão zoonótica tenha sido o veículo para as primeiras infecções (Wu et al. 2020; Zhu et al. 2020). A questão possibilidade de que ocorresse transmissão entre humanos foi finalmente esclarecida um pouco depois, quando Chan e colaboradores (2020) mostraram casos de infecção em indivíduos de uma mesma família, onde apenas duas pessoas haviam visitado o hospital de Wuhan durante uma viagem para a região. Outros relatos de indivíduos contraindo pneumonia causada pelo novo coronavírus de pessoas próximas que visitaram a região de Wuhan, mesmo na ausência de contato com animais ou alimentos contaminados, corroboraram para que se soubesse que o vírus era transmitido de pessoa para pessoa e a ameaça de um surto de SARS-CoV-2 ficou mais palpável (Yu et al. 2020).

Mesmo com a implementação de medidas de lockdown para impedir a circulação do vírus para além de Wuhan, logo todas as províncias chinesas já haviam registrado casos de COVID-19, ainda que os casos estivessem concentrados na região de Hubei (Chen et al. 2020a). Naquele momento, a maior parte das fatalidades ocorria em idosos e indivíduos com condições de saúde pré-existentes, como diabetes e cardiopatias. No resto da população, a doença

costumava se apresentar de forma mais branda, sem evoluir para forma grave, de forma que a mortalidade nestas pessoas era consideravelmente inferior à do grupo de risco (Wang et al. 2020a). Graças à grande circulação de pessoas e, portanto, de vôos internacionais na China, era questão de tempo que o surto causado pelo novo coronavírus logo se tornasse uma pandemia, percorrendo todas as partes do globo.

Transmissão global

O primeiro caso de COVID-19 fora do território chinês foi confirmado na Tailândia, em meados de janeiro de 2020. Um pouco depois, se confirmou o primeiro caso no Japão (Helmy et al. 2020). À medida que o número de infectados na China aumentava de forma alarmante e novos casos eram registrados em outros países, autoridades do mundo inteiro entraram em estado de alerta para conter o avanço da doença em seus respectivos territórios. A fim de diminuir o contato próximo entre pessoas e, portanto, reduzir a transmissão de SARS-CoV-2, vários países adotaram estratégias de lockdown em larga escala, além de medidas de testagem em massa e rastreamento de casos (Kissler et al. 2020). O lockdown no contexto de uma pandemia visa frear o surgimento de novos casos de maneira a evitar que os sistemas de saúde sejam sobrecarregados ao ponto de não conseguirem prestar assistência (Kissler et al. 2020).

Países como a Coreia do Sul, que além de reduzirem aglomerações e circulação de pessoas aplicaram intensas ações de testagem e rastreamento de casos, conseguiram eficientemente conter o alastramento de SARS-CoV-2 antes do colapso de hospitais e evitaram que o número de baixas fosse maior (Balilla, 2020). Contudo, alguns países experienciaram falência de seus sistemas de saúde diante do aumento massivo de demanda para atendimento em hospitais. Aliado a problemas estruturais pré-existentes, a pandemia de COVID-19 engatilhou uma reação em cadeia que culminou no colapso de redes de saúde ao redor do mundo; levando à incapacidade de atender às demandas, escassez de leitos em hospitais, falta de insumos médicos, sobrecarga de trabalho para profissionais de saúde e crise econômica a nível mundial (Armocida et al. 2020). Em fevereiro de 2021, 14 meses após o registro do primeiro caso de COVID-19, o número global de casos já ultrapassa 106 milhões, enquanto o número de mortes está em 2,3 milhões (WHO, 2021). A **figura 1** mostra Brasil, Argentina,

Uruguai, Suécia, Índia e França como alguns dos países que estão sendo atingidos mais fortemente pela pandemia de COVID-19 atualmente:

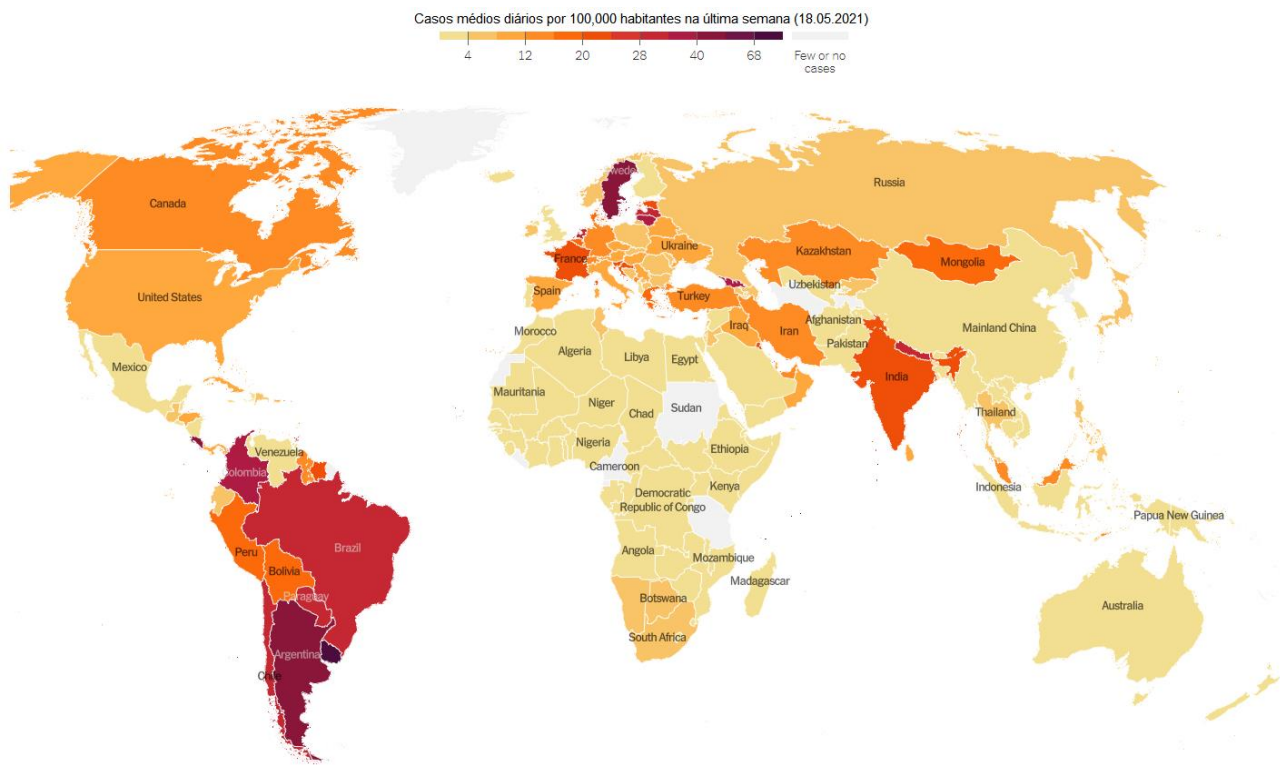


Figura 1: Mapa global de casos de COVID-19 registrados por país (18.05.2021). Fonte: New York Times, 2021 (adaptado).

Kissler e colaboradores (2020) apontam que a dinâmica de transmissão da COVID-19 tanto durante a pandemia quanto no período pós-pandêmico é dependente de múltiplos fatores; como a variação sazonal da transmissão, duração da imunidade adquirida e grau de imunidade cruzada entre SARS-CoV-2 e outros coronavírus circulantes. Os autores projetam que há possibilidades de SARS-CoV-2 se tornar um agente sazonal, ao qual estará em constante mutação e irá requerer imunização periódica. Desta forma, é importante que as autoridades mundiais em saúde permaneçam vigilantes, pois, mesmo após a vacinação em massa, é possível que ocorram surtos de COVID-19 no futuro próximo (Kissler et al. 2020).

No Brasil

Em fevereiro de 2020 se confirmou o primeiro caso de COVID-19 no Brasil, oriundo da Itália. Dados do Ministério da Saúde (2021) mostram um acumulado de mais 15,6 milhões de casos e 436 mil óbitos nacionalmente em maio de 2021, de acordo com as curvas de casos e fatalidades observadas nas **figuras 2 e 3**, respectivamente. Tal como em outros países, o Brasil adotou

estratégias de distanciamento social a fim de conter o avanço da pandemia e preservar o sistema de saúde público. Durante o período inicial de pandemia, mesmo com medidas de isolamento social e restrições ao transporte aéreo de passageiros, no Brasil observou-se que a transmissão se dava principalmente dentro das fronteiras dos estados a partir dos grandes centros urbanos (Candido et al. 2020).

Casos novos de COVID-19 por Semana Epidemiológica de notificação

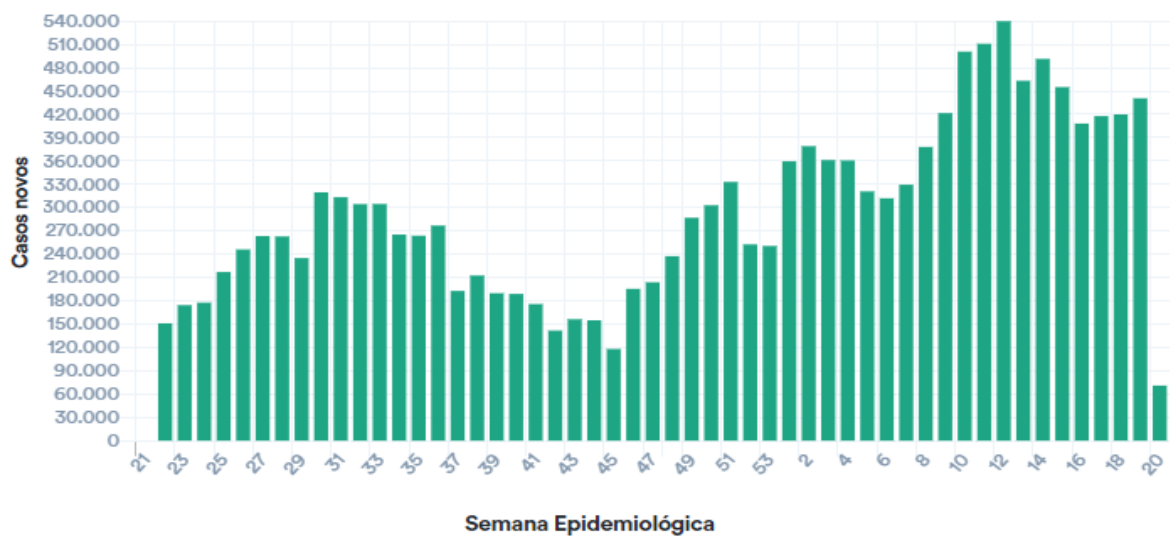


Figura 2: Curva de casos novos de COVID-19 no Brasil, por semana epidemiológica, de maio de 2020 a maio de 2021 (17.05.2021). Fonte: Ministério da Saúde, 2021.

Óbitos de COVID-19 por Semana Epidemiológica de notificação

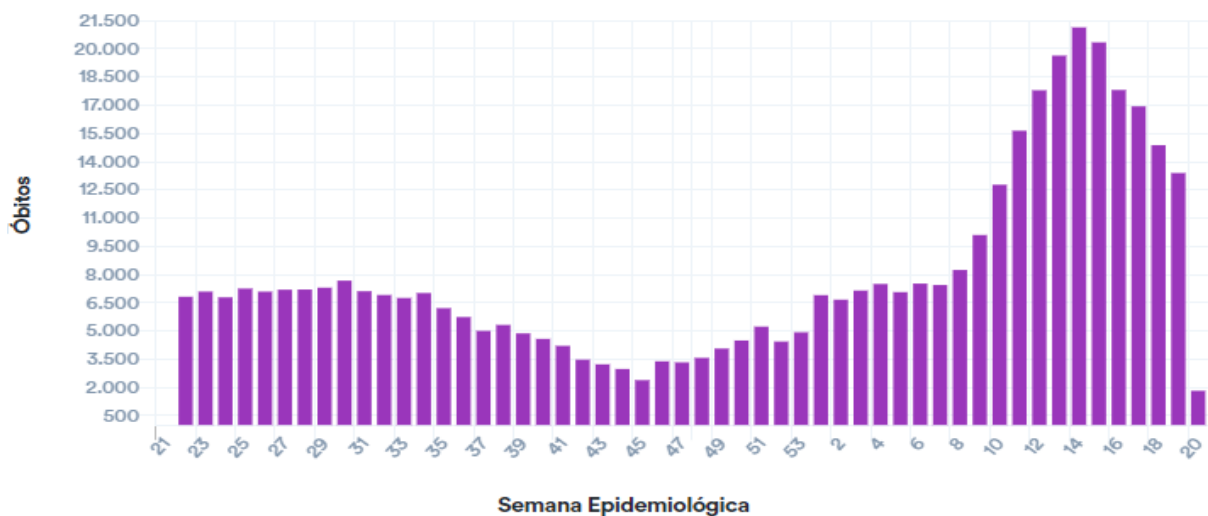


Figura 3: Curva de óbitos por COVID-19 no Brasil, por semana epidemiológica, de maio de 2020 a maio de 2021 (17.05.2021). Fonte: Ministério da Saúde, 2021.

De acordo com um modelo de disseminação de COVID-19 no país, o maior desafio para o sucesso das medidas de isolamento seriam as regiões de maior vulnerabilidade social, onde as condições de vida precária dificultam a adesão a protocolos de distanciamento e acesso à higiene. Este mesmo modelo projetou que a pandemia atingiria de modo mais agressivo as regiões Norte e Nordeste, regiões caracterizadas por disparidades socioeconômicas em relação ao resto do país, especialmente fora das regiões metropolitanas (Coelho et al. 2020).

A associação entre pobreza e vulnerabilidade à COVID-19 no Brasil fica ainda mais evidente com os dados do estudo sorológico nacional reportado por Hallal et al. (2020), onde os autores detectaram prevalência de anticorpos anti-SARS-CoV-2 igual ou superior a 10% em 16 cidades brasileiras, concentradas nas regiões Norte e Nordeste. Adicionalmente, Souza e colaboradores (2020), analisaram dados epidemiológicos, clínicos e demográficos correspondentes aos três primeiros meses de pandemia no Brasil e estimaram valor de 3.1 para número básico de reprodução (R_0) de SARS-CoV-2 nacionalmente, enquanto no estado do Amazonas este valor foi de 2.6.

O Amazonas, em especial, vem sendo atingido fortemente pela pandemia de COVID-19, com a maioria dos casos concentrados em Manaus. Após a confirmação do primeiro caso da doença, em março de 2020, o estado vivenciou intenso aumento de novos casos e mortalidade durante os meses de abril e maio, um dos maiores do país, seguido por períodos de queda e estabilidade até o fim do ano (Orellana et al. 2020). Durante este período, Buss e colaboradores (2021) estimaram uma taxa de ataque de 76% na região a partir de uma população de doadores de sangue em Manaus. Entretanto, a partir de dezembro, o número de casos e óbitos vêm crescendo no Amazonas e esta segunda onda tem se mostrado mais avassaladora que a primeira.

Diversas hipóteses surgiram para explicar a razão por esta ressurgência de casos e óbitos no Amazonas, desde redução ou perda total da imunidade humoral adquirida em primeiras infecções até a alta transmissibilidade de novas variantes de SARS-CoV-2 (Sabino et al. 2021). Uma destas novas linhagens, denominada P.1, foi detectada em Manaus e possui duas mutações pontuais (E484K e N501Y) no domínio de ligação ao receptor (RBD, em inglês) da proteína spike (S) de SARS-CoV-2, utilizada para entrada do vírus na célula. Esta linhagem foi detectada por PCR em 42% de amostras coletadas entre os

dias 15 e 23 de dezembro em Manaus e 91% de amostras obtidas em Janeiro de 2021, mas estava ausente em amostras de março a novembro de (Faria et al. 2021, Naveca et al. 2021). Este aumento acentuado na detecção de P.1 em relação a outras variantes de SARS-CoV-2 em Manaus, quando alinhado com as mutações em resíduos-chave da invasão celular pelo vírus observadas nesta linhagem sugerem que P.1 é altamente infecciosa e transmissível. Os efeitos a longo prazo destas observações nos desdobramentos epidemiológicos e na eficácia da vacinação para COVID-19 no Amazonas, no Brasil ou até mesmo no mundo ainda permanecem obscuros.

VIROLOGIA

Estrutura viral

Os integrantes da família dos coronavírus, à qual pertence o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), são vírus envelopados de RNA fita simples com sentido positivo e não-segmentado que, em humanos, costumam provocar infecções do trato respiratório, de resfriados comuns à síndrome respiratória aguda grave (SARS) e síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) (Brooks et al. 2014).

O genoma de SARS-CoV-2 compartilha 82% de similaridade com os coronavírus das epidemias de SARS e MERS, e esta similaridade é superior a 90% na sequência de proteínas estruturais e enzimas (Naqvi et al. 2020). Seu genoma também está organizado de maneira similar aos outros coronavírus: a partir da extremidade 5', dois terços do genoma viral codificam poliproteínas não-estruturais (Nsp, non-structural protein) enquanto o terço restante compreende as proteínas estruturais S (spike), E (envelope), M (membrana) e N (nucleocapsídeo) (Khailany et al. 2020). A **figura 4** ilustra a estrutura do vírion de SARS-CoV-2:

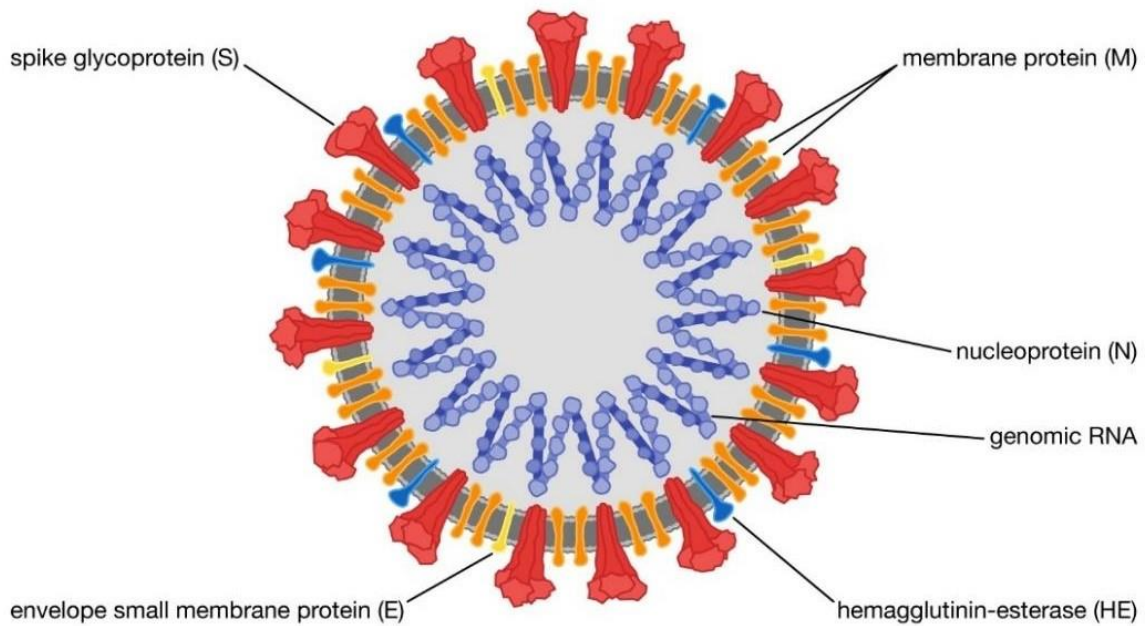


Figura 4: Estrutura geral de SARS-CoV-2, observando as proteínas estruturais N, S, E e M e o genoma de RNA. Fonte: Enciclopédia Britânica

Nos coronavírus, a proteína E funciona como canal iônico e participa da montagem e liberação de novos vírions (Ruch & Machamer, 2012), juntamente com a proteína M que também regula a topologia da membrana viral (Neuman et al. 2011). A proteína N de SARS-CoV-2 possui alta carga positiva, o que lhe permite interagir com o RNA viral por meio de interações eletrostáticas e formar o nucleocapsídeo. Esta proteína conta com dois domínios de ligação de RNA, localizados nas porções C- e N-terminais (Zeng et al. 2020).

Certamente, por estar diretamente exposta aos elementos da resposta imune e participar diretamente da invasão da célula-alvo pelo vírus, a proteína S vem sendo amplamente estudada quanto à sua estrutura, função e antigenicidade. S é uma glicoproteína que se apresenta na forma de trímero na superfície de SARS-CoV-2 e pode ser subdividida em duas subunidades: S1, encarregada de atuar na ancoragem da partícula viral ao receptor da célula-alvo, e S2, que media a fusão do vírion à membrana do hospedeiro (Herrera et al. 2020). O domínio de ligação ao receptor (RBD, em inglês) da proteína S de SARS-CoV-2 tem elevado grau de similaridade ao mesmo domínio na proteína de SARS-CoV, embora substituições de resíduos-chave na proteína S de SARS-CoV-2 ajudem a estabelecer uma ligação mais forte entre o domínio de ligação e o receptor do hospedeiro, em comparação a SARS-CoV (Lan et al. 2020; Wang et al. 2020b).

Entretanto, os graus de reatividade cruzada da proteína S permanecem elusivos. Wang e colaboradores (2020b) testaram a reatividade de um painel de anticorpos monoclonais anti-S1 de SARS-CoV e anticorpos policlonais anti-SARS-RBD e constataram que não houve reconhecimento da proteína S de SARS-CoV-2, ainda que as duas proteínas tenham alta grau de homologia nesta região. Similarmente, anticorpos policlonais anti-SARS S1 não foram capazes de bloquear a entrada de um pseudovírus de SARS-CoV-2 (Ou et al. 2020). Por outro lado, Walls et al. (2020) observaram bloqueio parcial da invasão de SARS-CoV-2 em cultura de células com anticorpos policlonais de pacientes convalescentes de SARS.

As demais proteínas virais que compõem o genoma são denominadas proteínas não-estruturais, uma vez que não estão presentes na estrutura do vírus. Ainda assim, tais proteínas são necessárias para a replicação viral e constituem fatores de virulência importantes. A abordagem genômica permitiu identificar as proteínas não-estruturais de SARS-CoV-2, e incluem uma RNA polimerase e outras proteínas que se ligam ao RNA viral e regulam a replicação; proteínas que degradam o RNA dos hospedeiros; proteases para clivar a poliproteína gerada após a tradução do mRNA viral; dentre outras (Naqvi et al. 2020).

Transmissão e ciclo infeccioso

A transmissão de SARS-CoV-2 de humano para humano ocorre, principalmente, por meio do contato próximo; através de gotículas expelidas das vias aéreas; e por meio do manuseio de superfícies contaminadas (Li et al. 2020; Chu et al. 2020). Além disso, a detecção de RNA viral no trato gastrointestinal sugere a possibilidade da rota fecal-oral como meio viável de transmissão (Ou et al. 2020).

Tal como em outras infecções virais, a infecção por SARS-CoV-2 requer que ocorra ligação entre uma proteína viral e uma proteína na superfície da célula-alvo, que servirá de receptor para a entrada do vírus na célula. O receptor de ligação de SARS-CoV-2 é a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2, em inglês), que também funciona como receptor para outros coronavírus conhecidos, como HCoV-NL63 (Hofmann et al. 2020) e SARS-CoV (Li et al. 2005), o que não surpreende, dada a elevada similaridade entre o sítio de ligação

ao receptor de SARS-CoV e SARS-CoV-2 (Lu et al. 2020). Um estudo recente mostra que ACE2 está amplamente presente em tecidos humanos, em variados graus de expressão (Li et al. 2020), e aponta o intestino delgado, rins, coração, tireoide, testículos e tecido adiposo como sítios onde os níveis de expressão de ACE2 são maiores, superando até mesmo os pulmões. o que implica outros possíveis tecidos-alvo para infecção por SARS-CoV-2.

Conforme dito anteriormente, as subunidades S1 e S2 da proteína S participam da ancoragem e fusão do envelope viral à célula do hospedeiro, respectivamente. Entretanto, para que a infecção seja consumada, é necessário que S seja proteoliticamente clivada, em um domínio rico em arginina localizado entre S1 e S2, por meio da atividade da serina protease TMPRSS2, na superfície celular (Hoffmann et al. 2020). Shang e colaboradores (2020a) também mostram que a entrada de SARS-CoV-2 na célula pode ser otimizada por meio da pré-ativação da proteína S por furina, particularmente em tipos celulares com baixa expressão de TMPRSS2 e/ou catepsinas lisossomais.

Quando dissociada de S1, a subunidade S2 pode assumir a conformação espacial necessária para invasão celular, iniciando, assim, a endocitose mediada por receptor da partícula viral. Evidências recentes mostram que a acidificação do endossoma é crucial para o prosseguimento da infecção por SARS-CoV-2, uma vez que bloquear farmacologicamente as bombas e canais iônicos, responsáveis por reduzir o pH no interior da vesícula, também previne a fusão do envelope viral e subsequente liberação do material genético do vírus no citoplasma (Ou et al. 2020).

No citoplasma, o RNA genômico (gRNA) funciona como mRNA e é logo traduzido nas poliproteínas virais, PP1a e PP1ab, que codificam as proteínas não-estruturais, e requerem clivagem proteolítica para originar as proteínas funcionais. A maioria das proteínas não estruturais estão, sobretudo, envolvidas na replicação viral. O maquinário replicativo de SARS-CoV-2 emprega uma RNA polimerase RNA-dependente e outras proteínas acessórias, gerando uma fita de mRNA de sentido negativo, de onde se originarão RNAs subgenômicos (sgRNA) e que servirá de molde para a síntese da fita de sentido positivo. Os sgRNAs são gerados a partir de regiões interespaçadas por sequências regulatórias transcricionais (TRS) na extremidade 3' da fita de RNA, e serão posteriormente traduzidos nas proteínas estruturais E, M, N e S. Todos estes eventos de

replicação acontecem ancorados em membranas derivadas do retículo endoplasmático (Romano et al. 2020).

Com as novas moléculas de gRNA e proteínas estruturais prontas, o ciclo infeccioso prossegue para a montagem do vírion a ser liberado pela célula, que também acontece no retículo endoplasmático. Durante a montagem, a proteína N deve se ligar fortemente ao gRNA, formando o ribonucleocapsídeo, enquanto M empacota a cápsula viral (Astuti & Yrasfil, 2020; Romano et al. 2020). Uma vez montado, o vírion se incorpora a uma vesícula de Golgi, e é liberado da célula via exocitose, reiniciando o ciclo (Shereen, 2020). A **figura 5** resume o ciclo infeccioso de SARS-CoV-2:

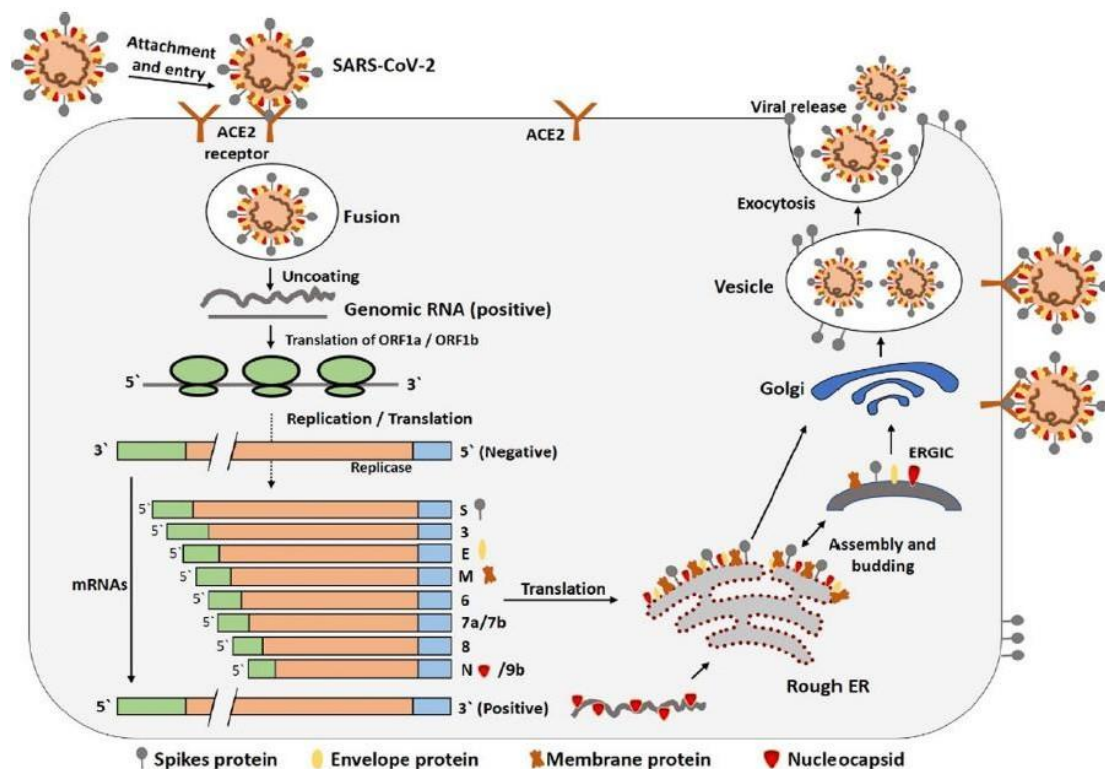


Figura 5: Ciclo de replicação de SARS-CoV-2. Fonte: Shereen et al. 2020.

Apresentação clínica

A apresentação clínica de COVID-19 pode ser expressa em um largo espectro; de pacientes graves em cuidado intensivo que requerem ventilação mecânica, passando por casos leves com sintomas similares à gripe ou resfriado, até pacientes assintomáticos.

De maneira geral, a sintomatologia de COVID-19 é similar à de outras infecções respiratórias, cujos sintomas mais característicos são tosse, febre e fadiga; e o período de incubação até o surgimento dos primeiros sintomas pode variar de 3 a 5 dias após a infecção. Faringite, perda de olfato e paladar, dor de cabeça e diarreia estão entre os outros sintomas reportados. (Grant et al. 2020;

Guan et al. 2020; Lovato & de Filippis, 2020). A evolução destes sintomas acompanha a progressão da doença, que começa no trato respiratório superior, se alastra para os pulmões e, eventualmente, pode chegar à circulação sistêmica, a partir de onde o vírus consegue infectar quaisquer células que expressem o receptor ACE2 (Li et al. 2020).

Aproximadamente 20% dos infectados por SARS-CoV-2 progridem para a forma grave de COVID-19, com desenvolvimento ou não de síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS), e precisam ser internados. Estes pacientes costumam apresentar dispnéia, frequência respiratória superior a 30 por minuto e saturação de oxigênio no sangue maior que 93%; podendo evoluir para falha respiratória, choque séptico e falência múltipla de órgãos, o que requer cuidados intensivos (WHO, 2020).

O grau de comprometimento dos pulmões pode ser acompanhado por métodos de imagem, como a tomografia computadorizada. Em pacientes graves, os achados radiológicos mais comuns são opacidade de vidro fosco e consolidação pulmonar (Figura 5), típicos de pneumonias virais, e afetam ambos os pulmões (Bernheim et al. 2020).



Figura 6: Tomografia computadorizada de paciente com COVID-19, um homem de 44 anos, com destaque para as opacidades de vidro fosco (setas), típicas dos achados radiológicos da doença. Fonte: Bernheim, 2020.

Análise de biomarcadores hematológicos, bioquímicos e imunológicos também oferecem importantes pistas e sinais sobre a evolução da doença em

cada paciente. Notadamente, há aumento acentuado no número de neutrófilos enquanto, paralelamente, se observa redução das populações de linfócitos; e esta razão neutrófilo/linfócito é diretamente proporcional à gravidade da doença (Shang et al. 2020b; Yan et al. 2020). A nítida elevação de marcadores séricos inflamatórios; como proteína C-reativa (CRP), IL-6 e procalcitonina; em pacientes graves indicam a ocorrência de uma reação inflamatória sistêmica nestes pacientes e podem ser utilizados como ferramenta de prognóstico (Bhagarva et al. 2020; Henry et al. 2020; Liu et al. 2020a; Ruan et al. 2020). Os níveis de lactato desidrogenase (LDH), marcador de morte celular, também estão aumentados em pacientes graves em comparação a pacientes leves, seja pelo efeito citotóxico do vírus quanto pelo dano tecidual oriundo da imunopatogênese (Henry et al. 2020).

Desenvolvimento de coagulopatias tem sido relatado em casos graves de COVID-19 e parecem acontecer principalmente em pacientes com injúria cardíaca (Shi et al. 2020). A metanálise conduzida por Lippi e colaboradores (2020) mostra redução considerável do número de plaquetas em pacientes graves, evidenciando quadro de trombocitopenia, e encontra correlação positiva entre baixo número de plaquetas e maior mortalidade. Ao mesmo tempo, a elevação dos níveis séricos de dímero D e a presença de depósitos ricos em plaquetas nos pequenos vasos do pulmão e outros órgãos em amostras de necrópsia apontam o envolvimento de tromboembolia na falência de múltiplos órgãos em COVID-19 grave (Levi et al. 2020). Quando comparado com avaliações histopatológicas de óbitos de influenza (H1N1), os achados de COVID-19 no pulmão são caracterizados por severo dano endotelial e trombose vascular generalizada com oclusão alveolar e microangiopatia, ainda que os padrões de dano alveolar difuso e infiltrado de células sejam similares (Ackermann et al. 2020).

Um ponto importante na evolução e gravidade de COVID-19 é a ocorrência de comorbidades. Três meta-análises independentes apontam hipertensão e diabetes como as comorbidades mais fortemente associadas à gravidade. Outras doenças relevantes incluem doenças respiratórias pré-existentes, obesidade e doença cardiovasculares e cerebrovasculares (Gold et al. 2020; Yang et al. 2020). Manifestações mais graves de COVID-19 também estão associadas à idade. Em um estudo retrospectivo na China, Wang e colaboradores (2020a) observaram que 70% dos idosos avaliados

desenvolveram doença grave e 19% faleceram, e que essas porcentagens eram consideravelmente maiores que as observadas na população geral com COVID-19. A pré-existência de outras comorbidades e as alterações fisiológicas e imunológicas decorrentes da própria velhice colaboram para que idosos sejam altamente suscetíveis à COVID-19 (Perrotta et al. 2020; Wang et al. 2020a).

Imunologia

Sendo uma doença nova, aspectos da resposta imune em COVID-19 ainda permanecem obscuros. Entender de que forma o organismo reage à infecção por SARS-CoV-2 permite traçar melhores estratégias terapêuticas e imunoproláticas, desvendando quais elementos da imunidade podem estar relacionados ao desenvolvimento da imunopatogênese, mas também funciona como ferramenta para se estabelecer perspectivas da evolução da pandemia dentro de um contexto epidemiológico.

Assim como ocorre com outros patógenos, a resposta imunológica a SARS-CoV-2 começa a partir do reconhecimento de Padrões Moleculares Associados ao Patógeno, do vírus, ou de Padrões Moleculares Associados ao Dano, do hospedeiro, por Receptores de Reconhecimento de Padrão marcando o início da resposta imune inata. Os receptores de reconhecimento de padrão são um grupo vasto de receptores responsáveis por reconhecer estruturas conservadas entre os grandes grupos de agentes patogênicos e podem ser encontrados tanto nas membranas celulares quanto atuando como sensores citosólicos; estando presentes em macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células epiteliais, entre outros. A ativação dos receptores por padrões dispara uma cascata de sinalização celular e culmina na expressão de citocinas e quimiocinas, que iniciam a resposta imunológica (Abbas et al. 2015).

Os receptores do tipo Toll (TLRs) são os receptores da imunidade inata mais bem estudados, e estão localizados na superfície da célula e nas membranas intracelulares. RNA de fita simples, como o de SARS-CoV-2, ativa TLR7 (presente principalmente em células dendríticas plasmocitoides) e TLR8 (característico de monócitos e células dendríticas mieloides), ambos presentes na membrana endossomal (Moreno-Eutimio et al. 2020). Estes receptores iniciam a via sinalizatória dependente de MyD88, ativando MAPKs, o fator de transcrição NF- κ B, promovendo, então, a expressão de genes inflamatórios.

(Kawasaki & Kawai, 2014). A família de receptores citosólicos de RIG-I (receptores do tipo RIG, RLRs), também são cruciais para iniciar a resposta inata antiviral e são capazes de reconhecer o RNA de SARS-CoV-2, ativando a produção de interferons e estabelecendo um estado antiviral (Loo & Gale Jr., 2011).

Sendo as vias aéreas a rota de transmissão mais comum de SARS-CoV-2, a resposta imunológica é iniciada nos pulmões, principalmente por células dendríticas residentes e macrófagos intersticiais e alveolares, além das células epiteliais alveolares do tipo I e II. Estas células residentes constituem a primeira linha de defesa imunológica em infecções pulmonares (Abassi et al. 2020). Estudos in vitro de SARS mostram que células epiteliais e mielóides do pulmão produzem citocinas e quimiocinas inflamatórias mediante engajamento de seus receptores inatos. Curiosamente, além do RNA viral, proteínas estruturais de coronavírus também disparam resposta inflamatória em células mielóides e epiteliais mediada por TLRs, tal como observado em SARS, com produção de interferons e interleucinas (Dosch et al. 2009; Wang & Liu, 2016). Shi e colaboradores (2019) mostraram que a proteína ORF8b de SARS-CoV induz a montagem de inflamassoma em macrófagos, por meio de interações com NLRP3, induzindo à produção e liberação de IL-1 β e IL-18. Similarmente, o estudo de Rodrigues et al. (2020) indica que SARS-CoV-2 também induz à formação do inflamassoma dependente de NLRP3, e que sua ativação está associada à necessidade de ventilação mecânica e à letalidade em COVID-19.

Estudos que acessam o estado imunológico de pacientes com COVID-19 reportam níveis elevados de diversas citocinas e quimiocinas; como TNF- α , IL-2, IL-12, IL-6, IL-10, IP-10, MCP1, entre outras e associam esta elevação à gravidade (Huang et al. 2020.; Liu et al. 2020). Tal como nas epidemias de SARS e MERS, a elevação de citocinas pró-inflamatórias em COVID-19 tem sido referida como uma “tempestade de citocinas”, uma produção descontrolada de múltiplos fatores inflamatórios indicativa de uma resposta imune inata desbalanceada e agressiva e que impulsiona a progressão da imunopatologia (Wang et al. 2020a).

A interleucina 6, em especial, é um dos mediadores mais importantes na progressão da inflamação sistêmica observada em COVID-19 e seus níveis têm sido utilizados como marcadores de severidade e desfecho clínico (Coomes & Haghbayan, 2020; Han et al. 2020; Herold et al. 2020). IL-6 é uma citocina de

fase aguda cujo espectro de ação imunofisiológico inclui diferenciação de macrófagos (Chomarat et al. 2000); estímulo da secreção de IgG por linfócitos B (Maeda et al. 2010); produção de prostaglandina e subsequente elevação da temperatura corporal (Eskilsson et al. 2014); polarização da resposta T auxiliar direcionada ao perfil Th2, com supressão de respostas Th1 antivirais (Diehl & Rincón, 2002); e diferenciação de linfócitos Th17 com supressão de células T reguladoras (Kimura & Kishimoto, 2010).

Dada esta relevância, o uso clínico de tocilizumabe, anticorpo monoclonal inibidor do receptor de IL-6 (IL6R), pode verificar a eficácia de bloquear a sinalização de IL-6 no desfecho clínico de pacientes com COVID-19 grave. Elmer e colaboradores (2020) verificaram retrospectivamente que o uso do bloqueador abreviou o tempo de uso de ventilação mecânica, de cuidado intensivo e de estadia no hospital. Outro estudo retrospectivo, de Patel et al. (2020), mostra que após 7 dias de tratamento houve redução de marcadores séricos de hiperinflamação em relação a pacientes que não foram tratados com o medicamento e que o uso de tocilizumabe está associado a um bom desfecho. Redução da mortalidade também foi relatada em outros estudos retrospectivos (Biran et al. 2020; Guaraldi et al. 2020).

Os mecanismos por trás do desbalanço da imunidade provavelmente estão relacionados à incapacidade do sistema imune de montar uma resposta antiviral capaz de eficientemente restringir a replicação do vírus ainda no início da infecção ao mesmo tempo em que dispara mecanismos pró-inflamatórios. (Ye et al. 2020). Experimentos in vitro com cultura de monócitos, macrófagos e células dendríticas mostram que, inicialmente durante infecção por SARS-CoV e MERS-CoV, há um delay na produção de citocinas. Após um tempo, se observou forte indução de quimiocinas recrutadoras de neutrófilos e macrófagos e de citocinas pró-inflamatórias, mas baixos níveis de interferons (Law et al. 2005; Cheung et al. 2005; Lau et al. 2013). Outro estudo de SARS destaca que a administração de interferon do tipo I exógeno a camundongos infectados antes do pico da carga viral conferiu proteção contra SARS grave e otimizou o controle da infecção, o que não foi observado nos animais que receberam interferon após o pico da viremia, e evidencia o aspecto temporal da resposta antiviral e seus impactos no desfecho da infecção (Channappanavar et al. 2016). Estes modos de indução de citocinas pró-inflamatórias ao mesmo tempo em que prejudica o

estabelecimento de um estado antiviral são, além de responsáveis pela imunopatogênese, mecanismos de evasão da imunidade.

Os interferons são as moléculas-chave da imunidade contra vírus e demais patógenos intracelulares e estão divididos em três tipos (I, II e III), classificados de acordo com o tipo de receptor a que servem como agonistas. A ativação de receptores imunes durante os primeiros momentos de uma infecção viral logo inicia a produção de interferons, que, por sua vez, promovem a expressão dos Genes Estimulados por Interferon (ISGs). Muitos dos produtos codificados pelos ISGs são importantes proteínas antivirais, que agem interferindo na replicação viral, transcrição de fatores de virulência, montagem e liberação de partículas infecciosas e produção de moléculas antivirais, como o óxido nítrico. Além de dispararem mecanismos intracelulares contra estes patógenos, os interferons também estimulam diretamente a ativação de células imunes, como macrófagos e células dendríticas (McNab et al. 2015; Lee & Ashkar, 2018).

Sendo elementos tão cruciais da defesa contra vírus, é natural que os coronavírus tenham evoluído estratégias de evasão da resposta imune mediada por interferons. Nos coronavírus humanos, como SARS-CoV e MERS-CoV, estas estratégias podem consistir em impedir o reconhecimento do vírus por receptores inatos que iniciam a indução de interferons (Chen et al. 2009), inibir a translocação nuclear dos fatores de transcrição que regulam sua expressão, como IRF3 (Yang et al. 2013) e STAT1 (Frieman et al. 2007), bem como reprimir diretamente a função efetora dos ISGs (Thornbrough et al. 2016). Recentemente, Konno e colaboradores (2020) mostraram que a ORF3b de SARS-CoV-2 é um potente antagonista da sinalização de IFN-I, ainda mais que a proteína homóloga de SARS-CoV, sugerindo que estes mecanismos podem estar por trás da limitada indução de interferons do tipo I e III observada tanto em pacientes com COVID-19 quanto em cultura de células *in vitro* (Blanco-Melo et al. 2020). Há também uma forte associação entre baixos níveis de IFN-I, a persistência da viremia e a inflamação exacerbada observada em COVID-19 severa (Hadjadj et al. 2020).

Em conjunto, estas informações salientam de que forma a infecção por SARS-CoV-2 induz ao desbalanço da imunidade inata, caracterizado por uma escassa resposta antiviral associada à elevada inflamação. Este desbalanço impacta diretamente no desfecho clínico da doença e na progressão da

imunopatologia, de maneira que estratégias terapêuticas para manejo de COVID-19 devem levar em conta esta hiperinflamação sistêmica disparada por SARS-CoV-2.

IDO e metabolismo do triptofano

A indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) é uma enzima citosólica que catalisa a primeira etapa do catabolismo de L-triptofano (TRP): a quebra da ligação do anel indol na posição 2,3 do aminoácido, gerando N-formilquinurenina, que é espontaneamente convertida em quinurenina (KYN) (Hornyák et al. 2018). As duas isoformas de IDO (IDO1 e IDO2) estão bastante próximas genética e estruturalmente mas diferem no padrão de expressão e cinética. Enquanto IDO1 é expressa em diversos tecidos e tipos celulares, IDO2 está restrita a células apresentadoras de antígeno, além de fígado e rins (Merlo & Mandik-Nayak, 2016). IDO1 também é mais catabolicamente ativa e eficiente na conversão de triptofano em quinurenina (Bilir & Sarisozen, 2017) e é expressa em maiores níveis que IDO2 (Ball et al. 2007).

A expressão e atividade de IDO é regulada por mecanismos e vias distintos, mas redundantes. A nível de transcrição, a expressão de IDO é regulada principalmente pela via de sinalização de IFN- γ com envolvimento de NF- κ B, que ativa a transcrição do gene IDO1 (Robinson et al. 2006), como um mecanismo de controle da resposta inflamatória. Ainda na regulação transcricional, a expressão de IDO também é controlada pelo receptor aril hidrocarboneto (AhR) (Vogel et al. 2013) que tem quinurenina como agonista, indicando um mecanismo de retroalimentação positiva para a expressão de IDO.

A função de IDO na regulação da imunidade ficou conhecida inicialmente ao se reconhecer seu papel de molécula mediadora da tolerância materno-fetal na placenta através do catabolismo do triptofano (Munn et al. 1998). Posteriormente, se observou que IDO1 é demasiadamente expressa em macrófagos de variados tecidos mediante sinalização de IFN- γ e que os produtos do catabolismo de triptofano são capazes de estabelecer um estado de imunossupressão (Munn & Mellor, 2013).

O produto da reação catalisada por IDO, quinurenina, age como indutor da diferenciação de linfócitos T em células T reguladoras (Tregs) de maneira AhR-dependente (Mezrich et al. 2010). As Tregs são uma subpopulação de

linfócitos T CD4+ que atuam suprimindo respostas imunológicas antes que haja dano ostensivo ao hospedeiro e contribuem para manutenção da homeostasia. Estas células são caracterizadas por elevada produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e pela expressão do fator de transcrição FoxP3 (forkhead-box P3), que governa todas as suas funções regulatórias (Alroqi & Chatila, 2016). Adicionalmente, Pour e colaboradores (2019) observaram redução da proliferação e sinais de exaustão em linfócitos T CD4+ mediadas por metabólitos da via de quinurenina em melanoma, e apontam este mecanismo adicional de inibição da resposta imunológica por IDO. Portanto, IDO e o catabolismo de triptofano estão intrinsecamente associados à geração e função de Tregs (Yan et al. 2010; Lippens et al. 2016) e à inibição de respostas T efetoras, participando no estabelecimento de um ambiente imunossupressor, tal como ilustrado na **figura 7**, abaixo:

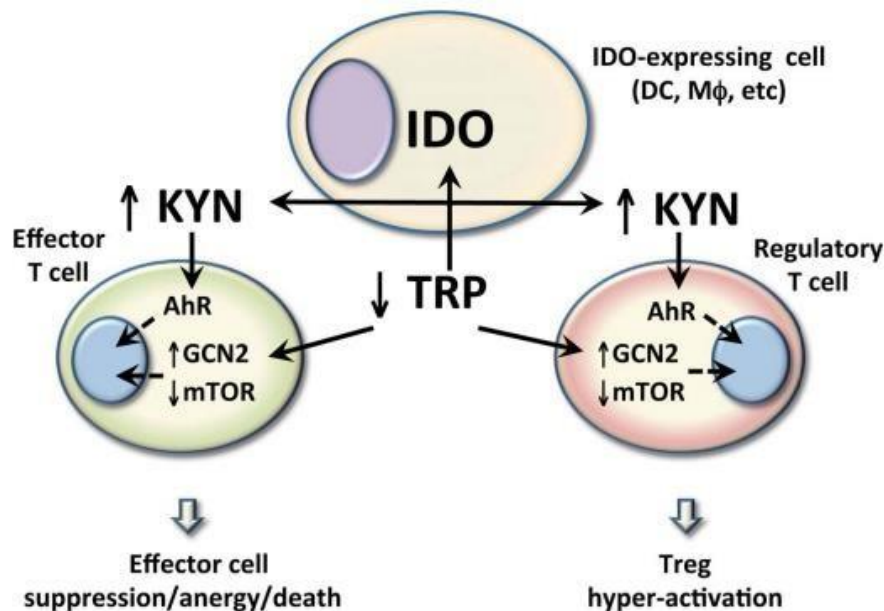


Figura 7: Modelo da ação de IDO sobre a resposta imunológica. Mediante engajamento de AhR e outros sensores de aminoácidos, quinurenina gerada pela enzima ativa células T reguladoras ao mesmo tempo que suprime respostas de linfócitos T CD4+ efetores. Fonte: Munn & Mellor, 2013..

Ainda que a função de IDO tenha implicações fisiológicas importantes relacionadas à tolerância periférica e ao controle das respostas imunes, o aumento de sua atividade se associa à persistência e agravamento de patologias. Hoje, se reconhece a expressão aumentada de IDO como um fator de prognóstico negativo em variados tipos de câncer pois permite que as células tumorais escapem dos mecanismos efetores da imunidade (Katz et al. 2008). Fenômeno similar pode ser observado em doenças infecciosas; tais como tuberculose (Suzuki et al. 2012), dengue (Geisler et al. 2020) e HCV (Asghar et

al. 2015); onde aumento da expressão e atividade de IDO está associado à redução do controle da infecção pelo sistema imunológico e persistência do agente etiológico.

No pulmão, o papel de IDO permanece complexo. Camundongos tratados com um antagonista de IDO, 1-metilriptofano, apresentaram atenuação de replicação de *Toxoplasma gondii* nos pulmões, mostrando que a atividade desta enzima pode deter a depuração de infecções pulmonares (Murakami et al. 2012). Achados similares com vírus Influenza mostram que ativação de IDO nos pulmões está conectada a maior restrição da resposta efetora de células T, morbidade e retardo na recuperação (Fox et al. 2013; Huang et al. 2013)

Por outro lado, estudos sustentam que a sinalização IDO-AhR protege o pulmão contra inflamação aguda, prevenindo a evolução da imunopatologia, de maneira dependente de interferon (Lee et al. 2017). Similarmente, Rajan et al. (2017) propõe que IDO funcione em sinergia com IFN- γ na resolução de infecção pelo vírus sincicial respiratório (RSV), em um balanço afinado que equilibra a resposta antiviral mediada por interferons e o efeito anti-inflamatório protetor de IDO.

Até o momento, poucos trabalhos acessaram a atividade de IDO no contexto de COVID-19. Thomas e colaboradores (2020) detectaram alterações significativas na via das quinurenina em pacientes COVID-19 em comparação ao grupo controle e isso estava diretamente relacionado ao aumento de marcadores inflamatórios como IL-6 e proteína C reativa. Igualmente, Em conjunto, estes achados levantam a hipótese de que a atividade de IDO possa ter papel relevante no contexto da inflamação pulmonar severa observada em COVID-19 grave.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Elucidar a atividade da enzima indolamina-2,3-dioxigenase em pacientes leves e graves com COVID-19.

Objetivos Específicos:

Quantificar quinurenina e triptofano no soro/plasma de pacientes COVID- 19 por HPLC;

Correlacionar as medidas dos metabólitos com dados de gravidade, alta e óbito e marcadores inflamatórios;

Detectar a presença de IDO em amostras de necrópsia pulmonar de pacientes por métodos de imunohistoquímica;

MATERIAL E MÉTODOS

Aprovação ética

O projeto que prevê a coleta de amostras de pacientes leves e graves e de controles saudáveis que fazem parte deste projeto, bem como a coleta de amostras de necrópsia, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sob o número CAAE 32415220.9.0000.9167.

Coleta de amostras

As amostras de pacientes com COVID-19 foram fornecidas pela equipe do ensaio clínico CloroCovid-19, realizado no hospital Delphina Rinaldi Abdel Aziz em Manaus – AM durante o primeiro semestre de 2020. Todos os pacientes admitidos neste estudo tiveram diagnóstico de COVID-19 confirmado por RT-PCR. As amostras de sangue foram coletadas em um tubo de EDTA e/ou de gel separador, a fim de se obter células sanguíneas e plasma/soro. Adicionalmente, se obteve amostras de autópsia de pulmão de pacientes que foram a óbito no hospital, também processadas e fornecidas pela equipe do projeto. Por sua vez, as amostras de sangue de controles saudáveis foram coletadas em tubos de EDTA, para obtenção de células e plasma, logo no início dos casos em Manaus, com confirmação da ausência de exposição destas pessoas a SARS-CoV-2 confirmada por ELISA (IgG/IgA).

Para este trabalho, serão utilizadas amostras oriundas de pacientes leves e graves, com desfecho clínico de óbito ou alta. Por “paciente grave” entende-se paciente que ficou internado, na UTI ou não, no hospital Delphina Aziz, enquanto pacientes leves apenas foram avaliados em uma Unidade de Pronto Atendimento – UPA em Manaus, sem internação. Os pacientes graves incluídos podem possuir amostras coletadas longitudinalmente em três dias diferentes após a internação: D1, D5/D7 e D11/D14. Por sua vez, apenas amostras de D1 foram coletadas de pacientes leves atendidos na UPA. Além de fornecerem amostras, a equipe do projeto CloroCovid-19 forneceu dados clínicos e laboratoriais, coletados durante a estadia dos pacientes no hospital ou no momento da entrevista e adesão na UPA (para pacientes leves).

Quantificação de KYN e TRP

A fim de observar a variação de quinurenina ao longo do curso da doença, se quantificarão os níveis KYN e TRP presentes no soro/plasma de pacientes leves no D1; graves em D1, D7 e D11/D14 e controles saudáveis por

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Para isto, às amostras adicionou-se 8% de ácido perclórico, seguido de agitação em vórtex e três ciclos de centrifugação a 5000 rpm, durante 10 minutos a 4°C (Wang & Tang, 2006). Posteriormente, 20 µL de cada amostra foram injetados em coluna de fase reversa Luna C-18 (Nº AJO- 38368 Gemini-NX C-18 4x3, Allcrom), em 20 minutos de corrida por amostra e fluxo de 1 mL/min da fase móvel (tampão de acetonitrila e ácido acético, pH=4). Para quantificar os níveis dos metabólitos a partir dos picos no HPLC, a equação da reta foi obtida a partir da corrida de uma série de padrões TRP/KYN nas diluições 100/10, 50/5, 25/2.5, 12.5/1.25 e 6.25/0.625. Com a equação da reta em mãos, pôde-se encontrar valores numéricos dos níveis de KYN e TRP nas amostras de soro/plasma de pacientes. Além de anotar os valores para KYN e TRP de cada amostra, se usou a razão KYN/TRP como forma de mensurar indiretamente a conversão de triptofano em quinurenina e, portanto, a atividade de IDO em cada paciente.

Imunohistoquímica

A marcação de IDO em amostras de necrópsia de pacientes COVID-19 foi realizada por métodos de imunohistoquímica. Uma vez que não foi feita marcação de IDO em amostras controle para comparação com o grupo de pacientes COVID-19, a imunohistoquímica realizada tem objetivo puramente exploratório e descritivo. Os pulmões dos pacientes foram fixados em solução tamponada de formalina 10% e então seccionados para obtenção de cortes histológicos. As amostras de tecido foram, então, submetidas a calor úmido e pressão para recuperação de epítomos antigênicos utilizando solução Trilogy® (Cell Marque). Em sequência, se utilizou como anticorpo primário o anticorpo policlonal de coelho ab106134 (ABCAM) anti-IDO, na diluição de 1:100 em PBS-Tween 20 0.05%. As demais etapas de inativação de peroxidase endógena, bloqueio de proteínas não específicas e detecção empregaram o kit Novolink Polymer Detection System (Leica), conforme instruções do fabricante.

Imagens dos cortes histológicos marcados foram obtidas em sistema de microscopia óptica Axiophot utilizando câmera Axiocam Mc5 e campos aleatórios das seções foram fotografados utilizando tempos de exposição e intensidade de luz idênticos. A seguir, as imagens foram baixadas para o software FIKI/ImageJ e foram submetidas a processo de deconvolução de cor

utilizando vetor DAB H para identificação do canal de DAB. Complementarmente, se aplicou filtro Gaussiano com o intuito de reduzir a interferência de fundo nas imagens.

Análise Estatística

Análises estatísticas serão executadas no software GraphPad Prism 8. Quanto às quantificações de quinurenina, triptofano e razão KYN/TRP, bem como comparações entre os valores de variáveis dos hemogramas e citocinas, se realizou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação entre os três grupos de pacientes (leves, graves e controles saudáveis) e teste Mann-Whitney ao comparar dois grupos (pacientes leves versus graves ou alta versus óbito). As análises de dias de sintomas dentro do grupo de pacientes foram feitas por teste Two-Way ANOVA. Por sua vez, as análises de correlação realizadas empregaram teste de correlação de Spearman e o score com os valores de predição das variáveis para COVID-19 leve e grave ou alta e óbito foi realizado por meio de análise de curva ROC, anotando os valores de área sob a curva (AUC). A significância estatística será definida mediante $P < 0.05$.

RESULTADOS

Dados demográficos e parâmetros clínico-hematológicos

Este trabalho incluiu amostras de pacientes graves (n=150), internados no hospital Delphina Aziz e sujeitos a acompanhamento longitudinal, pacientes leves não internados (n=107) e controles saudáveis (n=13), cuja ausência de exposição a SARS-CoV-2 foi confirmada através de detecção por ELISA de IgA/IgG anti-N.

A **tabela 1** resume os dados demográficos dos pacientes incluídos neste estudo. A idade média do grupo de pacientes graves foi superior à dos outros dois grupos, em especial do grupo de pacientes leves, que registrou a menor média de idade. No grupo grave, encontrou-se prevalência de pacientes do sexo masculino (65,24%), enquanto o grupo de pacientes leves exibiu maioria de pacientes mulheres (59,81%). Dentre o grupo grave, aproximadamente 51,07% dos pacientes com desfecho conhecido se recuperaram e obtiveram alta do hospital, enquanto os outros 48,93% foram a óbito. Neste mesmo grupo, o tempo médio de internação foi 11,82 dias. Similarmente, o tempo médio entre o surgimento dos primeiros sintomas e a internação foi de aproximadamente 11,53 dias nos pacientes graves, contra 10,93 dias entre primeiros sintomas e atendimento na unidade de pronto-atendimento para pacientes leves.

A existência de comorbidades é fator de risco relacionado à progressão da COVID-19 grave e influencia o desfecho clínico da doença. Neste estudo, apenas 13,48% dos pacientes graves não eram portadores de pelo menos uma comorbidade ou não apresentaram hábito que constituísse fator de risco (como tabagismo), enquanto no grupo de pacientes leves este valor foi de 17,76%.

Tabela 1: Dados epidemiológicos dos controles saudáveis e pacientes leves e graves com COVID-19.

	Controles (n=13)	Leves (n=107)	Graves (n=150)
Idade	53,61 ± 15,06	40,28 ± 10,7	55,37 ± 15,1
Sexo (Masculino, %)	5 (38,46%)	45 (42,05%)	92 (65,24%)
Dias de sintomas	--	11,14 ± 8,9	11,53 ± 5,34
Desfecho (Óbito, %)	--	--	69 (48,93%)
Dias de internação	--	--	11,82 ± 7,68
Presença de comorbidades	--	88 (82,24%)	122 (86,52%)

Dados representados por média ± desvio padrão. N=número de indivíduos.

A **tabela 2** exprime os parâmetros laboratoriais dos grupos de amostras referentes ao dia de recrutamento (D1). Nota-se que não foi possível obter dados de todos os pacientes inclusos no estudo.

Tabela 2: Parâmetros laboratoriais em controles saudáveis e pacientes leves e graves com COVID-19 no dia do recrutamento (D1).

	Controles (n=13) ^A	Leves (n=24) ^B	Graves (n=70) ^C	P ^{AB}	P ^{BC}	P ^{AC}
Hemoglobina (g/dL)	16,79 ± 3,18	12,68 ± 1,57	12,41 ± 1,69	0.0029	0.0357	<0.0001
Hematócrito (%)	45,24 ± 8,26	40,22 ± 5,52	39,32 ± 5,57	>0.9999	0.0088	0.0227
Plaquetas (10 ³ /mm)	172,77 ± 55,60	300,42 ± 121,98	292,99 ± 114,7	0.0004	>0.9999	0.0003
ALT (U/L)	--	73,6 ± 87,76	72,84 ± 84,62	--	0.5114	--
AST (U/L)	--	56,39 ± 62,33	61,6 ± 71,06	--	0.2245	--
Glicose (mg/dL)	--	--	203,93 ± 84,73	--	--	--
Creatinina (mg/dL)	--	1,31 ± 1,33	1,48 ± 1,49	--	0.4397	--
Ureia (mg/dL)	--	51,72 ± 58,68	58,21 ± 60,44	--	0.0099	--
LDH (U/L)	--	--	709,14 ± 781,44	--	--	--
CRP (mg/dL)	--	--	224.83 ± 501,38	--	--	--

Dados representados por média ± desvio padrão. Os valores de P<0.05 estão destacados em negrito. N: número de indivíduos. Valores de p obtido por teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ou teste não-paramétrico de Mann-Whitney quando comparando apenas grupos de pacientes leves e graves.

Os valores de hemoglobina estavam significativamente reduzidos nos pacientes COVID-19 em relação aos controles saudáveis. Dentre os pacientes, observou-se que este valor também foi significativamente inferior em pacientes graves em relação a pacientes leves. Já percentual de hematócrito foi menor em pacientes graves tanto em relação aos controles quanto aos pacientes leves, mas, todavia, não se encontrou significância entre estes dois últimos. Por outro lado, ambos os grupos de pacientes exibiram aumento no número de plaquetas quando comparados aos controles saudáveis, sem haver, contudo, diferença entre os dois grupos de pacientes. Finalmente, dentre os grupos de pacientes analisados, detectou-se elevação nos valores de ureia no grupo de pacientes graves em relação aos outros.

A **tabela 3** mostra os valores da dosagem de citocinas no soro e plasma de pacientes COVID-19 realizada por CBA, referentes ao dia de inclusão no estudo (D1). Se mensurou o nível de citocinas envolvidas nos diferentes perfis de resposta de linfócitos T auxiliares e de quimiocinas envolvidas na quimiotaxia de células imunológicas.

Tabela 3: Níveis de citocinas séricas em controles saudáveis e pacientes leves e graves com COVID-19 no dia do recrutamento (D1).

	Controles (n=13) ^A	Leves (n=27) ^B	Graves (n=76) ^C	p ^{AB}	p ^{BC}	p ^{AC}
IL-2 (pg/mL)	1,572±1,592	0,9 ± 0,821	1,186 ± 1,287	0.6265	>0.9999	0.9599
IL-4 (pg/mL)	1,703 ± 0,684	0,695 ± 0,693	0,969 ± 0,846	0.1508	0.4180	0.8162
IL-6 (pg/mL)	2,503 ± 1,777	29,804 ± 82,847	315,073 ± 748,191	0.2402	<0.0001	<0.0001
IL-10 (pg/mL)	0,648 ± 0,466	1,684 ± 1,681	8,074 ± 23,735	0.1820	0.0049	<0.0001
IL-17 (pg/mL)	4,09 ± 3,178	3,53 ± 2,574	3,515 ± 3,636	>0.9999	>0.9999	>0.9999
IFN-γ (pg/mL)	0,336 ± 0,484	0,883 ± 1,776	0,88 ± 1,247	0.7594	>0.9999	0.3061
TNF (pg/mL)	0,782 ± 0,675	0,632 ± 0,322	0,7 ± 0,453	>0.9999	>0.9999	>0.9999
IP10 (pg/mL)	81,922 ± 39,369	185,802 ± 195,375	557,565 ± 509,02	0.4188	0.0012	<0.0001
MCP-1 (pg/mL)	81,965 ± 251,736	32,836 ± 29,873	114,798 ± 175,069	0.4095	0.2130	0.0075
MIG (pg/mL)	56,52 ± 62,782	51,118 ± 70,804	238,354 ± 341,451	>0.9999	0.0003	0.0129
IL-8 (pg/mL)	2,169 ± 1,149	11,488 ± 16,363	29,082 ± 48,133	0.0092	0.1221	<0.0001

Dados representados por média ± desvio padrão. Os valores de P<0.05 estão destacados em negrito. N: número de indivíduos. Valores de p obtido por teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

A dosagem de citocinas circulantes por CBA mostrou elevação significativa de IL-6 e IL-10 em pacientes com COVID-19 grave em relação ao grupo de pacientes leves e controles saudáveis, sustentando a noção de que estas citocinas estejam envolvidas na desregulação da resposta imune observada na doença grave. Similarmente, todas as quatro quimiocinas dosadas para este trabalho estavam marcadamente aumentadas em pacientes COVID-19 grave em relação aos controles. Algumas destas, como IP10 e MIG também mostram diferença significativa entre os grupos de pacientes leves e graves.

Adicionalmente, se comparou as populações de células sanguíneas entre os três grupos de amostras supracitados (**fig. 8**). Conforme o esperado, analisando a quantidade de células referente ao dia de inclusão (**fig. 8A**), pacientes graves exibiram maior número de leucócitos em relação aos outros dois grupos. Mesmo assim, a população de monócitos circulantes não se alterou entre os três grupos de estudo.

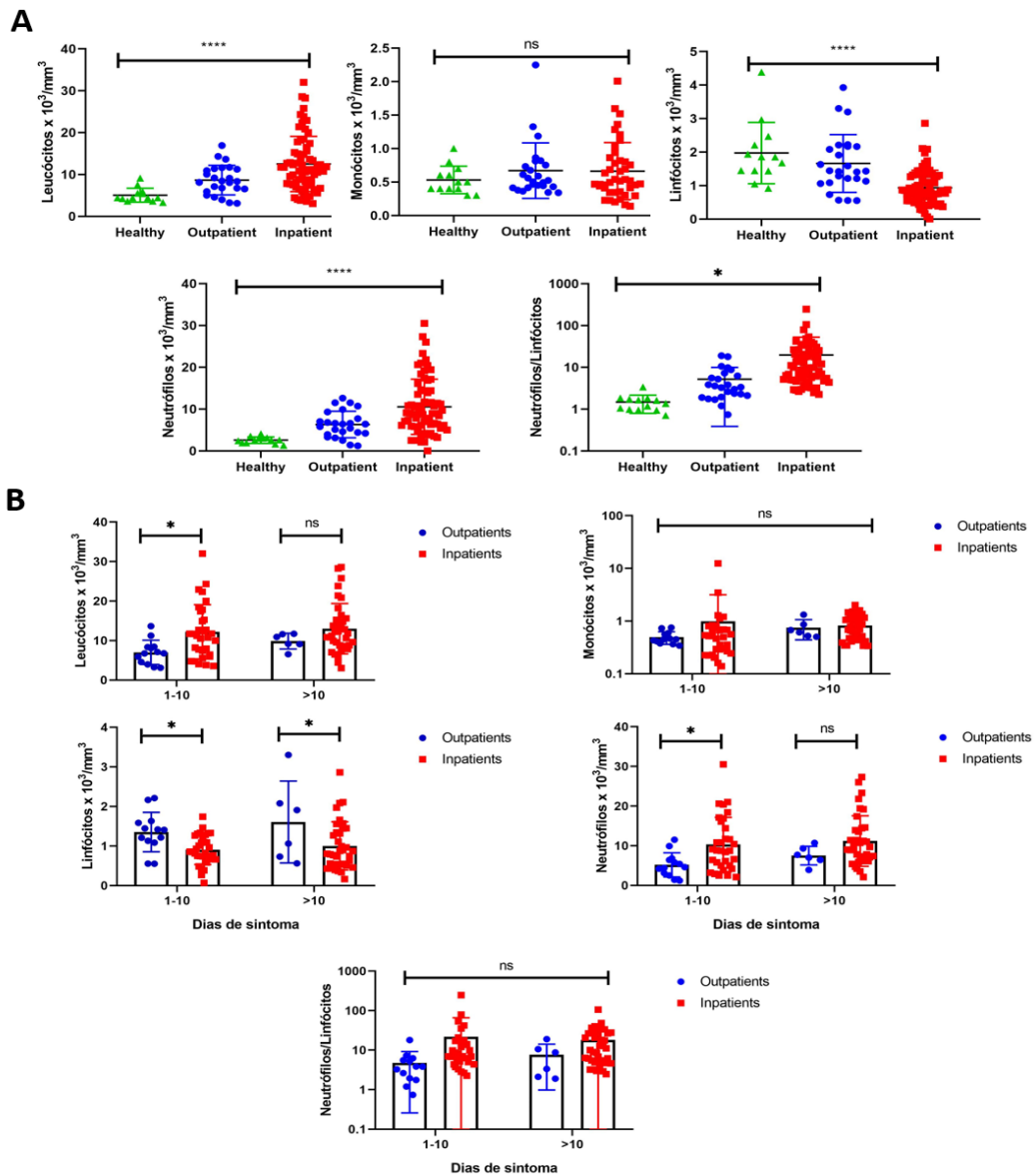


Figura 8: Quantificação das populações celulares no sangue periférico de pacientes graves (inpatients, n=70) e leves (outpatients, n=25) com COVID-19 e controles saudáveis (n=13). Resultados analisados por teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (fig. 8A) e Two-Way ANOVA (fig. 8B). A significância foi definida mediante * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. **A:** Contagem de células no dia do recrutamento de pacientes (D1), observando, da esquerda para a direita e de cima para baixo, a contagem de leucócitos totais, monócitos, linfócitos, neutrófilos e a razão neutrófilos/linfócitos. **B:** Contagem de células separando os pacientes de acordo com os dias de sintomas antes do recrutamento, de 1 a 10 dias de sintomas (n outpatients= 13, n inpatients=32) e mais que 10 dias de sintomas (n outpatients=6, n inpatients=36). Pacientes os quais se desconhece o número de sintomas anteriores à inclusão foram excluídos desta análise.

As duas populações de células sanguíneas significativamente diferentes entre os grupos foram os linfócitos e neutrófilos. As alterações observadas nestas populações parecem ser cruciais para a evolução e desfecho de COVID-19. Nesta análise, pacientes graves exibiram um perfil marcado por redução na população de linfócitos de forma concomitante a um aumento no número de neutrófilos, fato que ocorre de forma menos marcada em pacientes leves. A relação entre estes dois tipos celulares é expressa pela razão linfócitos/neutrófilos, que também está aumentada em pacientes graves,

mostrando que linfócitos e neutrófilos são elementos-chave na desregulação imune que dirige a severidade da doença.

Quando os pacientes leves e graves são estratificados por dias de sintomas antes da inclusão no estudo (**fig. 8B**), observa-se um padrão similar. Leucócitos e neutrófilos aparecem aumentados em casos graves apenas quando a comparação é feita em amostras inclusas nos primeiros 10 dias de sintomas, enquanto a população de linfócitos está significativamente reduzida em qualquer um dos intervalos de dias de sintoma analisados. Curiosamente, a razão de linfócitos/neutrófilos, marcador de COVID-19 grave, não mostra diferença significativa entre os grupos de pacientes separados por dias de sintoma.

Atividade de IDO em COVID-19

Para acessar a atividade da enzima IDO no contexto da infecção por SARS-CoV-2 realizou-se quantificação de seu substrato, triptofano (TRP), e o produto, quinurenina (KYN), em HPLC, a partir de extrações do soro e plasma de pacientes COVID-19 graves, leves e controles saudáveis.

Primeiramente, se comparou os níveis dos metabólitos no soro e plasma dos pacientes no dia de inclusão no estudo (D1), conforme apresentado na **figura 9A**. Esta análise inicial mostra aumento significativo de quinurenina em pacientes graves, mas não em pacientes leves. Associado à redução de triptofano nestes mesmos pacientes em relação aos outros dois grupos, este achado sugere alta taxa de conversão do aminoácido em quinurenina por intermédio de IDO em pacientes graves.

Contudo, as medidas de triptofano dependem do consumo deste aminoácido por meio da alimentação, que pode variar bastante entre indivíduos. E uma vez que se está tratando de pacientes hospitalizados, muitos intubados, é necessário equalizar os valores de triptofano e, subsequentemente, de quinurenina entre os pacientes para poder observar precisamente este fenômeno. Isto pode ser feito ao calcular a razão KYN/TRP, que também pode ser entendida como um indicador indireto da atividade de IDO, pois pode dar uma ideia do nível de conversão de triptofano e quinurenina em cada paciente. Assim, ao comparar a razão KYN/TRP entre os três grupos de estudo se constata que a atividade de IDO está significativamente aumentada em pacientes graves, sustentando a hipótese de que a via das quinureninas possa ser relevante na evolução e desfecho da COVID-19.

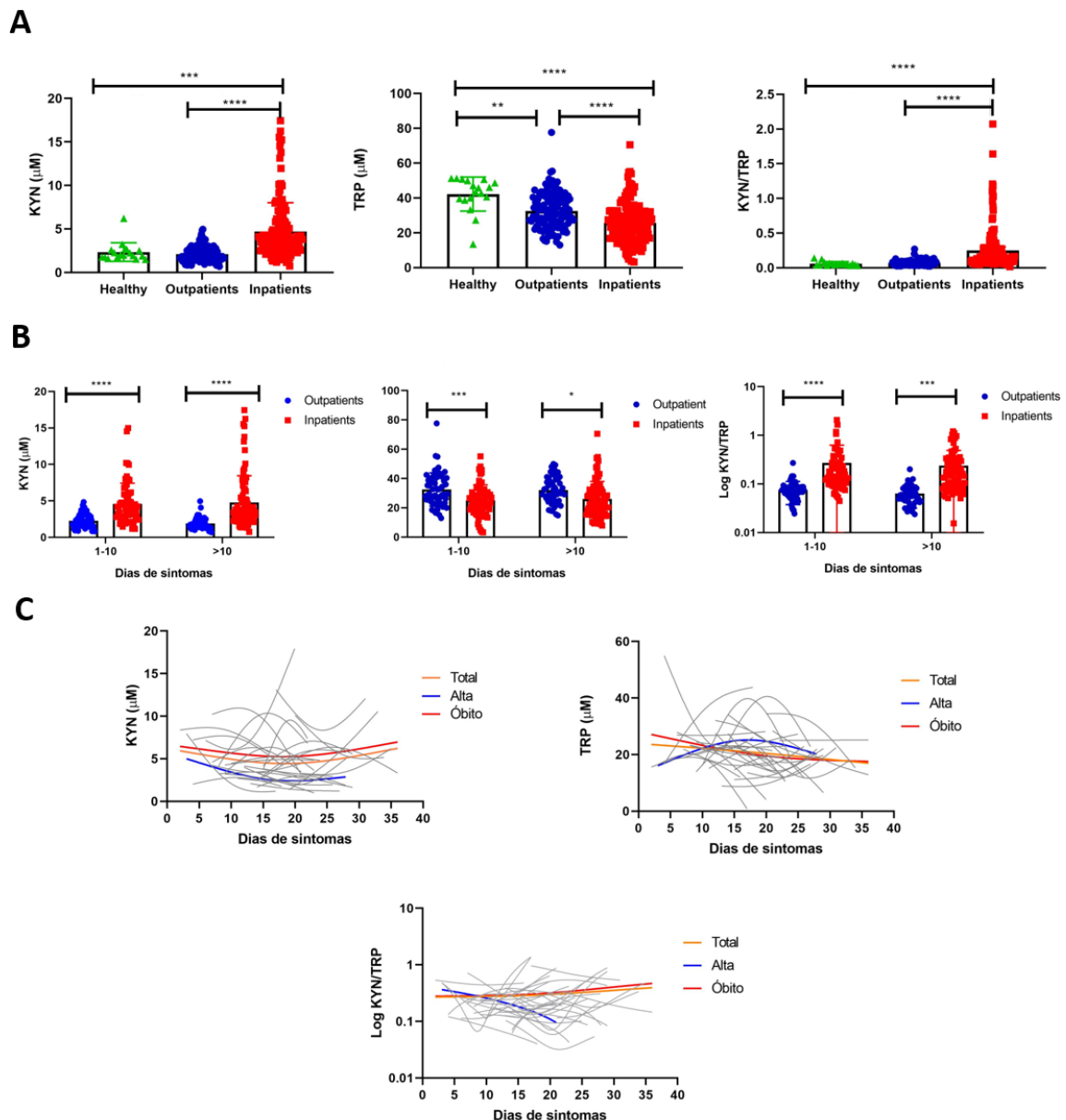


Figura 9: Medidas de KYN, TRP e razão KYN/TRP comparando os três grupos (controles, leves e graves). Análise estatística por teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (fig. 9A) e Two-Way ANOVA (fig. 9B). A significância foi definida mediante $p < 0.05$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. **A:** Quantificação de KYN, TRP e razão KYN/TRP entre grupos de controles saudáveis ($n=18$), pacientes leves ($n=115$) e pacientes graves ($n=152$) em HPLC. Estas medições correspondem à dosagem de soro/plasma dos pacientes obtidos no D1 (dia da inclusão). **B:** Dosagem de KYN, TRP e KYN/TRP durante o D1 nos grupos de pacientes separados de acordo com os dias de sintomas antes da inclusão no estudo: entre 1 e 10 dias (n outpatient = 60; n inpatient = 66) e mais que 10 dias de sintomas (n outpatient = 47; n inpatient = 84). Pacientes os quais se desconhece os dias de sintomas anteriores à inclusão foram excluídos desta análise. **C:** Acompanhamento longitudinal dos pacientes graves internados (inpatients, $n=33$) quanto aos metabólitos e a razão KYN/TRP, em três momentos: D1, D7 e D14, organizados por dias de sintomas. A tendência individual de cada paciente ao longo do tempo é expressa pelas linhas cinzas; a tendência do total de pacientes pela linha laranja, a tendência de pacientes que receberam alta pela linha azul e a tendência de pacientes que foram a óbito em vermelho.

Em seguida, os pacientes com COVID-19 foram subdivididos em grupos de acordo com os dias de sintoma (fig. 9B), a fim de verificar variações na conversão de triptofano em quinurenina em diferentes momentos da doença e da resposta imunológica. As comparações realizadas entre os grupos de

pacientes leves e graves revelam que, durante o percurso da COVID-19, pacientes graves e internados apresentaram um perfil marcado por elevadas medições de quinurenina acoplados à redução de triptofano no soro/plasma em relação ao grupo de pacientes leves, independente do intervalo de tempo comparado (1 a 10 dias ou mais que 10 dias de sintomas). De maneira similar, observa-se elevação da razão KYN/TRP no grupo grave em relação ao leve em ambos os períodos anteriores de sintomas. Interessantemente, não houve diferença significativa entre os dois períodos de sintomas dentro de um mesmo grupo; ex: pacientes graves que experienciaram de 1 a 10 de sintomas versus pacientes graves que experienciaram mais de 10 dias (significância não mostrada). De forma concisa, isto mostra que a conversão de triptofano em quinurenina catalisada por IDO está, de maneira geral, aumentada no contexto da COVID-19 grave.

A fim de observar melhor a variação dos níveis dos metabólitos e da razão KYN/TRP ao longo dos dias de internação, a **figura 9C** compila o acompanhamento longitudinal de 33 pacientes internados com COVID-19 grave em três pontos. Indo além, os gráficos expressam a tendência do total de pacientes (linha laranja), pacientes que receberam alta (linha azul) e pacientes que foram a óbito (linha vermelha) ao longo do tempo. A avaliação longitudinal revela certa estabilidade seguida de tendência de aumento nos níveis de quinurenina concomitantemente à depleção de triptofano nestes pacientes. Mesmo com queda dos valores de triptofano, a análise mostra tendência de aumento de quinurenina com o passar dos dias o que, aliado à propensão de crescimento da razão KYN/TRP, evidencia que a atividade de IDO tende a aumentar durante a progressão da COVID-19 grave.

Um ponto crucial mostrado pela **figura 9C** é que, ao avaliar separadamente as subpopulações de pacientes graves que receberam alta versus pacientes que faleceram, é possível notar um perfil característico para cada um dos dois desfechos. Pacientes graves que se recuperaram da infecção exibem valores reduzidos de quinurenina comparados ao grupo de pacientes que evoluem para óbito. Nestes pacientes, conforme o quadro progride, a razão KYN/TRP mostra propensão ao decaimento, mas o oposto ocorre nos pacientes que vão a óbito.

Estas tendências distintas entre as duas subpopulações de pacientes graves internados são sugestivas de que a atividade de IDO esteja positivamente

correlacionada não só à severidade da COVID-19, mas também seu desfecho clínico.

Valores de quinurenina e razão KYN/TRP estão significativamente correlacionados a marcadores de gravidade em COVID-19

A **tabela 4** compila os dados de diversos testes de correlação, performados entre quinurenina e a razão KYN/TRP e outras variáveis relevantes enquanto marcadores de severidade em COVID-19.

Tabela 4: Compilado de testes de correlação de Spearman entre as medições dos metabólitos (quinurenina e razão KYN/TRP) e os valores de outras variáveis relevantes enquanto marcadores de gravidade em COVID-19. Em cada correlação encontra-se o respectivo valor de p e r.

	Total (n=96)		Leve (n=27)		Grave (n=69)	
	KYN	KYN/TRP	KYN	KYN/TRP	KYN	KYN/TRP
Linfócitos	p=0,003	p<0.0001	p= 0,1544	p= 0,4	p=0,0591	p=0,0407
	r=-0,3645	r=-0,4326	r= -0,3	r=-0,18	r=-0,2284	r=-0,2471
Neutrófilos	p=0,0282	p=0.01	p = 0,2945	p=0,2719	p=0,1783	p=0,2208
	r=0.2762	r=0,3356	r = -0,2232	r=0,2336	r=0,1639	r=0,0683
Neutrófilos/Linfócitos	p=0.0004	p<0.0001	p=0,8623	p=0,2012	p=0,0448	p=0,0179
	r=0,3580	r=0,4567	r=0,03739	r=0,2704	r=0,2423	r=0,2843
IL-6	p<0.0001	p<0.0001	p=0,5752	p=0,0837	p=0.0007	p<0.0001
	r=0,4753	r=0,6843	r=0,1152	r=0,3456	r=0,3838	r=0,5993
IL-10	p<0.0001	p<0.0001	p=0,0825	p=0,7905	p=0,0204	p<0.0001
	r=0,3815	r=0,4784	r=0,3470	r=0,05475	r=0,2691	r=0,4401

Valores de P<0.05 e os respectivos valores de r estão destacados em negrito. N: número de indivíduos.

Valores de p e r obtidos por teste de correlação não-paramétrico de Spearman.

A tabela mostra correlação significativa de quinurenina e razão KYN/TRP para todas as variáveis testadas no total de amostras leves e graves. A análise de correlação entre o número de linfócitos e as medições dos metabólitos no total de amostras retornou valor de r=-0,3645 e r=-0,4236 para quinurenina e razão KYN/TRP, respectivamente. Estes valores negativos de r implicam a ocorrência de correlação negativa entre estas variáveis. Resultado similar foi encontrado na correlação entre razão KYN/TRP e o valor de linfócitos em pacientes graves, mostrando que a tendência de redução no número de linfócitos típica da COVID-19 severa é inversamente proporcional ao aumento da atividade deIDO observado nestes pacientes.

Dentro do grupo de pacientes totais, todas as outras correlações foram significantes, exibindo valor de r>0, indicando que altos valores de quinurenina e KYN/TRP estão associados a elevação dos outros parâmetros, incluindo

marcadores conhecidos de COVID-19 grave, como IL-6 e razão neutrófilos/linfócitos. Observando pacientes graves separadamente, enxerga-se correlação positiva significativa entre metabólitos e razão neutrófilos/linfócitos, IL-6 e IL-10, sugerindo que o aumento da atividade de IDO e subsequente produção de quinurenina siga a tendência de elevação de marcadores inflamatórios, como IL-6. Por outro lado, não houve correlação significativa entre os metabólitos e a contagem de neutrófilos. Também não se obteve resultado significativo em nenhuma correlação no grupo de pacientes leves. Os resultados apresentados nesta tabela são indicativos de que a elevação nos níveis de quinurenina e da razão KYN/TRP por intermédio de IDO são positivamente correlacionados à elevação de marcadores inflamatórios e à desregulação imunológica observada em COVID-19, especialmente na doença grave.

A elevação na conversão de triptofano em quinurenina em pacientes com COVID-19 grave acompanha o quadro inflamatório associado ao óbito

Após observar que pacientes graves acompanhados longitudinalmente que vão a óbito exibem tendência de aumento na atividade de IDO e, conseqüentemente, na conversão de triptofano e quinurenina (**fig. 9C**), buscou-se verificar se essa correlação entre atividade de IDO e desfecho clínico segue o quadro hiperinflamatório característico da COVID-19 grave. Inicialmente, comparou-se as medições dos metabólitos e os valores da razão KYN/TRP entre pacientes graves que receberam alta e os que foram a óbito, primeiramente no dia de inclusão no estudo (**fig. 10A**).

Novamente, pacientes que faleceram em decorrência de COVID-19 apresentavam elevação de quinurenina no soro/plasma e redução dos valores de triptofano; de forma que a razão KYN/TRP de pacientes que faleceram foi marcadamente superior à do outro grupo. Estes resultados reforçam a noção de que a atividade de IDO está correlacionada ao desfecho clínico da COVID-19 grave. Quando estes pacientes foram separados de acordo com os dias de sintomas anteriores à internação (**fig. 10B**), as dosagens dos metabólitos e os valores da razão KYN/TRP no soro/plasma referente ao dia de inclusão (D1) mostraram diferenças significativas entre os grupos de alta e óbito em pacientes que foram inclusos no estudo com mais de 10 dias de sintomas prévios. Já em amostras coletadas nos primeiros 10 dias de sintomas não houve diferença

significativa. A **figura 10C** apresenta o resultado de dois testes de correlação, visando enxergar se existe alguma correlação entre as medições de quinurenina e da razão KYN/TRP e o tempo de internação dos pacientes graves. A análise retornou significância para a correlação entre razão KYN/TRP e os dias de internação, com $r=0,1879$, implicando uma correlação positiva.

Estes resultados são sugestivos de que o crescimento na taxa de conversão de triptofano em quinurenina observado durante COVID-19 grave também está presente na subpopulação de pacientes graves que evoluem para óbito.

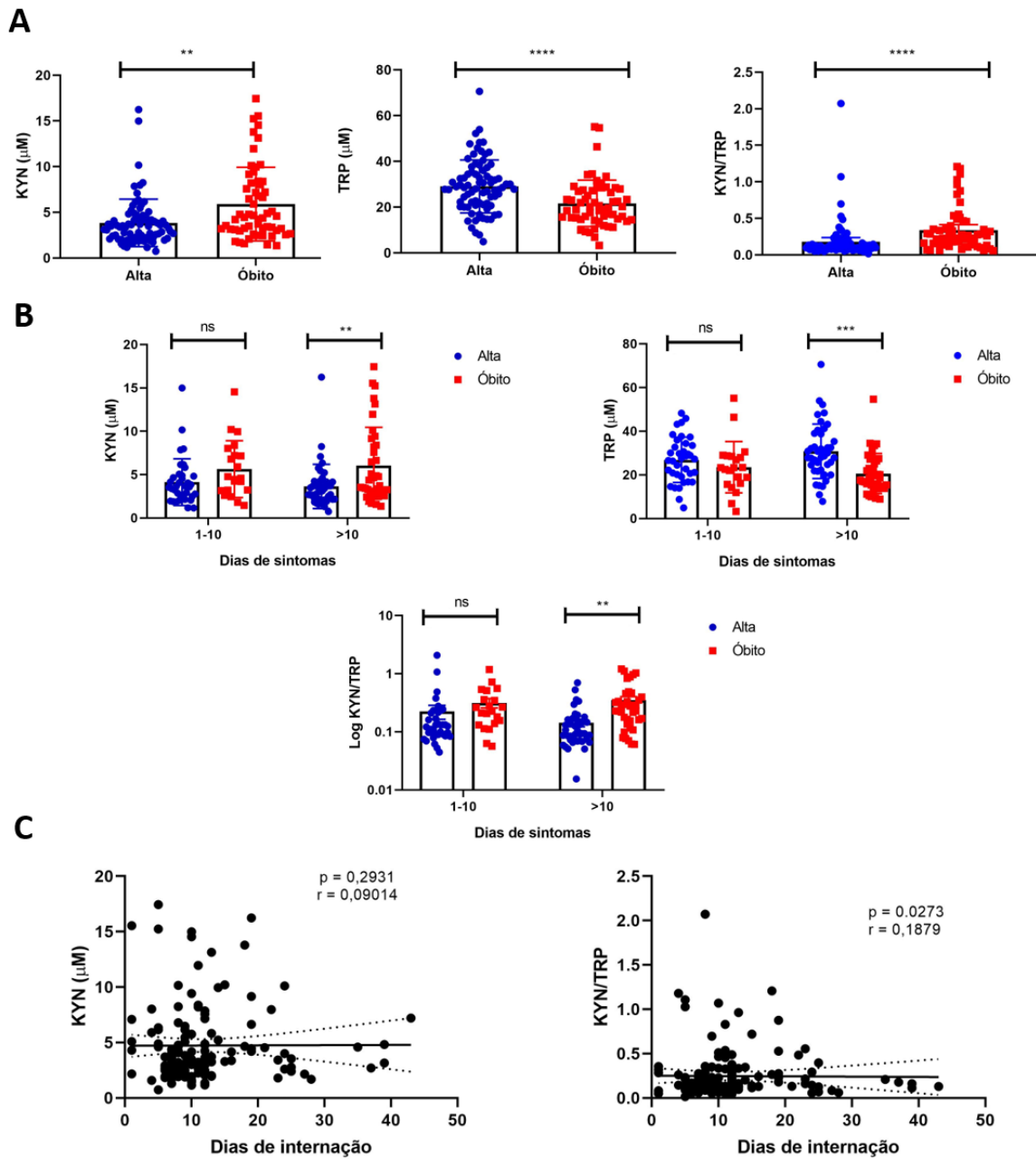


Figura 10: Comparação entre os níveis dos metabólitos de pacientes graves que receberam alta (n=80) ou foram a óbito (n=59). Análise estatística pelo teste não-paramétrico Mann-Whitney (fig. 10A), Two-Way ANOVA (fig. 10B) e teste de correlação de Spearman (fig. 10C). Amostras de pacientes graves os quais se desconhece o desfecho clínico foram excluídas desta análise. A significância foi definida mediante * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. **A:** Níveis de KYN, TRP e razão KYN/TRP em pacientes que receberam alta e foram a óbito, referentes a amostras do dia de recrutamento (D1) dosados por HPLC. **B:** Comparação entre os níveis dos metabólitos no D1, separando os pacientes por dias de sintoma: 1-10 dias de sintomas (alta n = 37; óbito n = 21) e mais que 10 dias de sintomas (alta n = 42; óbito n = 38). **C:** Análise da correlação de Spearman entre os valores de KYN e da razão KYN/TRP e os dias de internação dos pacientes.

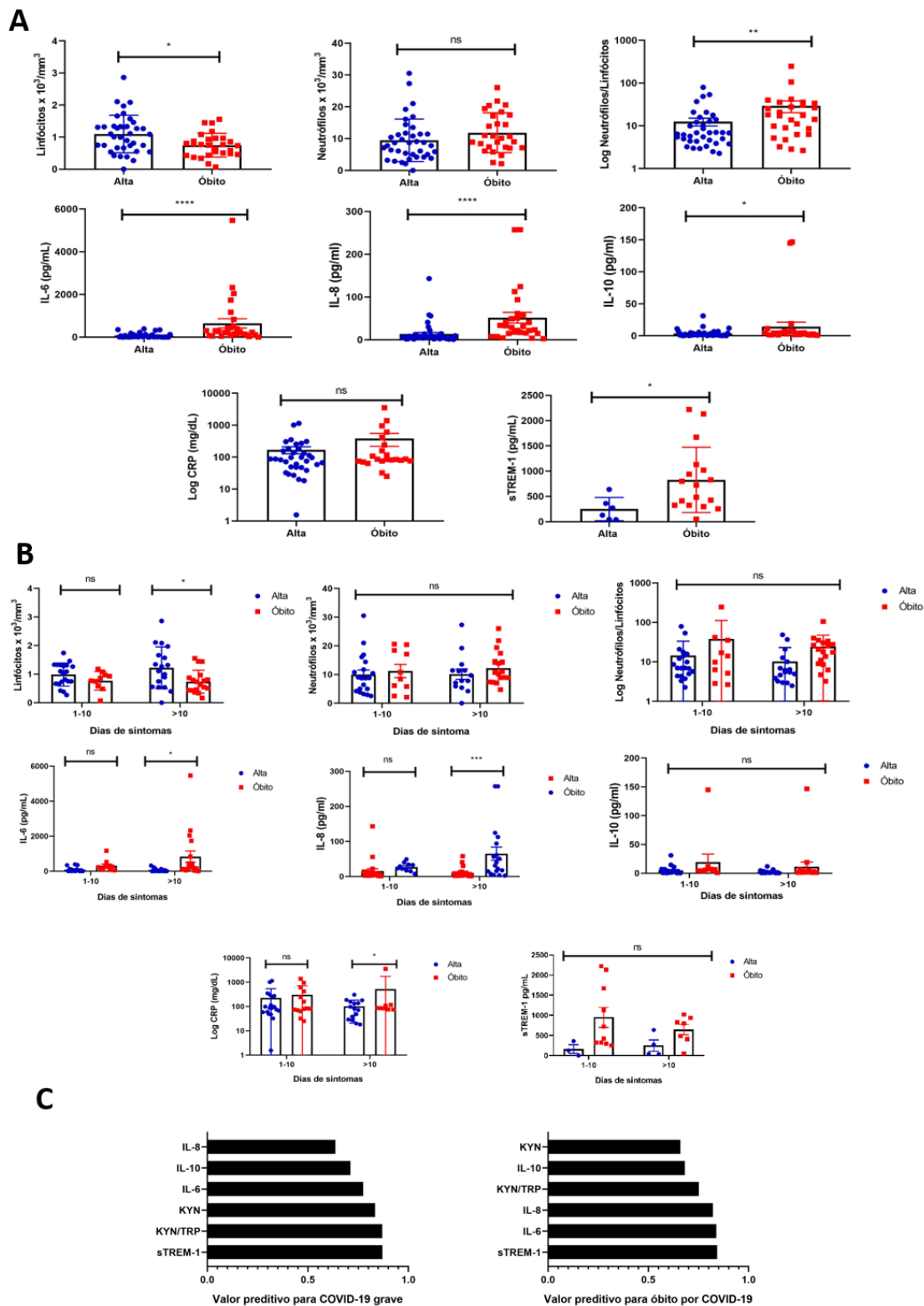


Figura 11: Análises comparativas entre os subgrupos de pacientes graves que receberam alta versus que foram a óbito (n= 38 e n=27, respectivamente, exceto quando especificado) Análise estatística pelo teste não-paramétrico Mann-Whitney (fig. 11A), Two-Way ANOVA (fig. 11B) e análise de curva ROC (fig. 11C). Amostras de pacientes graves os quais se desconhece o desfecho clínico foram excluídas desta análise. A significância foi definida mediante *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. **A:** Medições de células, citocinas e marcadores inflamatórios entre os grupos alta versus óbito. Amostras referentes ao dia de inclusão no estudo (D1). N amostral de sTREM-1: alta = 6, óbito = 17. **B:** Medições de células, citocinas e marcadores inflamatórios dos subgrupos de pacientes referentes ao D1, separados por dias de sintomas. **C:** Score preditivo de IL-8, IL-10, IL-6, KYN, razão KYN/TRP e sTREM-1 como marcadores de diferenciação entre pacientes com COVID-19 leves e graves (esquerda) e pacientes graves que recebem alta ou vão a óbito (direita).

A **figura 11** apresenta comparações quanto ao número de células e medidas de citocinas e marcadores inflamatórios entre os dois subgrupos de alta e óbito de pacientes graves com COVID-19. Tal como observado na dosagem de metabólitos entre pacientes alta e óbito (**fig. 10**), as medições de células, citocinas e marcadores inflamatórios revelam um padrão distinto entre pacientes graves que se recuperam e os que vão a óbito. Com exceção dos valores de neutrófilos e de proteína C reativa, todos as variáveis analisadas na **figura 11A** exibem diferenças significativas entre os subgrupos de pacientes graves. Em pacientes que morrem por COVID-19, se observa um perfil caracterizado por aumento do número de neutrófilos associado à redução de linfócitos, que é expresso pela razão neutrófilos/linfócitos, tipicamente elevada nestes pacientes.

Similarmente, estes pacientes que não conseguem reverter o quadro inflamatório da doença e perecem apresentam elevações significativas de citocinas inflamatórias, nomeadamente IL-6. Outra citocina marcadamente aumentada nos casos mais graves de COVID-19 é IL-8, uma quimiocina que, dentre outras funções, age recrutando neutrófilos. Esta elevação de IL-8 em pacientes que vão a óbito em relação a pacientes que se recuperam são condizentes com os achados que sustentam um papel crucial dos neutrófilos na imunopatologia da COVID-19. sTREM-1, a forma solúvel de uma proteína integrante de vias de sinalização dentro da imunidade inata, também já vem sendo descrito como um eficiente marcador de severidade em COVID-19, e a diferença significativa obtida na análise alta versus óbito para esta molécula também evidencia aumento de sTREM-1 em pacientes graves que vão a óbito em relação aos pacientes que se recuperam eficientemente.

Na **figura 11B** estão apresentados os resultados das comparações alta versus óbito, referentes a medições em amostras do dia de inclusão (D1) e separados por dias de sintomas. Curiosamente, nesta comparação, a maior contagem de linfócitos em pacientes do subgrupo de alta é significativa apenas em pacientes que experienciaram mais que 10 dias de sintomas antes da internação. Por outro lado, maiores níveis de IL-6, IL-8 e proteína C reativa em pacientes do subgrupo óbito foram significativas apenas entre amostras coletadas após mais que dez dias de sintomas. As outras comparações não retomaram diferença significativa entre os dois grupos.

A **figura 11C** traz os *scores* de seis variáveis quantificadas durante este projeto. Este *score* representa o poder que cada uma das variáveis possui de

distinguir entre pacientes graves e leves e permite notar quais variáveis são promissoras enquanto ferramentas de prognóstico em COVID-19. Esta pontuação foi obtida a partir da AUC (área sob a curva) de curvas ROC, com os valores de cada variável para os grupos de pacientes leves e graves. Estes valores são correspondentes ao dia de inclusão no estudo (D1).

sTREM-1 e a razão KYN/TRP tiveram os maiores valores AUC obtidos na curva ROC comparando pacientes leves e graves (0,8708 e 0,8705, respectivamente). Isto sugere que exista papel destas duas variáveis na gravidade de COVID-19. O valor de AUC para quinurenina (0,8338) também foi consideravelmente alto e marcadamente superior ao de IL-6 (0,7554), a citocina pró-inflamatória que possui um papel central na desregulação imunológica característica de COVID-19 grave, e IL-10 (0,7113). Por outro lado, na curva ROC comparando alta versus óbito, os valores de AUC para quinurenina (0,6593) e KYN/TRP (0,7517) foram inferiores aos de sTREM-1 (0,8431), IL-6 (0,8383) e IL=8 (0,8214), sugerindo que quinurenina e razão possuem maior potencial enquanto marcadores de gravidade mas não de desfecho clínico em COVID-19.

Em conjunto com os achados da análise de alta versus óbito para os metabólitos, estes resultados mostram que o aumento na conversão de triptofano em quinurenina por intermédio deIDO típico do grupo de pacientes graves que vão a óbito acompanham o quadro de hiperinflamação sistêmica característico de COVID-19, o que não ocorre em pacientes que recebem alta.

IDO está amplamente expressa em amostras de necrópsia de tecido pulmonar oriundas de pacientes COVID-19

Após verificar que a atividade de IDO está associada não só à gravidade, mas à desregulação imunológica que dirige o óbito durante a COVID-19 severa, realizou-se marcação da enzima IDO em amostras de necrópsia do tecido pulmonar de pacientes que faleceram por complicações de COVID-19 utilizando a técnica de imunohistoquímica.

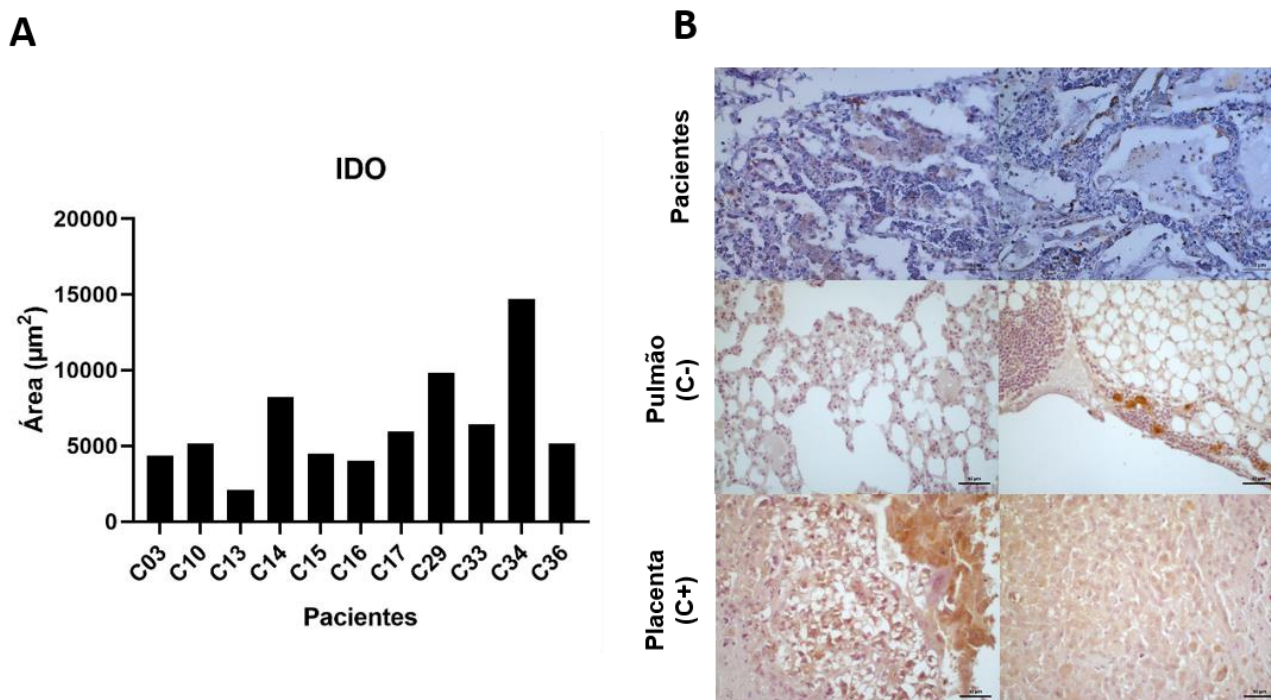


Figura 12: Marcação de IDO em amostras de tecido pulmonar de pacientes com óbito por COVID-19. **A:** Gráfico de distribuição da área marcada para IDO nos cortes teciduais. Os valores estão representados como a média da área marcada em oito seções do corte histológico. **B:** Visualização da marcação de IDO (em marrom) em microscópio óptico após revelação com DAB e contraste com hematoxilina. A primeira fileira representa amostras representativas de tecido pulmonar de dois pacientes distintos, enquanto as duas fileiras debaixo mostram cortes de pulmão (controle negativo) e placenta (controle positivo) de camundongos saudáveis.

A **figura 12A** apresenta a distribuição da área em μm^2 marcada positivamente para IDO após revelação com DAB, por paciente. Estes valores estão representados como a média da área de oito seções do corte histológico. A **figura 12B** consiste em imagens dos cortes visualizados por microscopia óptica após a marcação com anticorpo anti-IDO (primeira fileira, marcado em marrom). Para comparação, utilizou-se cortes de pulmão (controle negativo) e placenta (controle positivo) de camundongos. Por meio destas imagens é possível perceber ostensiva marcação de IDO no tecido pulmonar de pacientes falecidos por COVID-19 em comparação à marcação do pulmão de camundongos saudáveis. Na segunda imagem do pulmão de camundongos se enxerga alguns pontos de marcação de IDO na extremidade do corte, possivelmente por conta de frações de tecido adiposo associados ao pulmão. Por sua vez controle positivo de placenta de camundongo exibe alta marcação de IDO, mostrando a validade deste anticorpo na marcação da enzima.

DISCUSSÃO

A imunopatologia da COVID-19 grave é caracterizada por uma extensa desregulação imunológica que, incapaz de eficientemente conter a infecção e recuperar a homeostase, traz danos ao hospedeiro. Neste trabalho, descrevemos observações de aumento na atividade da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase na infecção por SARS-CoV-2, e que este aumento está correlacionado à desregulação imunológica responsável pela COVID-19 grave que, se não revertida, leva pacientes ao óbito. Por meio destas observações, é possível visualizar com mais profundidade um dos múltiplos fatores responsáveis pela imunopatologia da doença.

Nos pacientes estudados, se constatou prevalência de indivíduos do sexo masculino no grupo de pacientes graves (**tabela 1**) e estão de acordo com outras análises que mostram maior probabilidade de desenvolvimento da doença grave e evolução para o óbito em homens que em mulheres, principalmente por fatores inerentes à imunidade que diferem entre os sexos (Peckham et al. 2020). Mais de 80% dos pacientes de ambos os grupos de pacientes leves e graves relatam a presença de comorbidades ou hábitos de risco (como tabagismo e consumo de bebida alcoólica). Tais comorbidades, como doença cardiovascular, obesidade, diabetes e idade avançada vem sendo citadas frequentemente como fatores de risco para desenvolvimento de COVID-19 grave (Gold et al. 2020; Yang et al. 2020).

Os valores dos marcadores hematológicos observados também exibem uma clara distinção entre pacientes leves e graves e destes em relação aos controles saudáveis (**tabela 2**). Nomeadamente, se constatou redução nos níveis de hemoglobina e porcentagem de hematócrito nos pacientes COVID-19 tanto em comparação aos controles saudáveis tanto entre os dois grupos de pacientes leves e graves. Relatos de outros grupos reportam que a diminuição nos valores destas duas variáveis está marcadamente associada à COVID-19 grave (Pan et al. 2020). Em contrapartida, se encontrou maior contagem de plaquetas nos pacientes graves e leves que nos controles saudáveis, embora outros grupos relatem o oposto, onde pacientes graves tipicamente manifestam trombocitopenia (Terpos et al. 2020).

Quando se fala em desregulação imunológica no contexto da infecção por SARS-CoV-2 se fala especificamente no funcionamento anômalo de células e outros elementos da imunidade que, ao invés de dirigir a retomada da

homeostasia, terminam desencadeando efeitos deletérios no hospedeiro. Tal desregulação observada na COVID-19 vem sendo descrita a partir de duas frentes. A primeira é alteração na contagem e função de células imunológicas, mais especificamente neutrófilos e linfócitos, conforme mostrado na **figura 8**. Pacientes graves costumam mostrar queda nas contagens de linfócitos associado a aumento no número de neutrófilos. Esta relação é expressa pelo aumento da razão neutrófilos/linfócitos, que já é descrita como um importante fator de prognóstico em COVID-19 (Shang et al. 2020b; Yan et al. 2020).

A outra frente é a do papel de mediadores imunológicos, mais especificamente citocinas e quimiocinas de ação pró-inflamatória. Os relatos iniciais do estado imune em pacientes COVID-19 fazem referência à chamada “tempestade de citocinas”, que estaria associada à doença grave. Tal fenômeno pode ser descrito como a produção descontrolada de citocinas que estaria influenciando negativamente a evolução do quadro clínico (Wang et al. 2020a).

Embora alguns autores rejeitem a ideia de tempestade de citocinas durante a COVID-19; pois a produção exacerbada de citocinas não ocorreria de forma generalizada, mas sim de apenas alguns mediadores específicos (Chen et al. 2020b); é inegável que elas contribuam significativamente na evolução e desfecho da doença. IL-6 em especial parece ser a citocina central para a imunopatologia da infecção por SARS-CoV-2, com um largo espectro de ação pró-inflamatória (Coomes & Haghbayan, 2020; Han et al. 2020; Herold et al. 2020) e que está substancialmente elevada nos grupos de pacientes graves que analisamos (**tabela 3**). IL-8 é outra citocina importante no contexto da COVID-19 e atua como recrutadora de neutrófilos para o sítio de infecção. Uma vez que os neutrófilos são células centrais na imunopatologia da infecção grave por SARS-CoV-2 (Barnes et al. 2020; Borczuk et al. 2020; Sauter et al. 2020), IL-8 também vem sendo associada à doença grave (Ma et al. 2021).

Estas duas vertentes se relacionam intimamente e atuam em conjunto na evolução da doença grave: IL-6 estimula uma miríade de efeitos, em geral, pró-inflamatórios. Um destes efeitos é a supressão de respostas de linfócitos Th1 e T reguladores, favorecendo o estabelecimento de perfis antagônicos a estes, como Th2 e Th17, respectivamente (Diehl & Rincón, 2002; Kimura & Kishimoto, 2010). Paralelamente, IL-8 contribui para recrutamento e função de neutrófilos no contexto da infecção pulmonar, onde eles contribuem para o dano tecidual por meio de certos mecanismos, como liberação de redes extracelulares de

neutrófilos (NETs) e produção de mediadores de estresse oxidativo (espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico) (Schönrich et al. 2020; Veras et al. 2020).

Desta forma, é necessário entender onde se encontram IDO e a via das quinureninas neste cenário de desequilíbrio imunológico que aflige pacientes que desenvolvem COVID-19 grave. Até o momento, poucos trabalhos acessaram o metabolismo de triptofano e a atividade de IDO na infecção por SARS-CoV-2. Thomas et al. (2020) reportou elevação da quinurenina sérica associada à depleção nos valores de triptofano e correlação positiva entre quinurenina e as quantificações de IL-6. Outros trabalhos de abordagem metabólica constataram que pacientes com COVID-19 exibiam ativação significativa da via das quinureninas em relação a pessoas saudáveis (Fraser et al. 2020; Shen et al. 2020).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram elevação significativa da produção de quinurenina e da razão KYN/TRP em pacientes COVID-19, especialmente pacientes graves internados (**fig. 9A**). Ao acompanhar longitudinalmente a tendência de quinurenina, triptofano e razão KYN/TRP no grupo de pacientes graves internados (**fig. 9C**), se constatou que, enquanto pacientes que se recuperaram da doença reduziam seus níveis de quinurenina e a razão KYN/TRP, pacientes que não se recuperaram e evoluíram para o óbito mostravam tendência de aumento tanto de quinurenina quanto da razão KYN/TRP.

Posteriormente, ao comparar as medições dos metabólitos subdividindo os pacientes graves internados de acordo com o desfecho clínico (alta versus óbito), se encontrou diferença significativa entre os grupos (**fig. 10**). Neste caso, pacientes que falecem de COVID-19 apresentaram elevação da atividade de IDO e, conseqüentemente, da produção de quinurenina a partir da degradação do triptofano. Interessantemente, se observou também que esta potencialização da atividade de IDO em pacientes que vão a óbito também acompanha a elevação de outros marcadores de inflamação e doença grave (**fig. 11**), como IL-6, razão neutrófilos/linfócitos e sTREM-1, sugerindo que a hiperinflamação sistêmica característica de COVID-19 também esteja estimulando a degradação de triptofano em quinurenina por intermédio de IDO.

Tal como Thomas e colaboradores (2020), encontramos correlação positiva entre os valores de quinurenina e da razão KYN/TRP, não só para IL-6, mas também para IL-10 e a razão neutrófilos/linfócitos (**tabela 4**). Esta

correlação foi significativa apenas comparando os valores de pacientes graves ou do total de pacientes (leves + graves), mas não de pacientes leves separadamente. Correlação não implica necessariamente relação de causa e efeito, mas demonstra se duas variáveis possuem uma relação direta ou inversamente proporcional.

Também se obteve score de algumas variáveis analisadas ao longo do estudo quanto à capacidade destas de separarem pacientes leves versus graves e pacientes do subgrupo de alta versus óbito (**fig. 1C**). sTREM-1 e a razão KYN/TRP tiveram os maiores valores de AUC na análise ROC de pacientes leves versus graves, valores superiores até mesmo que o de IL-6, mostrando que estas duas variáveis podem ser empregadas como ferramentas de prognóstico em COVID-19. Já na análise de alta versus óbito, os maiores valores obtidos correspondem a sTREM-1 e IL-6, deixando quinurenina e razão KYN/TRP para trás.

A importância deIDO dentro do domínio da imunologia de doenças infecciosas deriva da sua capacidade de induzir a geração de células T reguladoras e de promover a exaustão de outros linfócitos T CD4+, através de interações entre a quinurenina e o fator de transcrição AhR (Mezrich et al. 2010, Pour et al. 2019). Ao promover a diferenciação de células T reguladoras capazes de conter respostas imunológicas ao mesmo tempo que interfere diretamente na função de linfócitos T auxiliares, aIDO funciona como um importante “immune checkpoint”, capaz de regular respostas imunológicas.

Nosso grupo de pesquisa investigou por citometria de fluxo do sangue periférico o estado imunológico de pacientes leves e graves com COVID-19 (Carvalho et al. 2020, não publicado). Nestes pacientes, se observou redução na frequência de linfócitos T reguladores nos pacientes graves em relação a pacientes leves. Linfócitos T reguladores de pacientes graves também exibiram redução do marcador de proliferação celular Ki67, indicando na doença grave a baixa proliferação de Tregs seja incapaz de conter os efeitos deletérios da imunopatologia.

Estes achados são coerentes com a noção de que a COVID-19 grave deriva de uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada, o que pode ser entendido como reflexo de baixa ação T reguladora. Contudo, estes mesmos pacientes graves exibem elevada atividade deIDO e produção de quinurenina

comparados ao grupo de pacientes leves, o que funcionaria como mecanismo de imunomodulação para conter a imunopatologia da COVID-19.

IDO possui duas isoformas, IDO1 e IDO2, onde IDO1 é induzível e possui cinética enzimática superior à de IDO2, que tem expressão constitutiva (Ball et al. 2007; Bilir & Sarisozen, 2017). Ainda assim, alguns estudos mostram que IDO2 possui um fenótipo funcional distinto de IDO1, tendo uma ação marcadamente pró-inflamatória, especialmente em doenças autoimunes (Merlo & Mandik-Nayak, 2016). Assim, uma possível hipótese para estes achados contraditórios entre níveis de quinureninas versus contagem de células T reguladoras seria a existência de mecanismos alternativos que estejam interferindo na geração de Tregs pela quinurenina. Um destes mecanismos seria mediado pela enzima IL4I1 (enzima induzida por IL-4, em inglês), que é capaz de ativar AhR por meio da produção de ácido quinurênico e metabólitos de indol, gerando células T reguladoras e promovendo supressão de respostas imune adaptativas (Cousin et al. 2015; Sadik et al. 2020).

Um ponto importante que deve ser observado é o mecanismo alternativo pelo qual IDO é capaz de suprimir respostas imunológicas: exaustão funcional de linfócitos T. A exaustão de células T pode ser descrita como um estado anérgico, com perda de funções efetoras, baixa reatividade e perfil transcricional distinto de células T efetoras e de memória. Fenotipicamente, a exaustão pode ser identificada pelo aumento na expressão de marcadores imunorregulatórios, como PD-1 e CTLA-4 em linfócitos T (Wherry & Kurachi, 2016). Este fenômeno já foi observado e caracterizado na infecção aguda por SARS-CoV-2, em ambas as populações de linfócitos CD4+ e CD8+, e está associado à gravidade e persistência da doença (Diao et al. 2020; Kusnadi et al. 2021). Embora nenhum estudo tenha associado a atividade de IDO com a exaustão de células T observadas em COVID-19, é uma hipótese que permanece em aberto.

Outra questão que ainda deve ser respondida no que diz respeito ao papel de IDO na imunopatogênese da COVID-19 envolve os mecanismos imunológicos que estejam ativando esta enzima. Normalmente, a via dependente de IFN- γ é o principal mecanismo de ativação da expressão gênica de IDO1 (Jürgens et al. 2009). Contudo, em nossas observações não encontramos diferenças significativas nas medições de IFN- γ entre os grupos estudados (**tabela 3**), logo mecanismos alternativos de indução e ativação de

IDO devem estar envolvidos que justifiquem as diferenças encontradas entre os grupos.

Este estudo foi puramente observacional, a partir de amostras coletadas em hospital ou Unidade de Pronto Atendimento. Em estudos observacionais pode-se estabelecer correlações e associações entre as variáveis quantificadas e analisadas e o fenômeno investigado, mas é difícil estabelecer relações de causalidade sem um estudo de mecanismos, que busque estabelecer de forma mais aprofundada de que formas os diferentes componentes da imunidade se relacionam entre si e como essas relações afetam a progressão e desfecho de doenças. Outro fator relevante é que as medições de células e de metabólitos foram realizadas unicamente no soro/plasma de pacientes COVID-19, representando valores presentes na circulação. Contudo, a inflamação da COVID-19 tem foco no pulmão, de maneira que explorar o que acontece nos pulmões a nível de metabólitos e células auxiliaria a entender se o que é observado na circulação se traduz de forma similar ao que ocorre no sítio da inflamação.

Assim, estes resultados apontam forte correlação entre maior atividade da enzima IDO e COVID-19 grave com progressão para óbito, mas só com o que se tem não é possível estabelecer relações de causa e efeito entre atividade de IDO e gravidade. Poucos trabalhos têm investigado o papel de IDO no desenvolvimento da imunopatologia da infecção por SARS-CoV-2 e ainda existem uma ampla gama de perguntas a serem destrinchadas sobre este tema.

CONCLUSÃO

A manifestação severa de COVID-19 tem origem em uma hiperinflamação sistêmica que acarreta danos à integridade do hospedeiro e não é capaz de conter a progressão da infecção por SARS-CoV-2.IDO é uma enzima associada à imunossupressão e, teoricamente, seu efeito imunológico seria benéfico nos pacientes com COVID-19 pois preveniria a evolução para doença grave ao conter a inflamação. Contudo, verificou-se que pacientes com a forma mais grave da doença exibiam elevação da atividade de IDO, com maior taxa de conversão de triptofano em quinurenina, especialmente naqueles que vão a óbito. Este aumento se correlaciona positivamente com os valores de marcadores de gravidade e de inflamação e sugere que, no contexto desta doença, a ação de IDO vem sendo dirigida pela imunopatologia. Ainda assim, algumas características da resposta imune anômala observada em COVID-19, como deficiência na resposta adaptativa T-dependente, podem ser atribuídos ao efeito direto de IDO sobre estas células. Poucos trabalhos vêm acessando o estado de IDO e do metabolismo do triptofano no contexto da COVID-19 e ainda existem lacunas de conhecimento a serem destrinchadas para que se possa obter um panorama mais amplo do papel de IDO no contexto desta doença.

REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K. et al. **Imunologia Celular e Molecular**. 8 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 536 p.
- Abassi, Z. et al. The Lung Macrophage in SARS-CoV-2 Infection: A Friend or a Foe? **Frontiers in Immunology**. V. 11, n. 1312, 2020.
- Ackermann, M. et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. **New England Journal of Medicine**. V. 383, n.2, p. 120- 128, 2020.
- Armocida, B. The Italian health system and the COVID-19 challenge. **The Lancet Public Health**. V. 5, p. 253, 2020.
- Asghar, K et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression and activity in patients with hepatitis C virus-induced liver cirrhosis. **Experimental and Therapeutic Medicine**. V. 9, p. 901-904, 2015.
- Astuti, I.; Ysrafil. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. **Diabetes & Metabolic Syndromes: Clinical Research and Review**. V. 14, p.407-412, 2020.
- Alroqi, F. J. & Chatila, T. A. T Regulatory Cell Biology in Health and Disease. **Current Allergy and Ashtma Reports**. V. 16, n. 4, 2016.
- Balilla, J. Assessment of COVID-19 Mass Testing: The Case of South Korea. **Social Science Research Network**. 2020.
- Barnes, B. J. et al. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. **Journal of Experimental Medicine**. V. 217, n. 6, 2020.
- Ball, H.. J. et al. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. **Gene**. V. 396, p. 203-213, 2007.
- Bernheim, A. et al. Chest CT Findings in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Relationship to Duration of Infection. **Radiology**. V. 295, p. 685-692, 2020.
- Bhagarva, A. et al. Predictors for Severe COVID-19 Infection. **Clinical Infectious Diseases**. V. 71, n. 8, 1962-1968, 2020.
- Bilir, C. & Sarisozen, C. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO): Only an enzyme or a checkpoint controller?. **Journal of Oncological Sciences**. V. 3, p. 52-56, 2017.
- Biran, N. et al. Tocilizumab among patients with COVID-19 in the intensive care unit: a multicentre observational study. **The Lancet Rheumatology**. Artigo ainda não publicado. 2020.

Blanco-Melo, D. et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. **Cell**. V. 181, p. 1036-1045, 2020.

Brooks, G. F. et al. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26 ed. Artmed. 2014.

Borczuk, A. C. et al. COVID-19 pulmonary pathology: a multi-institutional autopsy cohort from Italy and New York City. **Modern Pathology**. V. 33, n. 11, p. 2156-2168, 2020.

Buss, L. F. et al. Three-quarters attack rate of SARS-CoV-2 in the Brazilian Amazon during a largely unmitigated epidemic. **Science**. V. 371, p. 288-292, 2021.

Candido, D. S. et al. Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. **Science**. V. 369, p. 1255-1260, 2020.

Cao, X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. **Nature Reviews Immunology**. V. 20, p. 269-270, 2020.

Chan, J. F. W. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. **The Lancet**. V. 395, n. 10223, p. 514-523, 2020.

Channappanavar, R. et al. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. **Cell Host & Microbe**. V. 19, p. 181-193, 2016.

Chen, H. COVID-19 in China: From epidemiology to treatment (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**. V. 20, n. 6, 2020a.

Chen, L. Y. C. et al. Confronting the controversy: Interleukin-6 and the COVID-19 cytokine storm syndrome. **European Respiratory Journal**. Artigo ainda não publicado.

Chen, Y. et al. Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. V. 106, n. 9, p. 3484-3489, 2009.

Cheung, C. Y. et al. Cytokine Responses in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-Infected Macrophages In Vitro: Possible Relevance to Pathogenesis. **Journal of Virology**. V. 79, n. 12, 2005.

Chomarat, P. et al. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. **Nature Immunology**. V. 1, n. 6, p. 510-514, 2000.

Coelho, F. C. et al. Assessing the spread of COVID-19 in Brazil: Mobility, morbidity and social vulnerability. **PLoS One**. V. 15, n. 9, 2020.

Coomes, E. A.; Haghbayan, H. Interleukin-6 in Covid-19: A systematic review and metaanalysis. **Reviews in Medical Virology**. V. 30, n.6, 2020.

Cousin, C. et al. The immunosuppressive enzyme IL4I1 promotes FoxP3+ regulatory T lymphocyte differentiation. **European Journal of Immunology**. V. 45, p. 1772-1782, 2015.

Diao, B. et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Frontiers in Immunology**. V. 11, n. 827, 2020.

Diehl, S. ; Rincón, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Molecular Immunology**. V. 39, p. 531-536, 2002.

Dosch, S. F. et al. SARS coronavirus spike protein-induced innate immune response occurs via activation of the NF- κ B pathway in human monocyte macrophages in vitro. **Virus Research**. V. 142, p. 19-27, 2009.

Elmer, J. et al. Tocilizumab shortens time on mechanical ventilation and length of hospital stay in patients with severe COVID-19: a retrospective cohort study. **Journal of Internal Medicine**. Artigo ainda não publicado. 2020.

Eskilsson, A. et al. Immune-Induced Fever Is Mediated by IL-6 Receptors on Brain Endothelial Cells Coupled to STAT3-Dependent Induction of Brain Endothelial Prostaglandin Synthesis. **Journal of Neuroscience**. V. 34, n. 48, p. 15957-15961. 2014.

Faria, N. R. et al. 2021. Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings.
<<https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manaus-preliminary-findings/586>> Acesso em: 21.01.21.

Fox, J. M. et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase enhances the T-cell response to influenza virus infections. **Journal of General Virology**. V. 94, p. 1451-1461, 2013.

Fraser, D. D. et al. Metabolomics Profiling of Critically Ill Coronavirus Disease 2019 Patients: Identification of Diagnostic and Prognostic Biomarkers. **Critical Care Explorations**. v. 2, n. 10, 2020.

Frieman, M. et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus ORF6 Antagonizes STAT1 Function by Sequestering Nuclear Import Factors on the Rough Endoplasmic Reticulum/Golgi Membrane. **Journal of Virology**. V. 81, n. 18, p. 9812-9824, 2007.

Geisler, S. et al. Neopterin levels and Kyn Trp ratios were significantly increased in dengue virus patients and subsequently decreased after recovery. **International Journal of Infectious Diseases**. V. 91, p. 162-168, 2020.

Gold, M. S. et al. COVID-19 and comorbidities: a review and meta-analysis. **Postgraduate Medicine**. 2020

Grant, M. C. et al. The prevalence of symptoms in 24,410 adults infected by the novel coronavirus (SARSCoV- 2; COVID-19): A systematic review and meta-analysis of 148 studies from 9 countries. **PLoS One**. V. 15, n.6, 2020.

Guan, W. et al. Clinical characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **New England Journal of Medicine**. V.382, p. 1708-1720, 2020.

Guaraldi, G. et al. Tocilizumab in patients with severe COVID-19: a retrospective cohort study. **The Lancet Rheumatology**. Artigo ainda não publicado. 2020.

Hadjadj, J. et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. **Science**. V. 369, p. 718-724, 2020.

Hallal, P. C. et al. SARS-CoV-2 antibody prevalence in Brazil: results from two successive nationwide serological household surveys. **The Lancet Global Health**. V. 8, p. 1390-1398, 2020.

Han, H. et al. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. **Emerging Microbes and Infection**. V.9, 2020.

Helmy, Y. A. et al. The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control. **Journal of Clinical Medicine**. V. 9, n. 2225, 2020.

Herold, T. et al. Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. V. 146, n. 1, p. 128-136, 2020.

Henry, B. M. et al. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. V. 58, n. 7, 2020.

Herrera, N. G. et al. Characterization of the SARS-CoV-2 S Protein: Biophysical, Biochemical, Structural, and Antigenic Analysis. Artigo ainda não revisado. Disponível em <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.14.150607v1>, 2020.

Hoffmann, H. et al. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. **PNAS**. v.102, n.22, 2005.

Hoffman, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**. V. 181, p. 271-280, 2020.

Hornýák, L. et al. The Role of indoleamine-2,3- Dioxygenase in Cancer Development, Diagnostics, and Therapy. **Frontiers in Immunology**. V. 9, n. 151, 2018.

Huang, L. et al. Induction and Role of Indoleamine 2,3 Dioxygenase in Mouse Models of Influenza A Virus Infection. **PLoS One**. V. 8, n. 6, 2013.

Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**. V.395, p. 497-506, 2020.

Jürgens, B. Interferon- γ -triggered indoleamine 2,3-dioxygenase competence in human monocyte-derived dendritic cells induces regulatory activity in allogeneic T cells. **Immunobiology**. V. 114, n. 15, p. 3235-3243, 2009.

Katz, J. B. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. **Immunological Reviews**. V. 222, p. 206-221, 2008.

Kawasaki, T.; Kawai, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**. V. 5, n. 461, 2014.

Khailany, R. A. et al. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. **Gene Reports**. V. 19, 2020.

Kimura, A.; Kishimoto, T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. **European Journal of Immunology**. V. 40, p. 1830-1835, 2010.

Kissler, S. M. et al. Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2 through the postpandemic period. **Science**. V. 368, p. 860-868, 2020.

Konno, Y. et al. SARS-CoV-2 ORF3b is a potent interferon antagonist whose activity is further increased by a naturally occurring elongation variant. Artigo ainda não publicado. Disponível em < <https://doi.org/10.1101/2020.05.11.088179>>, 2020.

Kusnadi, A. et al. Severely ill COVID-19 patients display impaired exhaustion features in SARS-CoV-2-reactive CD8⁺ T cells. **Science Immunology**. V. 6, n. 55, 2021.

Lan, J. L. et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor binding domain bound to the ACE2 receptor. **Nature**. V. 581, 2020.

Lau, S. K. P. et al. Delayed induction of proinflammatory cytokines and suppression of innate antiviral response by the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus: implications for pathogenesis and treatment. **Journal of General Virology**. V. 94, p.2679-2690, 2013.

Law, H. K. W. et al. Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus–infected, monocytederived human dendritic cells. **Blood**. V. 106, n. 7, p.2366-2374, 2005.

Lee, A. J. ; Ashkar, A. A. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. **Frontiers in Immunology**. V. 9, n. 2061, 2018.

Lee, S. M. et al. Inhibition of acute lethal pulmonary inflammation by the IDO– AhR pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. V. 114, n. 29, p. 5881-5890, 2017.

Levi, M. et al. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. **The Lancet Haematology**. V. 7, p. e438-e440, 2020.

Li, F. et al. Structure of SARS Coronavirus Spike Receptor-Binding Domain Complexed with Receptor. **Science**. V. 309, 2005.

Li, M. Y. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. **Infectious Diseases of Poverty**. V. 4, n. 45, 2020.

Lippens, C. et al. IDO-orchestrated crosstalk between pDCs and Tregs inhibits autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**. V. 75, p. 39-49, 2016.

Lippi, G. et al. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. **Clinical Chimica Acta**. V. 506, p. 145-148, 2020.

Liu, Y et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. **Journal of Infection**. V. 81, 2020a.

Loo, Y. M.; Gale Jr, M. Immune signaling by RIG-I-like receptors. **Immunity**. V. 34, n. 5, p. 680-692, 2011.

Lovato, A.; de Filippis, C. Clinical Presentation of COVID-19: A Systematic Review Focusing on Upper Airway Symptoms. **Ear, Nose and Throat Journal**. V. 99, n. 9, 2020.

Lu, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**. V. 395, p. 565-574, 2020.

Ma, A. et al. High Levels of Circulating IL-8 and Soluble IL- Are Associated With Prolonged Illness in Patients With Severe COVID-19. **Frontiers in Immunology**. V.12, 2021.

Maeda, K. et al. IL-6 increases B-cell IgG production in a feed-forward proinflammatory mechanism to skew hematopoiesis and elevate myeloid production. **Blood**. V. 115, n. 23, p. 4699-4706, 2010.

McNab, F. et al. Type I interferons in infectious disease. **Nature Reviews Immunology**. V. 15, p. 87-103, 2015.

Merlo, L. M. F. & Mandik-Nayak, L. IDO2: A Pathogenic Mediator of Inflammatory Autoimmunity. **Clinical Medicine Insights: Pathology**. V. 9, p. 21-28, 2016.

Mezrich, J. D. et al. An Interaction between Kynurenine and the Aryl Hydrocarbon Receptor Can Generate Regulatory T Cells. **Journal of Immunology**. V. 185, p. 3190-3198, 2010.

Ministério da Saúde. 2020. Coronavírus Brasil. Disponível em < <https://covid.saude.gov.br/>> Acesso em 18.05.21.

Moreno-Eutimio, M. A. et al. Bioinformatic analysis and identification of single-stranded RNA sequences recognized by TLR7/8 in the SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV genomes. **Microbes and Infection**. V. 22, p. 226-229, 2020.

Munn, D. H. et al. Prevention of Allogeneic Fetal Rejection by Tryptophan Catabolism. **Science**. V. 281, p. 1191-1194, 1998.

Munn, D. H. & Mellor, A. L. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. **Trends in Immunology**. V. 34, n. 3, p.137-143, 2013.

Murakami, Y. et al. Inhibition of increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity attenuates *Toxoplasma gondii* replication in the lung during acute infection. **Cytokine**. V. 59, p.245-251, 2012.

Naqvi, A. A. T. et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. **Molecular Basis of Disease**. V. 1866, n. 10, 2020.

Naveca, F. et al. 2021. Phylogenetic relationship of SARS-CoV-2 sequences from Amazonas with emerging Brazilian variants harboring mutations E484K and N501Y in the Spike protein. Disponível em < <https://virological.org/t/phylogenetic-relationship-of-sars-cov-2-sequences-from-amazonas-with-emerging-brazilian-variants-harboring-mutations-e484k-and-n501y-in-the-spike-protein/585>> Acesso em: 25.01.21

Neuman, B. W. et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. **Journal of Structural Biology**. V. 174, p. 11-22, 2011.

Orellana, J. D. Y. et al. Explosão da mortalidade no epicentro amazônico da epidemia de COVID-19. **Cadernos de Saúde Pública**. V. 36, n. 7, 2020.

Ou, X. et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. **Nature Communications**. V. 11, n. 1620, 2020.

Patel, K. et al. Use of the IL-6R Antagonist Tocilizumab in Hospitalized COVID-19 Patients. **Journal of Internal Medicine**. Artigo ainda não publicado. 2020.

Pan, Y. et al. Can routine laboratory tests discriminate SARS-CoV-2-infected pneumonia from other causes of community-acquired pneumonia? **Clinical and Translational Medicine**. V. 10, p. 161-168, 2020.

Peckham, H. et al. Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ITU admission. **Nature Communications**. V. 11, n.6317, 2020.

Perrotta, F. et al. COVID-19 and the elderly: insights into pathogenesis and clinical decision-making. **Aging Clinical and Experimental Research**. Artigo ainda não publicado.

Pour, S. R. et al. Exhaustion of CD4+ T-cells mediated by the Kynurenine Pathway in Melanoma. **Nature Scientific Reports**. V. 9, n. 12150, 2019.

Rajan, D. et al. Protective role of Indoleamine 2,3 dioxygenase in Respiratory Syncytial Virus associated immune response in airway epithelial cells. **Virology**. V. 512, p. 144-150, 2017.

Romano, M. et al. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. **Cells**. V. 9, 2020.

Robinson, C. M. et al. NF- κ B activation contributes to indoleamine-2,3-dioxygenase transcriptional synergy induced by IFN- γ and tumor necrosis factor- α . **Cytokine**. V. 35, p. 53-61, 2006.

Rodrigues, T. S. et al. Inflammasome activation in COVID-19 patients. Artigo ainda não publicado. Disponível em <https://doi.org/10.1101/2020.08.05.20168872> , 2020.

Ruch, T. R.; Machamer, C. E. The Coronavirus E Protein: Assembly and Beyond Travis R. **Viruses**. V. 4, p. 363-383, 2012.

Sabino, E. C. et al. Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. **The Lancet**. V. 397, p. 452-454, 2021.

Sadik, A. et al. IL4I1 Is a Metabolic Immune Checkpoint that Activates the AHR and Promotes Tumor Progression. **Cell**. V. 182, p. 1252-1270, 2020.

Sauter, J. et al. Insights into pathogenesis of fatal COVID-19 pneumonia from histopathology with immunohistochemical and viral RNA studies. **Histopathology**. V. 77, n. 6, p. 915-925, 2020.

Schönrich, G. et al. Devilishly radical NETwork in COVID-19: Oxidative stress, neutrophil extracellular traps (NETs), and T cell suppression. **Advances in Biological Regulation**. V. 77, 2020.

Shahri, M. K. et al. COVID-19 and hematology findings based on the current evidences: A puzzle with many missing pieces. *International Journal of Laboratory Hematology*. Artigo ainda não publicado. 2020.

Shang, J. et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. V. 117, n. 21, 2020a.

Shang, W. et al. The value of clinical parameters in predicting the severity of COVID-19. *Journal of Medical Virology*. Artigo ainda não publicado. 2020b.

Shen, B. et al. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. **Cell**. V. 182, p. 59-72, 2020.

Shereen, M. A. et al. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. **Journal of Advanced Research**. V. 24, p. 94-98, 2020.

Shi, C. S. et al. SARS-Coronavirus Open Reading Frame-8b triggers intracellular stress pathways and activates NLRP3 inflammasomes. **Cell Death Discovery**. V. 5, n.101, 2019.

Shi, S. et al. Association of Cardiac Injury With Mortality in Hospitalized Patients With COVID-19 in Wuhan, China. **JAMA Cardiology**. V.5, n. 7, p; 802-810, 2020.

Souza, W. M. et al. Epidemiological and clinical characteristics of the COVID-19 epidemic in Brazil. **Nature Human Behaviour**. V. 4, p. 856-876, 2020.

Suzuki, Y. et al. Serum Indoleamine 2,3 Dioxygenase Activity Predicts Prognosis of Pulmonary Tuberculosis. **Clinical and Vaccine Immunology**. V.19, n.3, p.436-442, 2012.

Terpos, E. et al. Hematological findings and complications of COVID-19. **American Journal of Hematology**. V. 95, n. 7, p. 834-847, 2020.

Thomas, T. et al. COVID-19 infection alters kynurenine and fatty acid metabolism, correlating with IL-6 levels and renal status. **JCI Insight**. V. 5, n. 14, 2020.

Thornbrough, J. M. et al. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus NS4b Protein Inhibits Host RNase L Activation. **mBio**. V. 7, n. 2, 2016.

Veras, F. P. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. **Journal of Experimental Medicine**. V. 217, n.12, 2020.

Vogel, C. F. A. et al. Aryl hydrocarbon receptor signaling regulates NF- κ B RelB activation during dendritic-cell differentiation. **Immunology and Cell Biology**. V. 91, p. 568-575, 2013.

Wang, J. et al. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. **Journal of Leukocyte Biology**. 2020a.

Wang, Q. et al. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. **Cell**. V. 181, p. 894-904, 2020b.

Wang, R.; Tang, A. Simultaneous determination of kynurenine and tryptophan in serum by high performance liquid chromatography. **Chinese Journal of Chromatography**. V. 24, n.2, p.140-143, 2006.

Wang, Y.; Liu, L. The Membrane Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Functions as a Novel Cytosolic Pathogen-Associated Molecular Pattern To Promote Beta Interferon Induction via a Toll-Like-Receptor-Related TRAF3-Independent Mechanism. **mBio**. V. 7, n. 1, 2016.

Wherry, E. J.; Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. **Nature Reviews Immunology**. V. 15, n.8, p. 486-499, 2015.

World Health Organization. 2020. **Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)**. Disponível em <<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf>> Acesso em 16.09.2020.

World Health Organization. 2021. **WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard**. Disponível em <<https://covid19.who.int/>> Acesso em 17.05.21

Wu, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**. V. 579, p. 265-284, 2020.

Yan, Y. et al. IDO upregulates regulatory T cells via tryptophan catabolite and suppresses encephalitogenic T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Immunology**. V.185, n. 10, p. 5953-5961, 2010.

Yang, Y. et al. The structural and accessory proteins M, ORF 4a, ORF 4b, and ORF 5 of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) are potent interferon antagonists. **Protein & Cell**. V. 4, n. 12, p. 951-961, 2013.

Yang, J. et al. Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**. V. 94, p. 91-95, 2020.

- Ye, Q. et al. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. **Journal of Infection**. V. 80, p. 607-613, 2020.
- Yu, P. et al. A Familial Cluster of Infection Associated With the 2019 Novel Coronavirus Indicating Possible Person-to-Person Transmission During the Incubation Period. **Journal of Infectious Diseases**. V. 221, n. 11, p. 1757-1761, 2020.
- Zeng, W. et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. **Biochemichal and Biophysical Research Communications**. V. 527, p. 618-623, 2020.
- Zhang, D. et al. COVID-19 infection induces readily detectable morphological and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes, the severity of which correlate with patient outcome. Artigo ainda não publicado. Disponível em < <https://doi.org/10.1101/2020.03.24.20042655>>, 2020
- Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**. V. 579, p. 570-589, 2020.
- Zhu, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**. V. 328, n. 8, p. 727-733, 2020.