



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

PABLO CANTALICE SANTOS FARIAS

**FATORES GENÉTICOS E CO-INFECÇÃO NA GRAVIDADE DA COVID-19:
ASSOCIAÇÃO DO SNP rs699-GG E INFECÇÃO TRIPLA HIV/ *LEISHMANIA*
INFANTUM/ SARS-COV-2**

RECIFE
2024

PABLO CANTALICE SANTOS FARIAS

**FATORES GENÉTICOS E CO-INFEÇÃO NA GRAVIDADE DA COVID-19:
ASSOCIAÇÃO DO SNP rs699-GG E INFECÇÃO TRIPLA HIV/ *LEISHMANIA*
INFANTUM/ SARS-COV-2**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

Coorientador: Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino

RECIFE

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Farias, Pablo Cantalice Santos.

Fatores genéticos e co-infecção na gravidade da COVID-19: associação do SNP rs699-GG e infecção tripla hiv/ leishmania infantum/ SARS-CoV-2 / Pablo Cantalice Santos Farias. - Recife, 2024.

135 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2024.

Orientação: Reginaldo Gonçalves de Lima Neto.

Coorientação: Valdir de Queiroz Albino.

Inclui referências e apêndices.

1. COVID-19; 2. Polimorfismos de Nucleotídeo Único; 3. Co-infecção; 4. Fatores de Risco Genéticos; 5. Gene AGT. I. Lima Neto, Reginaldo Gonçalves de. II. Albino, Valdir de Queiroz. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

PABLO CANTALICE SANTOS FARIAS

**FATORES GENÉTICOS E CO-INFECÇÃO NA GRAVIDADE DA COVID-19:
ASSOCIAÇÃO DO SNP rs699-GG E INFECÇÃO TRIPLA HIV/ *LEISHMANIA*
INFANTUM/ SARS-COV-2**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

Coorientador: Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Aprovado em, Recife-PE __ de _____ de 2024

Banca examinadora:

Membro 1 (interno) _____

Membro 2 (interno) _____

Membro 3 (interno) _____

Membro 4 (externo) _____

Membro 5 (externo) _____

AGRADECIMENTOS

Gostaria inicialmente de agradecer a Papai do céu por sempre tentar me convencer de que essa luta valeria a pena. Quem é pós-graduando /pesquisador no Brasil sabe que essa luta não é fácil e que é você por você. Só você decide pra onde quer ir, e se quer desistir ou não. Tive diversos momentos em que pensei duas vezes antes de seguir em frente, mas, sinceramente, não me enxergo fazendo outra coisa, que não pesquisa (e mais recentemente, o ensino).

Meu doutorado teve contribuição na minha trajetória de graduando, com professores que me inspiraram a chegar até aqui, a exemplo prof. Dr. Marcelo Tabarelli e prof. Dr. Rodrigo Torres, que nos incentivaram a ler cada vez mais e a refletir sobre o mundo ao nosso redor. Afinal, se não lêssemos, não teríamos poder para argumentar nossas concepções. Hoje observamos que o mundo está lendo menos e mais raso em suas ideias. Quero deixar aqui minha gratidão à toda vivência que tive na UFPE, onde convivi com pessoas de diferentes histórias, realidades, ideias, religiões, cores, gêneros etc. Foi aqui onde vivi e aprendi com essa diversidade, e pude abrir minha mente pro mundo e lançar meu senso crítico aos diferentes processos da sociedade.

Gratidão também às primeiras experiências da iniciação científica, no Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE), onde pude pela primeira vez pisar num lugar onde eu jamais pensei que pude pisar. Lá conheci excelentes pesquisadores que também pude me inspirar e tive a oportunidade de lidar com equipamentos, técnicas, aprendizados dentro do laboratório, que me ajudaram a seguir em frente. Aproveitando o parágrafo do IAM, quero dizer que lá pude ter IRMÃOS que a ciência me deu e que carrego até hoje como colaboradores. Quero citar aqui Dr. José Valter (vulgo Valtxinho), Dr. André Pastor e Dr. Ricardo Durães. Esses pesquisadores me inspiraram (e me inspiram até hoje) a chegar até aqui de modo que nem percebi o tempo passar. Saudade dos cafezinhos da tarde somados a projetos de pesquisa na mente. Gratidão, meus caros!

Quero também agradecer aos pequenos insucessos nessa jornada, que apesar de terem sido difíceis, eu aprendi com eles. As más relações, os insucessos experimentais que comprometeram prazos, broncas etc. Tudo isso me tornou melhor, claro, com uma dose de terapia. Sou grato à minha fase acadêmica do mestrado, em que aprendi a fazer experimentos que nunca me imaginei estar fazendo. Hoje percebo quantas diferentes áreas me meti e aprendi. Após o mestrado tive a oportunidade de tocar projetos com a equipe do LDT (Laboratório de Doenças Transmissíveis) do IAM, onde fique como técnico por um curto período. Minha imensa gratidão à Dra. Zulma Medeiros por ser tão solícita e por nos tratar tão bem. À sua

equipe, na época, Dr. Gilberto Bezerra (vulgo “o publicante”), Dr. Walter Lins (“Waltinho”), Dra. Amanda Xavier (vulgo Amandona), Ma. Amanda Vieira (vulgo Amandinha), Dr. Diego Guedes e Dra. Elis Dionísio. Vocês são uma equipe muito especial, com muita proatividade e de muitas ideias promissoras. Obrigado por essa colaboração que continuamos até hoje!

Em 2020 tive a oportunidade de trabalhar com um projeto relacionado à COVID-19, e com isso, agradeço aos meus orientadores Dr. Reginaldo Gonçalves e Dr. Valdir Balbino, pela receptividade, compreensão e paciência. Anteriormente eu já almejava voltar a trabalhar com variantes genéticas e esse projeto caiu como uma luva, fiquei muito feliz. Quero deixar minha gratidão aqui também aos amigos do LABBE (Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva), em especial, a Dr. Wilson Júnior, que estimula todo mundo alí dentro com o seu bordão “boa, meu garoto!” após um simples “ligar de computador” kkk; Caio Andrey, por estar sempre à disposição para lançar novas ideias e projetos, e pelos cafezinhos e conversas da tarde; e Dr. Sérgio Paiva, professor da área de estatística, que me deu suporte e esteve sempre à disposição pra quaisquer dúvidas. O doutorado foi o período mais tranquilo da minha trajetória acadêmica (apesar da pandemia), eu realmente vivi esse processo, sem pressa, e pude terminar essa etapa com bons frutos colhidos. Eu não fiz isso sozinho, vocês também fazem parte dessa trajetória.

Quero também agradecer aos meus professores do doutorado, em especial, Dr. Ulysses Montarroyos e Dr. Ricardo Ximenes, por entregarem a mim algo que eu almejava desde quando eu saí da minha iniciação científica, a independência para realizar minhas análises estatísticas. Não vou mentir que no início, durante a primeira disciplina de bioestatística, eu sofri kkk, mas depois peguei o prumo e desenrolei. Isso pra mim foi um marco importante dessa longa trajetória! Obrigado profs! E aproveitando aqui, gostaria de agradecer aos meus/minhas colegas de turma que sempre estiveram dispostos (as) a se reunir pra sanar dúvidas, resolver broncas em conjunto e me ajudar.

Foi no período do doutorado também que tive a oportunidade de fazer meu primeiro concurso pra professor substituto, e melhor, ser aprovado nele! Papai do céu me deu esse presente que, creiam! Eu achava distante pra alcançá-lo. Fui convocado pela Universidade Federal de Alagoas (Unidade Educacional Penedo) e fui muito bem recebido pela equipe de professores de lá. Quero deixar minha gratidão em especial à profa. Dra. Maria Lenilda, que me recebeu me chamando de “professor Pablo” e eu mal acreditava nessa minha posição kkk. Gratidão às profas Dra. Katily Luize, Dra. Luciene Amaral e Ma. Rafaella Gregório que me agregaram ao grupo e me deram apoio e suporte para resolver as questões relacionadas ao ensino, pesquisa e administrativas da UFAL. Quero também citar a profa Camila Porto, que

sempre que vê um edital aberto relacionado às *startups*, lembra de mim e manda eu enviar um projeto inovador, mas nunca tenho tempo e acabo frustrado kkk. Quero agradecer à equipe de técnicos administrativos e de laboratório da UFAL Penedo, que sempre estiveram à disposição e que, assim como eu, gostam de um cafezinho e boas conversas. Gostaria de agradecer aos professores Dr. Cláudio Sampaio (Buia) e Dr. Jairo Schmitt por cederem também um espaço de trabalho na UFAL Penedo, um ambiente onde pude trabalhar pra terminar esse manuscrito aqui. Além disso, grato ao prof. Buia pelas conversas inspiradoras da sua época de estudante de pós, que ralou bastante pra chegar onde chegou. Quero agradecer aos discentes que me receberam muito bem nas minhas primeiras aulas e demonstraram apoio ao meu desenvolvimento no doutorado. Aqui, em especial, quero reforçar minha gratidão ao discente Iranides Silva, pelo apoio à minha trajetória do doutorado e pela disposição para desenvolver nossos projetos.

Quero explicitar aqui também minha gratidão à equipe da Faculdade Raimundo Marinho (FRM), localizada em Penedo, que me deram a oportunidade de poder lecionar algumas disciplinas nos cursos de enfermagem e fisioterapia. Em especial, quero deixar minha gratidão à Ma. Nayanne Alves, responsável técnica pelos laboratórios da FRM, pelo apoio e energias positivas destinadas à minha defesa de tese. Além dela, quero agradecer aos discentes pelos bons momentos em sala de aula e fora dela, vocês me acolheram muito bem!

Quero agradecer à minha mãe, Valéria da Luz, que desde criança esteve preocupada com a minha formação educacional, precisou fazer sacrifícios pra investir nos meus estudos. Graças a ela tive o privilégio de estudar em uma boa escola e ter uma boa base para prosseguir minha formação. Quero agradecer à minha namorada, Daivyane Mota, por todo apoio durante essa etapa. Daivyane vestiu a camisa junto comigo pra muita coisa além do doutorado, comemorou junto comigo incontáveis conquistas, desde a aprovação do doutorado até agora. Te amo meu bebê! Além disso, quero agradecer aos meus sogros; primeiro Edleuza Mota, que colocou meus artigos e meus concursos prestados em baixo do pé de São José e todo o time de santos do birô pra que tudo desse certo kkk, e a meu sogro Antônio da Rocha (vulgo “Xúnior”), que expressa seu orgulho por mim nas suas poucas palavras, que eu reparo kkk. Além deles, quero citar meu cunhado, Daivyson, que sempre manda felicitações ao saber das minhas conquistas. Obrigado pelo apoio! Quero também agradecer às minhas tias Auxiliadora, Fátima, Socorro e meu tio Sandro, que sempre demonstraram apoio e orgulho pela minha vida acadêmica.

*"A desinformação é uma ameaça global que
requer cooperação internacional para ser combatida."
(Antônio Guterres)*

RESUMO

A pandemia de COVID-19 foi mundialmente declarada em 12 de março de 2020. Até 15 de setembro de 2024 foi notificado um total de mais de 776 milhões de casos e mais de 7 milhões de óbitos ao redor do mundo. Sabe-se que fatores virais, ambientais e do hospedeiro estão envolvidos conjuntamente na modulação da doença, resultando em diferentes desfechos. Dentre os fatores virais, pode-se destacar a presença de outros agentes infecciosos que podem influenciar o desfecho clínico da doença, e dentre os fatores do hospedeiro, tem-se a influência de componentes genéticos, como a atuação de Polimorfismos de Nucleotídeo Único. Sendo assim, este estudo teve como objetivo investigar a associação entre os SNPs rs3806268 (*NLRP3*), rs4925543 (*NLRP3*), rs12150220 (*NLRP1*), rs455060 (*NLR4*), rs699 (*AGT*), rs1137101 (*LEPR*), and rs1801133 (*MTHFR*) e o desfecho grave/crítico em pacientes COVID-19 brasileiros. Para isso, um total de 100 pacientes foi incluído no estudo, compreendendo 66 casos e 34 controles. Dados de prontuários como idade, sexo, cor/raça, comorbidades, sintomas, hemograma, diagnóstico por RT-PCR e achados laboratoriais (ferritina, PCR, AST, ALT e d-dímero) foram coletados e planilhados. Os casos de COVID-19 foram classificados de acordo com as diretrizes da World Health Organization em leve/moderado e grave/crítico. Além dos dados clínico-epidemiológicos, amostras de 4 mL de sangue total foram coletadas, e destas, o DNA foi extraído, depois sequenciado e genotipado por sequenciamento de nova geração (NGS). Para interpretar os dados clínico-epidemiológicos, testes não paramétricos foram utilizados, como os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. O teste de Fisher e a regressão logística multivariada, considerando os Critérios de Informação de Akaike e Bayesiano, foram empregados para a análise de risco. Nesta, *Odds Ratios* (OR) foram calculados, com significância estabelecida em $p < 0,05$. Dentro da população estudada, foi descrito um relato de caso em que uma paciente do sexo feminino e 48 anos de idade apresentou COVID-19 grave juntamente com a co-infecção HIV/L. *infantum*. Os sinais e sintomas da paciente incluíram febre, tosse produtiva e dispnéia, bem como saturação de oxigênio $\leq 93\%$. Os dados clínico-laboratoriais evidenciaram linfopenia, leucopenia e neutropenia, enquanto os resultados laboratoriais indicaram níveis anormais de dímero D, AST, ALT, desidrogenase láctica, ferritina e proteína C-reativa. Uma tomografia computadorizada revelou 75% de comprometimento do parênquima pulmonar com opacidades em vidro fosco. Em relação a população estudada, entre os sete SNPs avaliados, apenas rs699-GG (*AGT*) (OR=8,07; $p=0,04$) foi significativamente associado a um aumento no risco de desenvolver COVID-19 grave/crítica. No relato de caso, a leucopenia associada ao HIV/L. *infantum* pode ter desempenhado um papel decisivo no desfecho clínico. São necessários mais estudos para entender melhor as estratégias diagnósticas e as medidas de manejo clínico para pacientes coinfectados com HIV/L. *infantum* que são suscetíveis à infecção por SARS-CoV-2. Na população estudada, o SNP rs699-GG (*AGT*) foi associado a um aumento no risco de COVID-19 grave/crítica, entretanto mais estudos são necessários a fim de compreender os mecanismos subjacentes que são resultados da influência desse SNP na COVID-19. Esses dados são relevantes para a compreensão da fisiopatologia da doença e prospecção de novas alternativas terapêuticas.

Palavras-chave: COVID-19; Polimorfismos de Nucleotídeo Único; Co-infecção; Fatores de Risco Genéticos; gene *AGT*.

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic was declared worldwide on March 12, 2020. By September 15, 2024, a total of over 776 million cases and more than 7 million deaths had been reported globally. It is known that viral, environmental, and host factors collectively modulate the disease, resulting in different outcomes. Among the viral factors, the presence of other infectious agents that may influence the clinical outcome of the disease can be highlighted. Among the host factors, the influence of genetic components, such as Single Nucleotide Polymorphisms, plays a significant role. Therefore, this study aimed to investigate the association between the SNPs rs3806268 (*NLRP3*), rs4925543 (*NLRP3*), rs12150220 (*NLRP1*), rs455060 (*NLRC4*), rs699 (*AGT*), rs1137101 (*LEPR*), and rs1801133 (*MTHFR*) and severe/critical outcomes in Brazilian COVID-19 patients. For this purpose, a total of 100 patients were included in the study, comprising 66 cases and 34 controls. Data from medical records, such as age, sex, race/ethnicity, comorbidities, symptoms, complete blood count, RT-PCR diagnosis, and laboratory findings (ferritin, CRP, AST, ALT, and D-dimer), were collected and tabulated. COVID-19 cases were classified according to the World Health Organization guidelines into mild/moderate and severe/critical. In addition to clinical-epidemiological data, 4 mL of whole blood samples were collected, from which DNA was extracted, sequenced, and genotyped using next-generation sequencing (NGS). To interpret the clinical-epidemiological data, non-parametric tests such as the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used. Fisher's exact test and multivariate logistic regression, considering the Akaike and Bayesian Information Criteria, were employed for risk analysis. In this analysis, Odds Ratios (OR) were calculated, with significance set at $p < 0.05$. Within the studied population, a case report was described in which a 48-year-old female patient presented with severe COVID-19 along with HIV/*L. infantum* co-infection. The patient's signs and symptoms included fever, productive cough, and dyspnea, as well as oxygen saturation $\leq 93\%$. Clinical-laboratory data revealed lymphopenia, leukopenia, and neutropenia, while laboratory results indicated abnormal levels of D-dimer, AST, ALT, lactate dehydrogenase, ferritin, and C-reactive protein. A computed tomography scan showed 75% involvement of the lung parenchyma with ground-glass opacities. Regarding the studied population, among the seven SNPs evaluated, only rs699-GG (*AGT*) (OR=8.07; $p=0.04$) was significantly associated with an increased risk of developing severe/critical COVID-19. In the case report, leukopenia associated with HIV/*L. infantum* may have played a decisive role in the clinical outcome. Further studies are needed to better understand diagnostic strategies and clinical management measures for patients co-infected with HIV/*L. infantum* who are susceptible to SARS-CoV-2 infection. In the studied population, the rs699-GG (*AGT*) SNP was associated with an increased risk of severe/critical COVID-19; however, more studies are required to understand the underlying mechanisms resulting from the influence of this SNP on COVID-19. These data are relevant for understanding the pathophysiology of the disease and exploring new therapeutic alternatives.

Keywords: COVID-19; Single Nucleotide Polymorphisms; Co-infection; Genetic Risk Factors; *AGT* gene.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGT – Angiotensinogênio
AH – *Alfa Hospital*
AIC – *Akaike Information Criterion*
AIM2 – *Absent in Melanoma 2*
ALT – Alanina Aminotransferase
AMH – *Agamenon Magalhães Hospital*
APC – *Antigen Presenting Cell*
AST – Aspartato Aminotransferase
AVC – Acidente Vascular Cerebral
BHE – Barreira Hematoencefálica
BIC – *Bayesian Information Criterion*
cAMP – *Cyclic Adenosine Monphosphate*
CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*
CH – *Clinics Hospital*
CMV – Citomegalovirus
DNA – *Deoxyribonucleic Acid*
EBV – *Epstein-Barr Virus*
GRB2 – *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*
HBV – *Hepatitis B Virus*
HC – Hospital das Clínicas
HCC – Hepatocelular Carcinoma
HIV – *Human Immunodeficiency Virus*
HPV – *Human Papillomavirus*
HSV – *Human Simplex Virus*
IFN- γ – Interferon Gamma
IFN- α – Interferon Alfa
IFN- β – Interferon beta
IL-1 – Interleucina 1
IL-10 – Interleucina 10
IL-18 – Interleucina 18
IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-2 – Interleucina 2
IL-33 – Interleucina 33
IL-4 – Interleucina 4
IL-6 – Interleucina 6
IL-8 – Interleucina 8
LDH – *Lactate Dehydrogenase*
LEPR – *Leptin Receptor*
LPG – *Lipophosphoglycan*
LTR – *Long Terminal Repeat*
LV – Leishmaniose Visceral
MCP-1 – *Monocyte Chemoattractant Protein-1*
5- MTHF – *5-Methyltetrahydrofolate*
MTHFR – *Methylenetetrahydrofolate Reductase*
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
NF- κ B – *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NGS – *Next-Generation Sequencing*
NHBE – *Normal Human Bronchial Epithelial cells*
NIH – *National Institute of Health*
NLRC4 – *NLR Family, CARD domain containing 4*
NLRP1 – *NLR Family pyrin domain containing 1*
NLRP3 – *NLR Family pyrin domain containing 3*
NSP5 – *Non-Structural Protein 5*
OBR – *Obesity Receptor*
OMS – *Organização Mundial de Saúde*
OR – *Odds Ratio*
PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
PCR – *Proteína C Reativa*
PD-1 – *Programmed Cell Death Protein 1*
PLWH – *People Living with HIV*
PTB – *Pulmonary tuberculosis*
PTPN1 – *Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 1*
RNA – *Ribonucleic Acid*
RSV – *Respiratory Syncytial Virus*
RT-PCR – *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

SHB2 – *Src Homology 2-B domain-containing protein 2*

SHMT – *Serine hydroxymethyltransferase*

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

SRA – *Sistema Renina-Angiotensina*

TB – *Tuberculose*

TGF- β – *Transforming Growth Factor-Beta*

Th1 – *Type 1 T helper*

Th2 – *Type 2 T helper*

THF – *Tetrahydrofuran*

TMPRSS2 – *Transmembrane Serine Protease 2*

TNF – α – *Tumor Necrosis Factor Alpha*

UFPE – *Universidade Federal de Pernambuco*

UTI – *Unidade de Terapia Intensiva*

VCF – *Variant Call Format*

VZV – *Varicella-Zoster Virus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Sintomas da COVID-19	18
Figura 2-Via do inflamassoma e mecanismos de ativação pela infecção do SARS-CoV-2.	22
Figura 3-Mecanismo do SRA e seus efeitos inflamatórios e metabólicos.....	26
Figura 4-Mecanismo RAS e sua associação a mecanismos inflamatórios	27
Figura 5-Metabolismo do folato/homocisteína simplificado evidenciando as vias de remetilação e transsulfuração	32
ARTIGO 1:	
Figura 1.- Principais evolução clínica, achados laboratoriais e tratamentos durante a hospitalização	51
Figure 1- Main clinical evolution, laboratory findings and treatments during the patient's hospitalization	105

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1:

Tabela 1- Dados de hemograma, achados laboratoriais e condições clínicas durante as três internações.	48
--	----

ARTIGO 2:

Tabela 1. Valores qui-quadrado para medida do Equilíbrio de Hardy-Weinberg	64
Tabela 2. Distribuição por dados socioepidemiológicos, características clínicas e evolução do paciente.....	65
Tabela 3. Frequências genotípica e alélica por desfecho clínico e diagnóstico.	67
Tabela 4. Associação ajustada entre os SNPs estudados e os diferentes estágios clínicos da COVID-19.	68

APÊNDICE A:

Table 1. Hemogram data, laboratory findings, and clinical condition during three hospital admissions.	102
---	-----

APÊNDICE B:

Table I. Chi-square values and p value for measuring Hardy-Weinberg equilibrium.	119
Table II. Distribution by socioepidemiological data, clinical characteristics and patient evolution.....	120
Table III. Genotypic and allele frequency by clinical outcome and diagnosis	121
Table IV. Adjusted association between the SNPs studied and different clinical stages of COVID-19.....	123

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E TRANSMISSÃO DA COVID-19	15
2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA COVID-19	17
2.3 DIAGNÓSTICO	19
2.4 PATOGÊNESE	20
2.4.1 Resposta imune à COVID-19	20
2.4.2 Via do inflamassoma	22
2.4.3 Sistema renina-angiotensina (SRA)	24
2.4.4 Via da Leptina	28
2.4.5 Via do Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)	31
2.4.6 Patogênese das co-infecções	34
2.4.7 Fatores genéticos humanos e a gravidade da COVID-19	37
3 OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 RELATO DE CASO	44
4.2 COLETA DE DADOS, COMITÊ DE ÉTICA E DEFINIÇÃO CLÍNICA	44
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA, QUANTIFICAÇÃO E PROCESSAMENTO DE DADOS	45
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5 RESULTADOS	46
5.1 ARTIGO 1: COVID-19 GRAVE EM UMA PACIENTE CO-INFECTADA COM HIV/ LEISHMANIA INFANTUM: UM RELATO DE CASO TRATADO COM SUCESSO	46
5.2 ARTIGO 2: VARIANTE GENÉTICA DO GENE AGT (RS699-GG) ESTÁ ASSOCIADA À COVID-19 GRAVE EM PACIENTES BRASILEIROS	60
6 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
APÊNDICE A – ARTIGO 1: SEVERE COVID-19 IN HIV/LEISHMANIA INFANTUM COINFECTED PATIENT: A SUCCESSFULLY MANAGED CASE REPORT	99
APÊNDICE B – ARTIGO 2: GENETIC VARIANT IN THE AGT GENE (RS699-GG) IS ASSOCIATED WITH SEVERE COVID-19 IN BRAZILIAN PATIENTS	114

1 INTRODUÇÃO

A *Coronavirus Disease-19* (COVID-19) se tornou epidêmica em Wuhan, China², a partir de um surto de casos de insuficiência respiratória e foi declarada pandêmica pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 11 de março de 2020 (WHO, 2024a). É considerada uma das maiores e mais mortais pandemias do último século, causada pelo *Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2* (SARS-CoV-2) (Feehan, 2021). SARS-CoV-2 é um *betacoronavirus* helicoidal e envelopado que possui como material genético um RNA fita simples, senso positivo de 30 kb, filogeneticamente relacionado ao SARS-CoV-1 (Zhu *et al.*, 2020). Até setembro de 2024, mais de 776 milhões de casos e 7 milhões de mortes foram relatados em todo o mundo, tornando esta doença uma ameaça contínua à saúde global. No Brasil, a COVID-19 têm causado um total de mais de 37,5 milhões de casos, tornando o país o sexto colocado mundial no *ranking* de casos, além de mais de 702 mil mortes (WHO, 2024b).

A COVID-19 pode se manifestar no corpo humano após um período de incubação de, em média, 6,5 dias após a exposição ao vírus, no entanto, o intervalo desse período pode variar a depender da variante. Períodos de incubação da variante Delta têm sido descritos perfazendo uma média de 4,3 dias, enquanto que a Omicron têm sido relacionada a um intervalo de 3-4 dias (CDC, 2024a). O indivíduo infectado pode se manter infeccioso entre 1-2 dias após o início dos sintomas, até 8-10 dias após o seu início (CDC, 2024b). A infecção pelo SARS-CoV-2 pode não causar sintomas em alguns indivíduos, apresentando-se estes, assintomáticos. Quando os sintomas são exibidos após um teste positivo, o indivíduo é classificado até aquele momento como pré-sintomático. Os sintomas normalmente se confundem com os de outras doenças virais respiratórias como vírus influenza e vírus sincicial respiratório (RSV), que podem incluir febre, tosse, dificuldade para respirar, fadiga, cefaleia, mialgia, entre outros sintomas que podem abranger o trato gastrointestinal, como náuseas, vômito e diarreia. Dentro do espectro sintomatológico, a COVID-19 pode ser classificada em doença leve para moderada, em que indivíduos apresentam qualquer dos sinais e sintomas anteriormente citados mas que não necessitam de oxigenação, com saturação (SpO₂) permanecendo $\geq 94\%$ em ar ambiente. A doença grave inclui os indivíduos que possuem SpO₂ $< 94\%$ em ar ambiente e necessitam de oxigenação suplementar. Já os indivíduos com doença crítica possuem insuficiência respiratória (CDC, 2024b).

Nesse contexto, vários fatores são conhecidos por contribuir para os diferentes desfechos, dentre eles; fatores virais, podendo incluir co-infecções; e fatores genéticos humanos, como a

influência de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) em genes envolvidos na resposta imune inata, metabolismo energético e sistema circulatório (Aladag *et al.*, 2023; Farias *et al.*, 2024; Marei *et al.*, 2023; Pastor *et al.*, 2023). Vários estudos têm descrito o uso intenso de antibióticos durante internação de indivíduos com COVID-19, entretanto, evidências apontam para o maiores frequências de quadros clínicos inflamatórios graves associados a marcadores sorológicos de resistência antimicrobiana (Wan *et al.*, 2020; WHO, 2023; Wang *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020; Xia *et al.*, 2020). Além disso, casos de co-infecção entre HIV/*Leishmania* pode se tornar cada vez mais comum em indivíduos com COVID-19, uma vez que a alta circulação da leishmaniose, promovida pela urbanização descontrolada, pode se encontrar com a alta dispersão do HIV e do SARS-CoV-2. No entanto, mecanismos imunes regulatórios nesse contexto permanecem elusivos (Costa, 2008; Farias *et al.*, 2024). Em relação aos fatores genéticos do hospedeiro humano, os SNPs podem ter um papel crucial na regulação gênica em diversos genes metabólicos, bem como na estrutura da proteína envolvida (Lalonde *et al.*, 2011)

Os genes *NLRP3* (NLR family pyrin domain containing 3), *NLRP1* (NLR family pyrin domain containing 1) e *NLRC4* (NLR family CARD domain containing 4) desempenham funções relevantes na resposta imune inata a vírus e outras condições patológicas. Esses genes codificam receptores citoplasmáticos da via do inflamassoma, que estão envolvidos na gravidade de várias doenças (Sutterwala; Haasken; Cassel, 2014). Além disso, os genes *AGT* (angiotensinogênio) e *MTHFR* (metilenotetrahidrofolato redutase) são importantes para funções vasculares do sistema renina-angiotensina (RAS) e para funções metabólicas, regulando e estabilizando moléculas, respectivamente (Foley; Steinberg; Goldnberg, 2021; Xi *et al.*, 2016). O gene *LEPR* (Receptor de Leptina) codifica o receptor do hormônio leptina, que é importante para o metabolismo de gordura e linfopoiese (NCBI, 2023). Além disso, foi identificado como um potencial indutor para angiogênese, proliferação celular e inibição de apoptose celular durante a infecção por SARS-CoV-2 (Rosa *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2013).

O funcionamento de vários genes, incluindo os descritos acima, pode ser modulado pela ação dos SNPs, que podem desempenhar um papel crucial na regulação da expressão gênica e na conformação da proteína correspondente (Cafiero *et al.*, 2021; 2020; Loktionov *et al.*, 2024; Pastor *et al.*, 2023). Para o gene *NLRP3*, foi observado que o rs3806268 pode ter um papel fundamental em pacientes com COVID-19 que possuam obesidade como uma das comorbidades relacionadas ao desfecho grave (Neira-Goulart *et al.*, 2023). Além disso, o SNP rs4925543, situado no mesmo gene, foi investigado por seu papel inflamatório nas vias aéreas em pacientes com asma (Queiroz *et al.*, 2020). A variante rs12150220 (*NLRP1* - p.Leu155His) tem sido relacionada ao aumento de IL-1 β em Células Mononucleares do Sangue Periférico

(PBMCs) e foi associada à COVID-19 grave (Levandowski *et al.*, 2013; Leal *et al.*, 2022). A variante rs455060 (*NLR4*) desempenha um papel fundamental para os níveis de IL-18, que são importantes para o desfecho clínico da COVID-19 grave (Zeller *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2023). No Sistema Renina-Angiotensina (RAS), o SNP rs699 (*AGT*) foi identificado como um potencial *locus* genético para prever o risco clínico em pacientes infectados com SARS-CoV-2 (Cafiero *et al.*, 2021). Em relação ao metabolismo da homocisteína, o SNP rs1801133 (*MTHFR*) foi apontado como um potencial marcador genético pode impactar o desfecho da COVID-19 (Farha *et al.*, 2020). Para o gene *LEPR*, alguns SNPs foram estudados quanto a sua associação a outras doenças infecciosas e patologias do sistema digestório. Por exemplo, Lys109Arg e Gln223Arg foram analisados quanto a sua associação ao carcinoma hepatocelular (HCC) em indivíduos portadores do vírus da hepatite B (HBV), e rs1137101-A foi associado a um maior risco de desenvolver altos níveis de colesterol (Queiroz *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2020).

Com base no panorama descrito, o presente estudo teve como objetivo investigar a associação entre os SNPs rs3806268 (*NLRP3*), rs4925543 (*NLRP3*), rs12150220 (*NLRP1*), rs455060 (*NLR4*), rs699 (*AGT*), rs1137101 (*LEPR*) e rs1801133 (*MTHFR*) e os desfechos graves/críticos em pacientes brasileiros com COVID-19.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E TRANSMISSÃO DA COVID-19

O surto da doença do coronavírus 2019 (COVID-19) causado pelo SARS-CoV-2 tornou-se uma emergência de saúde pública de interesse internacional (PHEIC) (Zhou *et al.*, 2020). Inicialmente descoberto em meados de dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, província de Hubei, China, tomou proporções significativas após uma série de casos de insuficiência respiratória em alguns hospitais da região (Wu *et al.*, 2020). De acordo com a comissão Nacional de Saúde chinesa, em 2 de março de 2020 havia cerca de 80.302 casos registrados em 31 províncias daquele país, sendo notificadas 2947 mortes (NATIONAL HEALTH COMMISSION OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA, 2020). Até o dia 11 de março, já era registrado um total de 121.564 casos confirmados com 4.373 mortes em 110 países do globo (Dong; Du; Gardner, 2020).

Segundo dados epidemiológicos, a forma de transmissão mais comum se dá por meio de gotículas de saliva contendo partículas virais que podem ser emitidas durante a respiração, a fala e também o espirro e a tosse (OPAS, 2020). Exposição prolongada (15 minutos ou mais) e um distanciamento de menos de 2 metros a um indivíduo infectado e uma breve exposição a um indivíduo sintomático são fatores que também estão associados a um maior risco de transmissão (Chu *et al.*, 2020). A transmissão vertical também tem sido relatada, porém em baixo risco. Na maioria dos casos, as mães foram infectadas no terceiro trimestre de gravidez e os neonatos não tiveram consequências clínicas graves (Chen *et al.*, 2020; Dashraath *et al.*, 2020; Zeng *et al.*, 2020).

É importante salientar o processo de transmissão por fômites, em que um indivíduo doente entra em contato com objetos inanimados que portarão as partículas virais por cerca de 3 a 4 dias (em caso de superfície impermeável e a depender das condições ambientais locais), podendo ser contactado por outro indivíduo dando continuidade ao processo infeccioso (OPAS, 2020; Wiersinga *et al.*, 2020). Superfícies impermeáveis, como plástico e aço inoxidável garantem a manutenção de carga viral considerável em comparação a superfícies permeáveis, como o papelão, porém, após 48 a 72 horas, as partículas virais em superfícies decaem consideravelmente (Van Doremalen *et al.*, 2020).

A carga viral no trato respiratório superior parece atingir o seu pico próximo ao início dos sintomas e cerca de 2 a 3 dias antes da fase sintomática (pré-sintomática) já é possível constatar significativa eliminação viral, ou seja, o sujeito infectado consegue transmitir antes mesmo de saber que está doente, por isso o alto grau de transmissibilidade do SARS-CoV-2 (Bai *et al.*, 2020; He *et al.*, 2020; Wei *et al.*, 2020). Portadores assintomáticos também possuem competência para transmitir, em taxa variando de 4 a 32%, porém os dados referentes aos portadores assintomáticos são elusivos devido a possibilidade de quadros clínicos amenos e pré-sintomáticos (Byambasuren *et al.*, 2020; Tabata *et al.*, 2020). Uma revisão sistemática sugeriu que a transmissão de um portador assintomático verdadeira é provavelmente incomum (Byambasuren *et al.*, 2020).

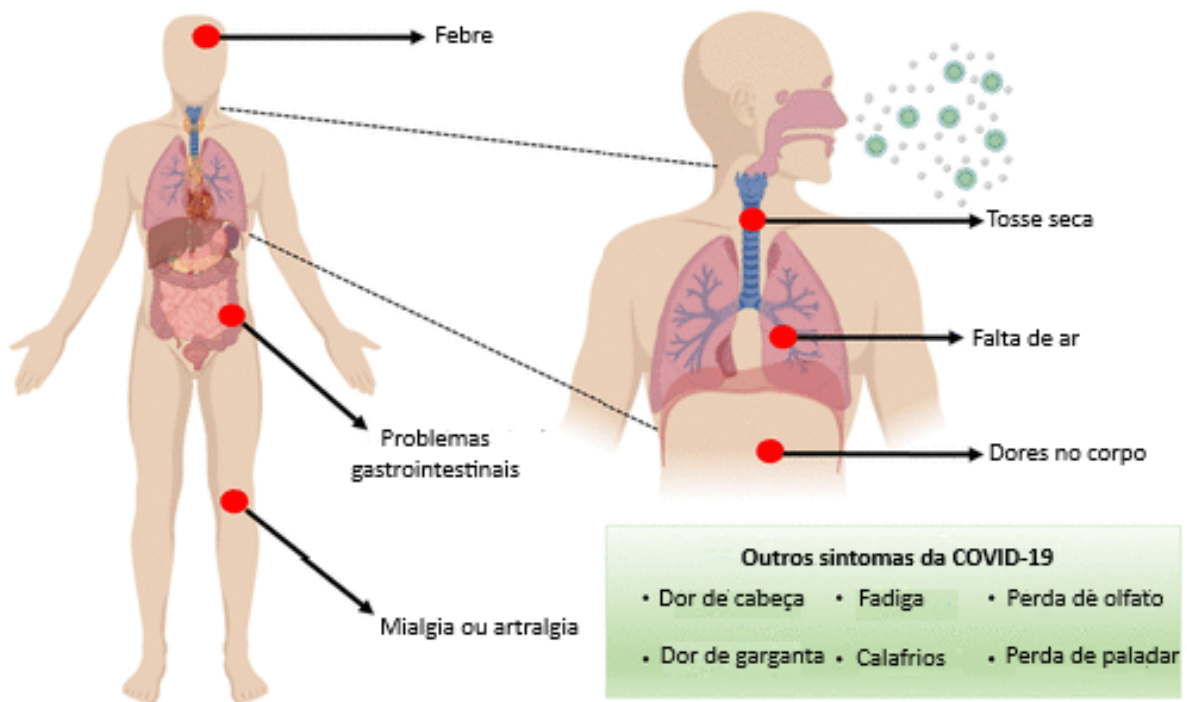
Embora o ácido ribonucleico viral seja detectado em material coletado de garganta em até seis semanas após o início dos sintomas, alguns estudos sugerem cultura viral negativa para SARS-CoV-2 oito dias após o início dos sintomas (He *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2020; Wolfel *et al.*, 2020). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças recomendam o isolamento de pelo menos 10 dias e a permanência de mais três dias após a melhora dos sintomas, porém ainda existem inconsistências sobre a dinâmica sintomatológica em indivíduos imunossuprimidos ou em estado crítico da doença, podendo ocorrer retardo nessas fases (CDC, 2020; Wiersinga *et*

al., 2020). Assim, são necessários melhoramentos em testes diagnósticos a fim delimitar os processos sintomatológicos da COVID-19 em diferentes tipos de pacientes.

2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA COVID-19

O período médio de incubação da doença na maioria dos casos é de aproximadamente 5 dias, podendo variar de 2 a 7 dias, e alcançar 14 dias (Guan *et al.*, 2020; Lauer *et al.*, 2020). Em seguida, o paciente pode dar início aos sintomas, como febre (em 90% dos casos), tosse seca (60%-86%), falta de ar (53%-80%), fadiga (38%), náuseas e vômitos, ou diarreia (15%-39%), e mialgia (15%-44%) (Docherty *et al.*, 2020; Garg *et al.*, 2020; Guan *et al.*, 2020; Grasselli *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020; Mao *et al.*, 2020; Richardson *et al.*, 2020). Além desses, o paciente pode vir a apresentar sintomas não clássicos, como disfunções gastrintestinais, alterações olfativas e gustativas, estas últimas sendo relatadas em 64% a 80% dos pacientes (Helms *et al.*, 2020; Lechien *et al.*, 2020; Spinato *et al.*, 2020). Anosmia e ageusia podem ser os únicos sintomas em 3% dos pacientes (Spinato *et al.*, 2020). Normalmente, o intervalo médio de tempo aproximado entre o início dos sintomas e a admissão hospitalar é de 7 dias (entre 3 e 9 dias) (Garg *et al.*, 2020). A idade média dos pacientes internados varia entre 47 e 73 anos (sendo entre 74% e 86% com no mínimo 50 anos), tendo preponderância masculina de cerca de 60% (Docherty *et al.*, 2020; Guan *et al.*, 2020; Richardson *et al.*, 2020).

Figura 1-Sintomas da COVID-19



Fonte: Silva *et al.*, (2020, tradução própria)

As complicações da COVID-19 acometem alguns sistemas, como coração, pulmão, fígado, rim, cérebro e sistema de coagulação (Wiersinga *et al.*, 2020). Miocardite, cardiomiopatia, arritmias ventriculares e instabilidade hemodinâmica são complicações comuns (Hendren *et al.*, 2020; Long *et al.*, 2020). Em até 8% dos pacientes são observadas doenças cerebrovasculares agudas e encefalites (Helms *et al.*, 2020; Mao *et al.*, 2020). Ainda, eventos tromboembólicos podem ser observados em 31%-59% dos pacientes de UTI (Klok *et al.*, 2020; Middeldorp *et al.*, 2020).

Apesar de 25% dos pacientes infectados apresentarem alguma comorbidade, cerca de 60% a 90% dos pacientes infectados hospitalizados apresentam algum tipo de comorbidade (Docherty *et al.*, 2020; Garg *et al.*, 2020; Grasselli *et al.*, 2020; Richardson *et al.*, 2020). As comorbidades mais comuns entre os pacientes hospitalizados incluem obesidade (48,3%), hipertensão (48% a 57% dos pacientes), diabetes (17% a 34%), doença cardiovascular (21% a 28%), doença pulmonar crônica (4% a 10%), doença renal crônica (3% a 13%), malignidade (6% a 8%) e doença hepática crônica (<5%) (Garg *et al.*, 2020; Grasselli *et al.*, 2020; Richardson *et al.*, 2020).

Entre 17% e 35% dos pacientes internados com COVID-19 são tratados em uma UTI devido à insuficiência respiratória hipoxêmica e de 29% a 91% deles requerem ventilação mecânica invasiva (Docherty *et al.*, 2020; Grasselli *et al.*, 2020; Myers *et al.*, 2020; Yang *et al.*,

2020). Além disso, esses pacientes podem desenvolver lesão renal aguda (9%), disfunção hepática (19%), sangramento e disfunção da coagulação (10%-25%) e choque séptico (6%) (Chen *et al.*, 2020; Levi *et al.*, 2020; Mao *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020).

2.3 DIAGNÓSTICO

Normalmente o diagnóstico de COVID-19 é realizado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de amostra de secreção nasal. Devido ao número de resultados falso-negativos existentes relacionados à técnica, outros tipos de diagnósticos têm sido empregados, como o clínico, laboratorial e o uso de exames de imagem (tomografia pulmonar) (Wiersinga *et al.*, 2020). A sensibilidade da RT-PCR varia com a adequação da coleta do espécime e com o tempo de exposição à doença. Estudos realizados fazendo uso de algoritmos indicam que a sensibilidade da técnica alcança 33% em quatro dias após a exposição, 62% no dia do início dos sintomas e 80% três dias após o início dos sintomas (Kucirka *et al.*, 2020; Sethuraman *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Ainda, amostras provenientes de 205 pacientes na China foram obtidas de diferentes sítios do trato respiratório, sendo obtidas diferentes taxas de positivities, como lavagem broncoalveolar 93%, seguido por escarro 72%, esfregaços nasais 63%, esfregaços faríngeos 32% (Wang *et al.*, 2020). Além disso, o SARS-CoV-2 pode ser detectado nas fezes, mas ainda não há registros sobre o diagnóstico em urina (Wang *et al.*, 2020). A saliva é outra fonte diagnóstica para o vírus, havendo menos necessidade de uso de equipamentos de proteção individual e menos esfregaços, mas requer validação adicional (Williams *et al.*, 2020).

Os testes sorológicos podem ajudar no diagnóstico e medição das novas respostas a vacinas (Guo *et al.*, 2020; Sethuraman *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020), porém sabe-se que nem todos os anticorpos encontrados contra a infecção são neutralizantes. Além disso, ainda não se sabe sobre a possibilidade de haver exacerbação da infecção dependente de anticorpo durante uma segunda infecção ou quanto tempo dura a proteção desses anticorpos (Wiersinga *et al.*, 2020). Os anticorpos IgM podem ser identificados no quinto dia após a infecção, alcançando o pico dentro de duas a três semanas da doença, enquanto que IgG é observado em aproximadamente 14 dias da doença (Guo *et al.*, 2020; Sethuraman *et al.*, 2020). Os ensaios sorológicos disponíveis incluem ensaios rápidos e imunoenzimáticos de alto rendimento. Entretanto, o desempenho, a precisão e a validade deles ainda são variáveis (Bond *et al.*, 2020).

Acerca dos achados laboratoriais, possíveis marcadores da COVID-19 podem ser evidenciados, como proteína C reativa (elevada em mais de 60% dos pacientes chineses

estudados), lactato desidrogenase (elevada em 50%-60%), alanina aminotransferase (elevada em aproximadamente 25%) e aspartato aminotransferase (aproximadamente 33%) (Rodriguez-Morales *et al.*, 2020). Aproximadamente 75% dos pacientes tiveram níveis de albumina baixos (Rodriguez-Morales *et al.*, 2020). É bastante comum também a contagem baixa dos níveis linfocitários (linfopenia - $<1 \times 10^9/L$) que pode ser observada em mais de 80% dos pacientes hospitalizados com COVID-19 (Guan *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020). Prolongamento dos tempos de protrombina também tem sido evidenciado em mais de 5% dos pacientes, leve trombocitopenia em cerca de 30%, elevação dos valores de dímero D em 43%-60% também são comuns (Chen *et al.*, 2020; Guan *et al.*, 2020; Levi *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2020; Thachil *et al.*, 2020). Entretanto, essas características laboratoriais são ainda inespecíficas e frequentes em pacientes com pneumonia. Desses fatores, dímero D e linfopenia têm sido associados a um prognóstico mais grave da doença (Wu *et al.*, 2020).

Em relação às características diagnósticas de imagem, tem-se o achado de opacidades de vidro fosco periféricas difusas através de tomografias computadorizadas em pacientes hospitalizados com COVID-19 (Shi *et al.*, 2020). As opacidades de vidro fosco possuem espessamento do tecido pleural adjacente, margens mal definidas, espessamento interlobular ou septal liso ou irregular e broncogramas aéreos (Shi *et al.*, 2020). Os achados de tomografia computadorizada e radiografia do tórax podem ser considerados normais em pacientes na fase inicial da doença (aproximadamente 15% e 40%, respectivamente) (Guan *et al.*, 2020). É importante salientar que o valor diagnóstico da tomografia computadorizada é limitado porque as características citadas sobrepõem-se às de outras infecções. Além disso, pacientes confirmados por diagnóstico molecular RT-PCR podem apresentar exames tomográficos normais, ou ainda exames tomográficos anormais compatíveis com COVID-19 podem ser achados antes mesmo da detecção do RNA do SARS-CoV-2 (Bernheim *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2020).

2.4 PATOGÊNESE

2.4.1 Resposta imune à COVID-19

Semelhantemente a outras doenças virais que acometem o trato respiratório, como a gripe, a COVID-19 é marcada por uma linfopenia intensa possivelmente também devido à infecção do SARS-CoV-2 em linfócitos T (Wiersinga *et al.*, 2020). Além disso, a linfopoiese fica

comprometida devido à resposta inflamatória induzida pelo vírus, compreendida tanto pela imunidade inata quanto adaptativa, que estimula apoptose de linfócitos (Wiersinga *et al.*, 2020).

À medida que a replicação viral acelera, a barreira epitelial-endotelial fica comprometida devido à resposta inflamatória local e à indução de morte celular pelo vírus. No pulmão, o SARS-CoV-2 induz inflamação nas células endoteliais dos capilares, desencadeando um influxo de monócitos e neutrófilos, causando assim endotelialite, espessamento difuso da parede alveolar e edemas, sendo estes caracterizados em tomografia computadorizada como opacidades em vidro fosco (Xu *et al.*, 2020). Como consequência do edema pulmonar preenchendo os espaços alveolares, há a ruptura da barreira endotelial, comprometendo também a difusão do oxigênio entre alvéolo e capilar (Van de Veerdonk *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020).

O efeito pró-inflamatório induzido pelo SARS-CoV-2 se inicia a partir do reconhecimento do vírus pelo receptor ACE2 e seu co-receptor TMPRSS2, que vai gerar ativação de AR-1 e, consequentemente, dos fatores de transcrição NF- κ B, IRF3 e IRF7, que irão atuar em genes de várias citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão, culminando na expressão destes (Ragab *et al.*, 2020) (Figura 3). Esses eventos resultam no recrutamento de leucócitos e proteínas do sistema imune ao local de infecção, onde várias funções efetoras serão realizadas (Thompson *et al.*, 2011). Citocinas importantes podem atuar no local e em circulação, como IL-1, IL-1 β , IL-2, IL-6, interferons, MMP-1, MMP-3, MCP-1, IL-8 e TNF- α , promovendo estado antiviral, inflamação local e comunicação celular (Han *et al.*, 2020). Inicialmente, as células envolvidas nesse processo são macrófagos, mastócitos, células epiteliais e endoteliais (Ragab *et al.*, 2020) (Figura 3). É importante destacar o papel da IL-2 como potencial proliferativa em células TCD4⁺ e como a citocina que apresenta altos níveis reportados em pacientes sintomáticos não graves (Zuo *et al.*, 2021). Além disso, a IL-2 apresenta papel crucial na memória imunológica desses pacientes por até seis meses após o início da infecção (Zuo *et al.*, 2021).

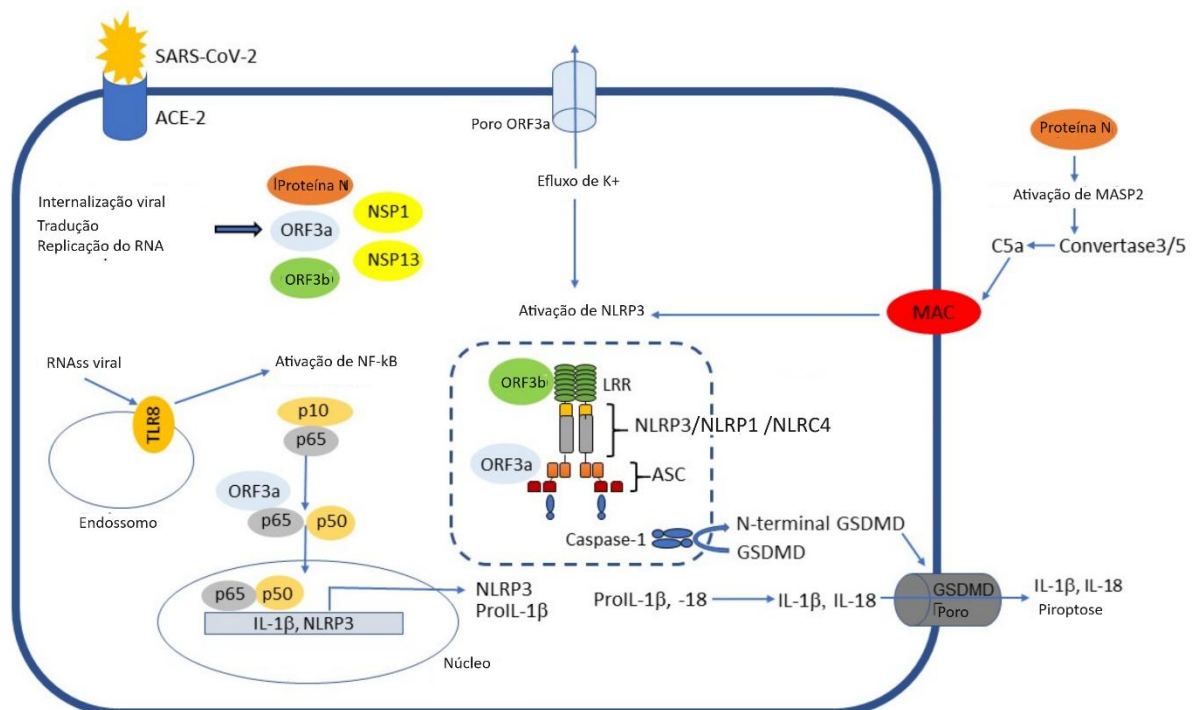
A tempestade de citocinas ocorre a partir de um aumento abrupto na produção e circulação de citocinas pró-inflamatórias, como as anteriormente citadas, resultando em aumento no infiltrado e expansão de células imunes como macrófagos, neutrófilos e células T provenientes da circulação, levando a efeitos destrutivos teciduais como desestabilização das interações entre células endoteliais, danos capilares e da barreira vascular, danos alveolares difusos, insuficiência multi-órgão e morte. A injúria ao pulmão é uma das consequências da tempestade de citocinas, podendo levar ao desenvolvimento da síndrome respiratória aguda grave (SRAG), conduzindo o paciente a baixos níveis de saturação de oxigênio (Shimizu, 2019). Os mecanismos que regem a SRAG ainda não são completamente compreendidos, mas sabe-se

que a tempestade de citocinas é um dos fatores contribuintes nesse contexto (Chen *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020; Lai *et al.*, 2020).

2.4.2 Via do inflamassoma

Os inflamassomas são um complexo multiproteico que possui papel importante na regulação do sistema imune inato e sinalização inflamatória. Esse sistema é composto por receptores citosólicos que realizam o reconhecimento de padrões repetidos de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs). A via dos inflamassomas especificamente possui três receptores mais estudados para reconhecimento e ativação, são estes: *NOD-like receptor family pyrin domain containing 3* (NLRP3), *NOD-like receptor family pyrin domain containing 1* (NLRP1) e *NOD-like receptor family CARD domain containing 4* (NLRC4) (figura 1).

Figura 2-Via do inflamassoma e mecanismos de ativação pela infecção do SARS-CoV-2.



Legenda: Pode-se observar uma estrutura celular geral sendo infectada pelo SARS-CoV-2, exibindo os produtos gerados pela replicação e consequente ativação dos receptores do tipo *Toll Like* (TLRs) e via do inflamassoma.
Fonte: Adaptado de Kaivola; Nyman; Matikainen (2021, tradução própria).

O NLRP3 é ativado por uma variedade de estímulos que podem incluir PAMPs, DAMPs, cristais, toxinas e instabilidade de fluxo de íons celulares. Após sua ativação, NLRP3 oligomeriza-se e recruta, através de seu domínio PYD, a proteína adaptadora *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC ou PYCARD) que irá recrutar e ativar

procaspases-1, através do seu domínio CARD, e induzir sua autoclivagem em caspase-1. A proteína ASC possui papel fundamental para oligomerização e formação dos inflamassomas, e ativação da caspase-1. Após isso, a enzima caspase-1 cliva as proteínas pro-IL-1 β e IL-18 nas suas formas ativas, IL-1 β e IL-18 respectivamente, que são secretadas para mediar respostas inflamatórias. NLRP3 pode ser ativado em PBMCs pulmonares, por SARS-CoV-2, em pacientes moderados e graves, e níveis de caspase-1, IL-1 β e IL-18 estiveram associados à gravidade da doença e piores desfechos (Rodrigues *et al.*, 2021) (figura 1). Além disso, têm sido observado que o SARS-CoV-2 também é capaz de induzir ativação de caspase-8, promovendo assim, apoptose em células epiteliais pulmonares, conduzindo a liberação de IL-1 β por células *bystander* locais (Li *et al.*, 2020). Em detalhe, a literatura descreve as proteínas ORF3a, ORF3b, envelope (E) e nucleocapsídeo (N) como possíveis potenciais ativadoras do inflamassoma via NLRP3 (Yue *et al.*, 2018; Siu *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2019; Nieto-Torres *et al.*, 2015; Magro *et al.*, 2020) (figura 1).

O NLRP1 pode ser ativado principalmente por toxinas bacterianas, produtos derivados de outros patógenos e estresse celular, como por exemplo, a toxina letal (LT) de *Bacillus anthracis*, fragmentos de DNA/proteína bacteriana ou viral, e efeitos de terapêuticos nocivos ao DNA, por exemplo. Após sua ativação, o NLRP1 pode recrutar procaspases diretamente, sem a necessidade de ativação da proteína ASC, ou não. Após isso, o desfecho de ativação é aquele previsto no parágrafo anterior, com liberação das citocinas IL-1 β e IL-18 (Figura 1). É importante salientar que estudos recentes têm apontado ativação do NLRP1 por produtos virais, como é o caso da infecção por TGEV, em que NLRP1 foi expresso e funcionou como um gene estimulado por interferon (ISG) (He *et al.*, 2023). Tem sido observada também a sua ativação pela proteína NSP5 protease, do SARS-CoV-2, em linhagem celular epitelial brônquica humana (NHBE), conduzindo assim à piroptose. É importante destacar que outros coronavírus também podem ativar NLRP1 utilizando a NSP5, como SARS-CoV-1 e MERS-CoV (Planès *et al.*, 2022). Kaivole; Nyman; Matikainen (2021) ainda sugerem que novos estudos possam ser realizados com o intuito de observar também a influência da proteína NPS15 na ativação da NLRP1 durante a infecção por SARS-CoV-2. Ainda, é importante investigar a possível ativação gerada por RNA cadeia dupla durante a replicação viral, bem como a ativação via estresse do retículo endoplasmático (Kaivola; Nyman; Matikainen, 2021).

O NLRC4 pode ser ativado diretamente por flagelina, uma proteína que compõe o flagelo bacteriano. Além disso, NLRC4 pode ser ativado indiretamente pela proteína *NLR Family apoptosis inhibitory protein* (NAIP), que faz isso ao reconhecer o componente bacteriano citado. Após esse mecanismo, NLRC4 ativa o complexo inflamassoma, ativando ASC e os demais

componentes anteriormente citados. Em conjunto com NLRP3, o NLRC4 foi referido na literatura como importante ativador inflamatório por ativar CD86 em monócitos na resposta imune contra a proteína Spike 1 do SARS-CoV-2 (Tsukalov *et al.*, 2024). Além disso, outro estudo descreveu maior mortalidade e títulos virais aumentados em camundongos *NLRC4*^{-/-} infectados pelo vírus influenza A, o que reforça o importante papel do NLRC4 modulando APCs na resposta viral (Hornick *et al.*, 2019).

Os inflamassomas descritos aqui podem desempenhar papéis cruciais na resposta inflamatória ao SARS-CoV-2, o que pode contribuir para a defesa eficaz do organismo ao agente invasor ou à lesão tecidual oriunda da exacerbação de componentes inflamatórios da via. Ativação descontrolada da via pode conduzir ao quadro de tempestade de citocinas, o que pode levar ao quadro grave ou crítico da doença. Entender os processos regulatórios dos inflamassomas, bem como os possíveis mecanismos subsequentes, oferece percepções importantes sobre a fisiopatologia da COVID-19 e também potenciais alvos terapêuticos para o manejo de suas complicações. Assim, é importante que haja investigação contínua e robusta a fim de esclarecer os mecanismos de interação entre SARS-CoV-2 e os inflamassomas para dar luz a estratégias de prevenção e tratamento.

2.4.3 Sistema renina-angiotensina (SRA)

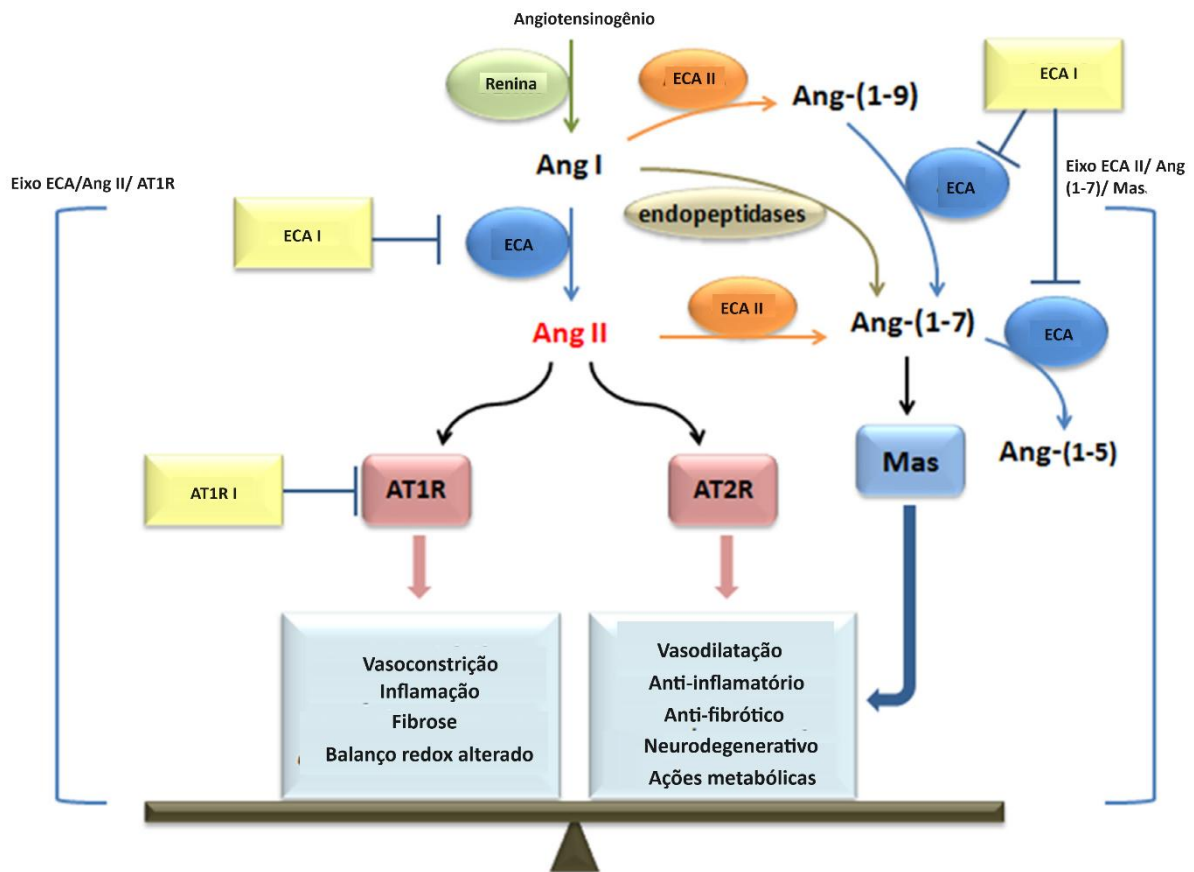
O SRA consiste de uma cascata de proteases que produzem algumas moléculas bioativas que desempenham um papel fundamental na regulação do volume sanguíneo, pressão arterial e equilíbrio de eletrólitos no organismo, mantendo assim a homeostase cardiovascular (Chappel *et al.*, 2016). Esse sistema é primariamente ativado em resposta à diminuição da pressão arterial ou do volume sanguíneo, e assim que detectadas essas mudanças, a renina, uma protease produzida pelas células justaglomerulares renais, é secretada (Martyniak; Tomasik, 2023).

A renina realiza a conversão do angiotensinogênio (AGT), que é produzido principalmente pelo fígado, em angiotensina I (Ang I), que é subsequentemente convertida em angiotensina II (Ang II) pela enzima conversora de angiotensina (ECA), altamente expressa em células endoteliais (Bellomo *et al.*, 2020; Belova, 2000) (Figura 2). A Ang II passa a atuar como um importante vasoconstritor, se ligando a receptores acoplados a proteína G, nesse caso o *Angiotensin II Type 1 Receptor* (AT1R), nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos, aumentando assim os níveis de cálcio nessas células (Atlas *et al.*, 2007) (Figura 2). A elevação dos níveis de cálcio induz alguns fenômenos como: contração celular, levando à vasoconstrição das artérias e arteríolas, inflamação, fibrose e balanço redox alterado (Beierwaltes, 2010;

D'Ardes *et al.*, 2020). A vasoconstrição, por consequência, provoca o aumento da resistência ao fluxo sanguíneo, tornando a pressão arterial mais elevada (Atlas *et al.*, 2007) (Figura 2). Ao se ligar ao *Angiotensin II Type 2 Receptor* (AT2R), ações protetivas e regenerativas são desencadeadas, como processos anti-inflamatórios e anti-fibróticos, e liberação de moléculas vasodilatadoras (D'Ardes *et al.*, 2020) (Figura 2).

Além desses processos, Ang II também pode estimular a liberação de outros agentes vasoconstritores que podem atuar induzindo a reabsorção de sódio e água nos rins, o que contribui para o aumento e subsequente normalização da pressão arterial (de Mello, 2017) (Figura 2). É importante salientar também que outra via de ativação pode atuar como regulatória neste processo, em que Ang I pode ser clivada por endopeptidases e pode originar Ang (1-7), que atua ativando receptores Mas, que induzirão também fenômenos protetivos e regenerativos semelhantes aos anteriormente citados (Bader *et al.*, 2014). Ainda, Ang I pode sofrer ação da ECA II, originando Ang (1-9), que sofrerá ação da ECA, originando Ang (1-7), culminando nos mesmos efeitos (Moraes *et al.*, 2017). Essa via também pode ser alcançada por Ang II, ao sofrer ação da enzima ECA II, originando Ang (1-7) e seus efeitos sucessores (D'Ardes *et al.*, 2020) (Figura 2).

Figura 3-Mecanismo do SRA e seus efeitos inflamatórios e metabólicos



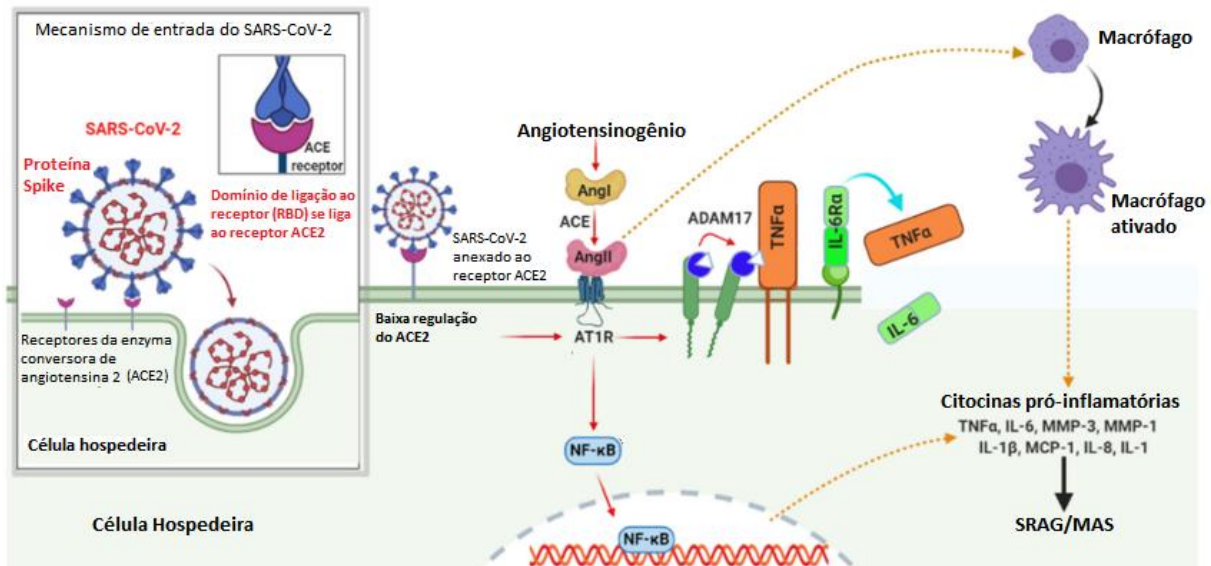
Legenda: Cascata iniciada pelo angiotensinogênio, que é convertido a Ang I e Ang II com o auxílio das enzimas renina e ECA respectivamente. Ang II pode se ligar aos receptores AT1R e AT2R gerando efeitos pró e anti-inflamatórios respectivamente. Por outro lado, Ang II sofre conversão pela ECA II em Ang (1-7) que vai se ligar ao receptor Mas, gerando também efeitos anti-inflamatórios.

Fonte: Adaptado de D'Ardes *et al.* (2020, tradução própria).

O AGT é uma proteína central muito importante do SRA, envolvida com a homeostase cardiovascular e é a única precursora de todos os peptídeos de angiotensina (Martinyak; Tomasik, 2023). Consiste de 485 resíduos de aminoácidos, é produzida em resposta a diferentes fatores, como níveis elevados de cortisol e estrogênios (Yiannikouris *et al.*, 2012). Em menores quantidades, AGT é expresso e secretado localmente no coração, rim, glândulas adrenais, cérebro, adipócitos e endotélio de vasos sanguíneos. Sua expressão se dá a partir do gene *AGT* que se localiza no cromossomo 1q42.2 (NCBI, 2024). A quantidade de AGT no tecido é determinada pela taxa de transcrição gênica, e a literatura tem demonstrado que Ang II mantém a estabilidade dos transcritos de AGT na forma de *feedback* positivo. Já a alta concentração de AGT inibe a atividade da renina (Jamaluddin *et al.*, 2000).

AGT é um membro da superfamília das serpinas (inibidoras serina proteases), que também inclui outras proteínas, como antitripsina $\alpha 1$, antitripsina $\alpha 1$ e antitrombina III. Sua produção é principalmente controlada por hormônios como estrogênios, esteroides e hormônios tireoidianos (Deschepper, 1994; Lu *et al.*, 2016). Após a clivagem enzimática, AGT é convertido em Ang I, Ang II e se ligar ao AT1R, este pode ativar o fator de transcrição NF- κ B, que estará envolvido na transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-6, IL-1 β , IL-8, MCP-1, entre outras (Banu *et al.*, 2020). Além disso, Ang II pode diretamente ativar macrófagos, que estarão envolvidos com a secreção das citocinas pró-inflamatórias. A partir disso é importante notar que no contexto da COVID-19, o SARS-CoV-2 utiliza receptores ECA II para infectar células do parênquima pulmonar. Dessa forma, ECA II é levada à exaustão pelo vírus resultando em acúmulo de Ang II livre, o que pode resultar em ligação à AT1R e subsequente ativação da inflamação tecidual (Nor Rashid *et al.*, 2024; Scialo *et al.*, 2020) (figura 3). O acúmulo desenfreado de fatores pró-inflamatórios pode conduzir clinicamente o paciente ao quadro de COVID-19 grave a partir da formação da tempestade de citocinas e falência de múltiplos órgãos (Huang *et al.*, 2020; Mehta *et al.*, 2020) (figura 3).

Figura 4-Mecanismo entre SRA e inflamação.



Legenda: : Inicialmente o SARS-CoV-2 se liga aos receptores ACE2/TMPRSS2 que gerará a ativação do receptor tipo I de angiotensina II (AT1R) e consequentemente o fator de transcrição NF- κ B que ativará a transcrição de citocinas pró-inflamatórias que estarão envolvidas com a progressão para SRAG.

Fonte: Adaptado de Banu *et al.* (2020, tradução própria).

O SRA desempenha um importante papel na regulação cardiovascular e no equilíbrio hemodinâmico, tendo o angiotensinogênio como um componente essencial para a geração de moléculas chave do sistema. No contexto da infecção por SARS-CoV-2, a ECA II, juntamente com o co-receptor TMPRSS2, utilizados pelo patógeno,

destaca a importância do angiotensinogênio e suas vias associadas. A compreensão do SRA e sua relação com a fisiopatologia da COVID-19 pode elucidar novos caminhos para abordagens terapêuticas com vista a mitigar processos inflamatórios e ajudar a modular a resposta imune ao vírus.

2.4.4 Via da Leptina

A leptina (LEP) é um peptídeo hormonal que primariamente é sintetizada por adipócitos da gordura branca (Chan *et al.*, 2002; McDougald *et al.*, 1995). Além desse tecido, a LEP pode ser produzida também no estômago, placenta e músculo esquelético, mas pode ser encontrada também em várias regiões do cérebro, como hipotálamo, córtex cerebral e cerebelo. Para alcançar essas regiões, a LEP precisa ultrapassar a Barreira Hematoencefálica (BHE) (Di Spiezio *et al.*, 2018). O seu reconhecimento envolve ligação ao Receptor de Leptina (LEPR), ou Receptor de Obesidade (OBR), que pertence à família gp130 de receptores de citocina (NCBI, 2024). LEPR pode ser expressa em vários tecidos, como hipotálamo, tecido adiposo, coração, placenta, pulmão e fígado; e possui seis isoformas: LEPR-LEPRa, LEPRb, LEPRc, LEPRd, LEPR e, e LEPRf (Chua *et al.*, 1997; Darvishzadeh *et al.*, 1996). O LEPRb é o receptor mais longo dentre os citados e é essencial para a transdução de sinal dependente de LEP, a partir de sua ativação, múltiplas vias de sinalização podem ser estimuladas (Chen *et al.*, 1996; Fong *et al.*, 1998). A LEPR e é uma isoforma secretória e controla os níveis de leptina circulantes (Huang; Wang; Li, 2001).

O impedimento do transporte de LEP ao cérebro, bem como sua tolerância ou resistência, têm sido associados à obesidade. Além disso, o não reconhecimento de LEP por LEPR têm sido associado também a essa patologia, e à infertilidade (Chehab; Lim; Lu, 1996; De Luca *et al.*, 2005). É importante salientar que LEP-LEPR regula alguns sistemas do nosso organismo, como: reprodução, homeostase óssea, proliferação celular e sinalização imune. Estudos têm mostrado também que LEP também funciona como uma citocina pró-inflamatória com importante papel na resposta imune inata e adaptativa (Lam; Lu, 2007). Além disso, níveis elevados de LEP no soro têm sido associado a condições inflamatórias graves (Giannini *et al.*, 1999; Yalcindag *et al.*, 2007).

A sinalização LEP-LEPR ativa uma complexa variedade de vias, como Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT), Rat Sarcoma/Rapidly Accelerated Fibrosarcoma/Mitogen-Activated Protein Kinase (RAS/RAF/MAPK) e Insulin Receptor Substrate/Phosphoinositide 3-kinase (IRS/PI-3K) (Nanjappa *et al.*, 2011). Para ativação da cascata JAK-STAT, a sinalização LEP-LEPR fosforila Janus Kinase 2 (JAK2), que consequentemente ativa STAT, tornando-a um dímero. Após isso, STAT se transloca para o

núcleo onde vai estimular transcrição de Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3), Suppressor of Cytokine Signaling 7 (SOCS7) e Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 1 (PTPN1) (Baumann *et al.*, 1996). SOCS3 e SOCS7 possuem atividades feedback negativas, em que a primeira pode atuar se ligando ao LEPR ou a JAK2, e a segunda se ligando a STAT fosforilada, inibindo assim a via de sinalização (Dunn *et al.*, 2005; Martens *et al.*, 2005). PTPN1 também realiza regulação negativa, porém atua principalmente se ligando a JAK2 e STAT3 (Lund *et al.*, 2005).

A via clássica RAS/RAF/MAPK se inicia com a ativação do Protein Tyrosina Phosphatase Non-Receptor Type 11 (PTPN11) através da interação proteína-proteína. PTPN11 pode atuar regulando tanto positivamente como negativamente a via de sinalização de LEP, ativando MAPK1/3 por meio da proteína Growth Factor Receptor Bound Protein 2 (GRB2) (Carpenter *et al.*, 1998; Li; Friedman, 1999). GRB2 induz outra cascata de ativação que envolve participação de Son Of Sevenless 1 (SOS1), Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog (HRAS) e RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase (RAF1), que vão ativar MAPK1 por fosforilação, através da ativação do complexo MAP2K1/2. Esse processo induz ativação do fator de transcrição cAMP Response Element-Binding Protein 1 (CREB1), que estará envolvido com a transcrição de genes associados a proliferação; ciclo, motilidade e metabolismo (Nanjappa *et al.*, 2011).

O funcionamento da via RAS/RAF/MAPK durante a COVID-19 ainda é pouco documentada, no entanto, estudos sugerem que a proteína Spike do SARS-CoV-2 pode estar envolvida na ativação de MAPK, através do receptor AT-1 e dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 (Patra *et al.*, 2020). Estes, por sua vez, induzem produção de altos níveis de IL-6 e TNF- α que vão causar danos em células epiteliais pulmonares, acarretando em diminuição da ventilação e consequente SRAG (Goel *et al.*, 2021). Além disso, H-RAS, C-RAF, MAPK1, MAPK2 e ERK estiveram positivamente regulados em pacientes COVID-19 sugerindo possível relação com quadros inflamatórios (Cusato *et al.*, 2023). Ainda, RAF/MEK/ERK pode induzir ativação de Hypoxia-Inducible Factor (HIF), o qual está associado ao quadro de hipóxia (Cusato *et al.*, 2023). Devido a possível interação entre a via e o desenvolvimento de SRAG em pacientes COVID-19, Ghasemnejad-Berenji *et al.* (2021) sugeriram que o eixo RAF/MEK/ERK pode fazer parte de uma importante estratégia terapêutica.

A via IRS/PI-3K também é ativada e regulada a partir da interação LEP-LEPR, que por meio de interações proteicas, ativa a proteína adaptadora Src Homology 2-B domain-containing protein 2 (SHB2), que irá recrutar receptores de insulina 1 e 2 (IRS1 e IRS2), que serão fosforilados por JAK2 (Duan; Li; Rui, 2004). O complexo SHB2/IRS/JAK2 interage com o

domínio p85 do PI-3K que estará envolvido com a ativação da Akt, uma família importante de quinases, e ativação de mammalian Target of Rapamycin (mTOR) (Lam *et al.*, 2007). Akt posteriormente ativa I κ B Kinase family protein (IKKs), que ativará NF- κ B, fator de transcrição associado à expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, MCP-1, GM-CSF, IFN- γ) regulação de estresse (COX-2, iNOS etc) e proliferação celular (Bcl-2, cIAPs etc), e resposta antiviral (IFN- α , IFN- β etc) (Lam *et al.*, 2007). Já pela via mTOR, haverá envolvimento da regulação da polarização de linfócitos TCD4⁺ nos seus variados subtipos e respostas inflamatórias associadas, bem como, formação de posteriores Tregs (Abu-Eid *et al.*, 2014).

Em relação à COVID-19, a via PI-3K/Akt pode desempenhar um papel crucial na regulação da resposta imune mediada por linfócitos T (Abu-Eid; Ward, 2021). Tem sido observado que a desregulação de células T, bem como a alta expressão de Programmed Cell Death-1 (PD-1), oriundos da ativação por PI-3K/Akt pode conduzir à tempestade de citocinas e consequentemente desfechos graves da doença (Diao *et al.*, 2020). Ainda, mutações presentes em componentes da via podem estar associadas ao mal funcionamento de células imunes e sua indução de morte (Angulo *et al.*, 2013). Estudos também têm recomendado utilização de inibidores da via PI-3K/Akt a fim de manter um funcionamento eficaz de linfócitos T CD8 por mais tempo até o alcance da exaustão celular, bem como contribuir para diminuição da carga viral (Abu-Eid *et al.*, 2015; Abu-Eid *et al.*, 2017). Mutações na via também podem estar envolvidas com a hiperativação de mTOR, o que pode estar associado à deficiências de linfócitos naive e de mecanismos de memória imunológica (Lucas *et al.*, 2015).

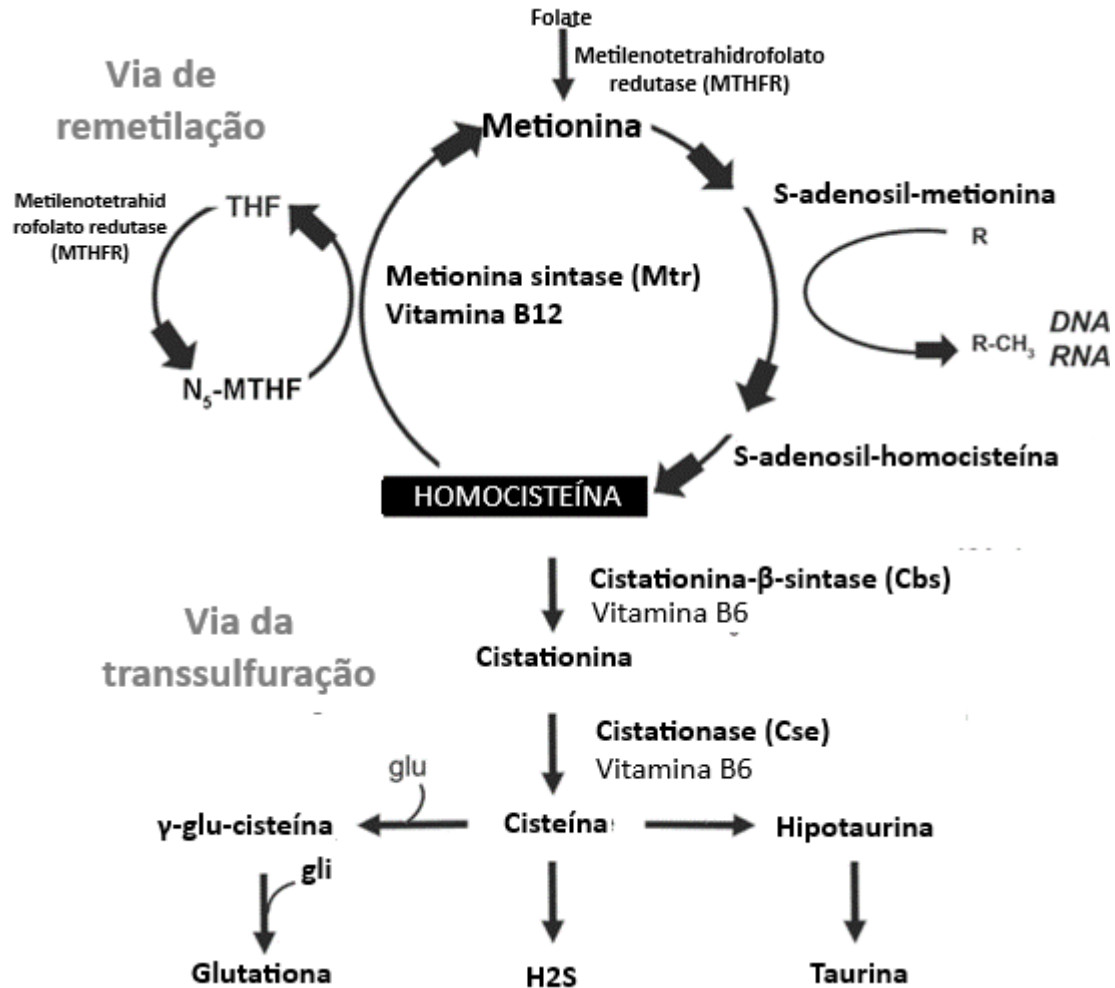
Diante dos mecanismos descritos, é fato que a sinalização mediada por LEP-LEPR desempenha um papel crucial não apenas na regulação do metabolismo e da homeostase corporal, mas também em respostas inflamatórias (Giannini *et al.*, 1999; Yalcindag *et al.*, 2007). As múltiplas vias de ativação, como JAK-STAT, RAS/RAF/MAPK e IRS/PI-3K têm relevância significativa em diversos contextos patológicos, incluindo a obesidade, infertilidade e doenças inflamatórias (Chehab; Lim; Lu, 1996; De Luca *et al.*, 2005; Giannini *et al.*, 1999; Yalcindag *et al.*, 2007). Em particular, a associação dessas vias com a COVID-19 sugere que a interação entre leptina e suas vias de sinalização pode contribuir para a gravidade da doença, reforçando o potencial dessas vias como alvos terapêuticos promissores. Estudos futuros são necessários para elucidar ainda mais essas conexões para criação de novas abordagens terapêuticas no tratamento de doenças virais, especialmente COVID-19.

2.4.5 Via do Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)

O metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) é uma enzima que desempenha importante papel no metabolismo do folato e no ciclo de metilação bioquímica do DNA, proteínas e lipídios (Goyette *et al.*, 1998). O ciclo do folato se inicia com a metabolização do ácido fólico (forma sintética) ou folato (forma natural), que é convertido em suas formas biologicamente ativas: tetrahidrofolato (THF), 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-CH₂-THF), 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) e 10-formiltetrahidrofolato (Liew; Gupta, 2014). Inicialmente o THF é convertido em 5,10-CH₂-THF pela enzima serina hidroximetiltransferase (SHMT) através da transferência de um grupo hidroximetila deste para o THF (Schirch; Peterson, 1980; Shane, 1989). Após essa etapa, a enzima MTHFR realiza a conversão, usando NADPH como cofator, do 5,10-CH₂-THF em 5-MTHF, a principal forma circulante de folato no corpo (Schirch; Peterson, 1980; Shane, 1989). A função do 5-MTHF é realizar doação de grupos metil, especialmente no ciclo da metionina. Portanto, nesta etapa, a MTHFR desempenha papel fundamental na disponibilização de folato na forma 5-MTHF, que é utilizado para remetilação da homocisteína em metionina, etapa crucial no ciclo de metilação (Heil *et al.*, 2001).

O 5-MTHF gerado pela MTHFR é entregue ao ciclo de metilação em que fará a doação de um grupo metil à homocisteína, transformando-a em metionina. Essa reação é catalisada pela enzima metionina sintase, que também depende da vitamina B12 (cobalamina) como cofator (Heil *et al.*, 2001). A metionina resultante pode, então, ser ativada pela metionina adenosiltransferase, formando a S-adenosilmetionina (SAM), que é o principal doador de grupos metil em diversas reações, incluindo metilação de DNA, RNA proteínas e lipídios (Heil *et al.*, 2001). Após a doação do grupo metil, o SAM é convertido em S-adenosilhomocisteína (SAH), que é hidrolisado para regenerar homocisteína, fechando o ciclo. Assim, a homocisteína pode ser remetilada em metionina via ciclo de metilação, ou pode ser desviada para o ciclo da transulfuração, onde é convertida em cisteína, outro aminoácido essencial (Cui *et al.*, 2017; Heil *et al.*, 2001).

Figura 5-Metabolismo do folato/homocisteína simplificado evidenciando as vias de remetilização e transsulfuração



Legenda: observa-se de maneira simplificada as vias de remetilização e transsulfuração, em que as principais enzimas e produtos gerados são evidenciados. Na via de remetilização, o folato é convertido inicialmente em 5-MTHF (folato circulante) com auxílio das enzimas SHMT e MTHFR. O 5-MTHF doar um metil à homocisteína convertendo-a em metionina com o auxílio da enzima metionina sintase + vitamina B12. Assim, a metionina é ativada em SAM, que realizará metilação de DNA e RNA, sendo os seus excedentes hidrolisados e convertidos novamente em homocisteína.

Fonte: Adaptado de Cui *et al.* (2017, tradução própria)

Há diversas patologias associadas ao mal funcionamento da MTHFR, dentre elas, a hiperhomocisteinemia, que é resultado de acúmulo de homocisteína no sangue, não convertida em metionina (Heil *et al.*, 2001). Níveis elevados de homocisteína estão associados ao risco aumentado de doenças cardiovasculares; estresse oxidativo e aceleração do processo aterosclerótico; acidente vascular cerebral (AVC) e tromboembolismo, já que nesta tem sido evidenciados efeitos na reatividade plaquetária (Durand *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2008; Graham *et al.*, 1997; Jakubowski, 2006; Ramachandran, 2006). Outras patologias incluem disfunções do tubo neural, em que polimorfismos genéticos no gene correspondente estão associados com o surgimento da espinha bífida e anencefalia, devido à diminuição da disponibilidade de 5-

MTHF, que possui papel crucial para o desenvolvimento adequado do feto (Heil *et al.*, 2001; Lacasaña *et al.*, 2012; Shaw *et al.*, 2009). Surgimento de cânceres, como câncer de cólon, mama e leucemia, se torna importante destacar, pois se origina a partir de alterações no ciclo do folato devido à desregulação da metilação do DNA e síntese de nucleotídeos (Choi; Mason, 2000; De Jonge *et al.*, 2009; Novakovic *et al.*, 2006).

Em relação às doenças infecciosas virais, estudos prévios têm revelado altas concentrações de homocisteína em diferentes tipos de infecções virais como HIV, HCV e HPV, o que pode revelar processos disfuncionais na via (Abike *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2019; Roblin; Pofelskij; Zarskij, 2007). Deminice *et al.* (2013) demonstrou que disfunções no metabolismo do folato podem ser comuns em pessoas convivendo com HIV e que isso pode não ser relacionado à deficiência nutricional. Homocisteinemia está normalmente associada ao aumento de estresse oxidativo e isso pode colaborar com a progressão do HIV através do aumento de carga viral, disfunção imune e carcinogênese (Stehbens, 2004). Além disso, Masiá *et al.* (2016), refere-se ao estresse oxidativo como preditor de mortalidade para indivíduos vivendo com HIV.

Na COVID-19, têm sido descrito que altos níveis plasmáticos de homocisteína podem aumentar significativamente a incidência de injúria vascular em diferentes vasos sanguíneos bem como hipertensão (Durand *et al.*, 2001; Graham *et al.*, 1997). É importante pontuar que os altos níveis sorológicos de homocisteína podem ser oriundos também de mutações presentes na enzima MTHFR, tornando o processo de metilação da homocisteína dificultados (Karst; Hollenhorst; Achenbach, 2020; Rooney, 2020). Além disso, os elevados níveis de homocisteína podem ter valor preditivo para a doença leve e grave, o que pode por em questão os mecanismos subjacentes de interação entre o SARS-CoV-2 e o ciclo do folato em região *upstream* à etapa de metilação de homocisteína (Keskin *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2020). É importante salientar que nesse contexto, o estresse oxidativo também pode ser ativado pela hiperhomocisteinemia, através da ativação de NF- κ B em neutrófilos e macrófagos, e já tem sido descrito estar associado ao aumento de carga viral em infecção por SARS-CoV-1 (Morales-Borges; Gonzalez, 2020; Smits *et al.*, 2010).

O MTHFR possui papel crucial no ciclo do folato e consequentemente para saúde humana, com influência que vai desde a regulação do ciclo de metilação à proteção contra o estresse oxidativo. Disfunções na atividade da MTHFR podem conduzir a diversas patologias graves, como doenças cardiovasculares, disfunções do tubo neural e aumento da predisposição ao desenvolvimento de câncer. Além disso, altos níveis de homocisteína e seus efeitos deletérios em cascatas inflamatórias destaca a relevância de estudos futuros sobre essa via metabólica em

infecções virais, especialmente por SARS-CoV-2, em que seus níveis têm sido correlacionados à progressão da doença e complicações vasculares. Compreender o metabolismo do folato nesse contexto também pode elucidar novas perspectivas terapêuticas a fim de mitigar o impacto da COVID-19.

2.4.6 Patogênese das co-infecções

Durante a pandemia de COVID-19, muitos estudos relacionados às co-infecções associadas ao SARS-CoV-2 foram e estão sendo realizados com o intuito de entender a relação entre os agentes etiológicos envolvidos e suas possíveis associações com os diferentes desfechos da doença (Cuadrado-Payán *et al.*, 2020; Farias *et al.*, 2024; Han; Gatheral; Williams, 2020; Huang *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020). Huang *et al.* (2020) e Zhou *et al.* (2020) têm identificado que 8% dos pacientes chineses com COVID-19 foram também diagnosticados com outros patógenos, e que correspondiam ao grupo de pacientes graves e óbitos. Além disso, os piores desfechos estiveram relacionados a co-infecção no estágio posterior da doença. Ainda, é importante salientar que um alto percentual de co-infecções bacterianas tem sido documentado em 27,7% dos pacientes franceses após terem sido entubados devido a insuficiência respiratória causada pela COVID-19 (Kreitmann *et al.*, 2020). Três espécies bacterianas foram responsáveis por mais de 90% dos casos de co-infecção, sendo elas *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* (Kreitmann *et al.*, 2020).

Outras infecções virais também têm sido relatadas como conjuntamente atuantes durante a COVID-19, como influenza A e B, varicela-zóster (VZV), Épstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV), herpes simplex (HSV), herpes humano 6 (HHV 6) e hepatite B (HBV) (Alqahtani; Buti, 2020; Le Balc'h *et al.*, 2020). Nesse contexto, o SARS-CoV-2 tem sido associado a recidivas sintomáticas das respectivas doenças virais. No estudo de Cuadrado-Payán *et al.*, (2020) foram evidenciados casos graves da doença correspondente a co-infecção por SARS-CoV-2 e influenzas A e B, em que três pacientes exibiram deterioração respiratória, e necessitaram de intubação traqueal e ventilação mecânica. É importante salientar que, a cepa viral e a imunidade rebanho são aspectos cruciais nesse contexto, uma vez que este estudo tem avaliado pacientes em uma época em que a taxa de mortalidade por COVID-19 era mais elevada devido a baixa taxa de imunização (Garazzino *et al.*, 2021; Kishore *et al.*, 2020).

A literatura tem evidenciado também a alta prevalência da co-infecção HIV/SARS-CoV-2 por meio de relatos de casos, artigos originais e revisões. De maneira geral, o indivíduo co-infectado possui maiores chances de exibir o desfecho grave e mortalidade pela doença quando

possui linfopenia grave ($CD4 < 200$ células/mL), idade elevada (>50 anos) e alguma comorbidade associada (Boulle *et al.*, 2020; Braunstein *et al.*, 2021; Squillace *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020). Por outro lado, indivíduos que possuíam $CD4 > 500$ células/mL tenderam a exibir menores frequências de tempestades de citocinas, o que põe em evidência também o papel das comorbidades e fatores comportamentais nesse contexto (Hadi *et al.*, 2020; Squillace *et al.*, 2021).

Sharov, 2021 menciona o efeito sinérgico imunossupressor que o HIV e o SARS-CoV-2 possuem nos casos graves. Em estudo realizado, destaca-se a presença das citocinas IL-10 e TGF- β como potenciais marcadores prognósticos de sinergia (Sharov, 2021). Além disso, tem sido mostrado que o uso do TARV possui papel importante no impedimento do desenvolvimento de doença grave, já que os níveis linfocitários podem se manter elevados e atuantes. No entanto, tem sido evidenciado também que o SARS-CoV-2 esteve associado à incapacidade de produção das citocinas IL-2, TNF- α e IFN- γ , que são importantes para a regulação da ativação dos linfócitos T, e à exaustão destes (Sharov, 2021). Ainda, o crescimento pronunciado das citocinas imunossupressoras IL-10 e TGF- β tem sido observado em pacientes co-infectados e isso pode estar relacionado também à resposta ineficaz por células T (Sharov, 2021). O descontrole da ativação dessas células, bem como sua exaustão e imunossupressão mediada por citocinas específicas têm sido relacionadas às complicações pulmonares (Madge *et al.*, 2020; Sharov, 2021).

Em relação à co-infecção SARS-CoV-2/*Leishmania*, Martins *et al.* (2022) discute a ineficácia da resposta via IFN- γ em imunossuprimidos, por *Leishmania infantum*, contra o SARS-CoV-2, e que isso pode ter relação com o agravamento dos pacientes co-infectados. Então uma eficiente resposta Th1 por neutrófilos, bem como produção de TNF- α por monócitos são importantes para o controle da infecção parasitária. Por outro lado, uma resposta Th2, com produção de IL-4 e IL-10, pode favorecer a replicação da *L. infantum* (Viana *et al.*, 2008). Colomba *et al.* (2023) descreve também um possível impacto negativo, causado pelo SARS-CoV-2, na imunocompetência de uma paciente previamente infectada por *Leishmania infantum* em um relato de caso. Wiech *et al.* (2022), bem como outros pesquisadores, têm também discutido o efeito remodelador que o SARS-CoV-2 pode induzir em células TCD4, TCD8 e Tregs; causando exaustão e desregulação, e isso pode estar relacionado a recidivas parasitárias durante a co-infecção com a *L. infantum* (Colomba *et al.*, 2020; Favi *et al.*, 2022; Kantzanou *et al.*, 2022; Tolomeo *et al.*, 2020). Além disso, a própria remodelação das células T necessária para lidar com o vírus pode permitir que o parasita escape da vigilância imunológica levando à reativação da doença (Colomba *et al.*, 2022).

A literatura também relata um caso de co-infecção entre SARS-CoV-2, HIV e *L. infantum*, em que a paciente desenvolveu COVID-19 grave estando previamente co-infectada, e não tratada, por HIV/*L. infantum* (Farias *et al.*, 2024). Além de sinais e sintomas característicos de COVID-19 grave, como febre, tosse, dispneia, saturação de oxigênio $\leq 93\%$ e comprometimento pulmonar $>50\%$; variáveis do hemograma também exibiram alterações, como linfopenia, neutropenia e leucopenia (Farias *et al.*, 2024). Além disso, os achados laboratoriais revelaram níveis elevados de dímero D, AST, ALT, lactato desidrogenase (LDH), ferritina e proteína C reativa (PCR) (Farias *et al.*, 2024). A linfopenia, leucopenia e neutropenia evidenciadas se configuram como resultado da infecção tripla SARS-CoV-2/HIV/*L. infantum* (Barbera *et al.*, 2021; Goto; Prianti, 2009; Schriefer; Wilson; Carvalho, 2008). É importante salientar também que existem cepas do HIV relacionadas à lesões pulmonares e que isso pode colaborar para o agravamento da COVID-19, porém nesse caso específico merece maiores investigações (Dujardin *et al.*, 2021). O HIV e a *L. infantum* podem se interagir gerando benefício mútuo, conforme descrito por Okwor; Uzonna, 2013. Em detalhe, o HIV pode prejudicar a resposta celular, o que pode resultar em reativação parasitária. Além disso, o HIV induz produção de fatores pró-inflamatórios por macrófagos, como prostaglandina E2, ciclooxigenase 2 e TGF- β que estarão também envolvidos com a indução da replicação parasitária nestas células. É importante salientar, que o TGF- β é uma citocina imunossupressora que pode nesse contexto enfraquecer a resposta ao SARS-CoV-2 resultando em agravamento da doença. Ainda no balanço HIV/*L. infantum*, a expressão de lipofosfoglicano (LPG) na superfície da *Leishmania* pode induzir expressão do gene LTR, do HIV, em células T. Além disso, a infecção por *Leishmania*, por induzir produção de TNF- α , IL-1 e IL-6; podem facilitar a replicação do HIV e induzir elevados níveis de PCR (Boras *et al.*, 2014; Casado *et al.*, 2015; Guedes *et al.*, 2018; Okwor; Uzonna, 2013; Shah *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2020).

Em relação aos achados laboratoriais elevados, o dímero D tem sido associado na literature à mortalidade por COVID-19, aos altos níveis de RNA do HIV circulante e à infecção por *L. infantum* (Sakkas *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2020). Os elevados níveis de ferritina têm sido descrito como potencial indutor de processos pró-inflamatórios e geração de tempestade de citocinas, além de estar associada à COVID-19 moderada/grave (Abbaspour; Hurrell; Kelishadi, 2014; Carubbi *et al.*, 2021; Horrillo *et al.*, 2019; Lino *et al.*, 2021; Riera *et al.*, 1994). A LDH tem sido associada a danos teciduais, incluindo distúrbios pulmonares, e também à gravidade por COVID-19, se tornando possível biomarcador para eventos pró-inflamatórios da doença (Han *et al.*, 2020; Horrillo *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020). Além disso, tem sido encontrada elevada em pacientes co-infectados HIV/*L. infantum* (Farinacci *et al.*, 2021; Mouhoub *et al.*, 2021). Por

fim, AST e ALT têm sido apontados como fortes preditores de COVID-19 grave e têm sido comumente observados em infecção por *L. infantum*, uma vez que o parasita possui forte tropismo por células hepáticas (Tian; Ye, 2020). É importante salientar aqui, que o SARS-CoV-2 pode estar também relacionado aos altos níveis de AST e ALT por infectar colangiócitos, pois estes expressam ACE2 e são suscetíveis à infecção (Tian; Ye, 2020; Wang *et al.*, 2020).

Em um cenário onde múltiplas infecções envolvendo diferentes agentes etiológicos podem ocorrer, é importante que haja investigações mais robustas em relação à patogênese dos diferentes perfis de co- infecção para que novas abordagens de manejo sejam elucidadas com o intuito de garantir melhores prognósticos. Além disso, é importante salientar que novas abordagens diagnósticas sejam levadas em consideração principalmente em contexto de doenças endêmicas.

2.4.7 Fatores genéticos humanos e a gravidade da COVID-19

Sabe-se que fatores genéticos do hospedeiro, além do meio ambiente e fatores virais, são potenciais influenciadores no desfecho clínico de doenças infecciosas. A atuação de SNPs têm sido descrita em diversas vias metabólicas possibilitando diferentes níveis de regulação gênica, bem como impactos estruturais funcionais (Lee; Shatkay, 2007). Esses mecanismos podem ocorrer devido a presença dos SNPs em regiões de regulação de expressão gênica, como regiões *enhancers*, silenciadoras ou de *splicing*, bem como regiões do exoma que são importantes para a formação estrutural da proteína (Lee; Shatkay, 2007).

A via do inflamassoma é uma das vias metabólicas que possuem SNPs com potencial influência no desfecho grave em COVID-19. O haplótipo ATGAG (*NLRP3*) já têm sido associado à doença grave e ao uso de ventilação mecânica. Além disso, Rodrigues *et al.* (2020) mostraram que a própria ativação do NLRP3 é presente em indivíduos com COVID-19 e que o nível dessa ativação pode influenciar negativamente o desfecho da doença através da hiperreativação imune e ativação de tempestade de citocinas. Nesse caso, o uso de inibidores da via em questão pode representar uma importante alternativa terapêutica contra a COVID-19 grave. Além disso, outros SNPs em NLRP3 já têm sido alvo de estudos em outras doenças infecciosas, como a variante do éxon 4, posição 1753 rs3806268, que já tem sido associada a níveis elevados de IL-6 em indivíduos vivendo com HIV (PLWH), o que pode representar um fator de risco para quadros clínicos inflamatórios graves (Okendo; Okanda, 2022). Já a variante intrônica NLRP3 rs4612666 - T/T já foi associada ao risco aumentado de desenvolvimento de tuberculose extrapulmonar (EP-TB) em indivíduos brasileiros (De Sá *et al.*, 2022). Outra

variante, a *NLRP3* rs3806265-C/C já foi associada ao maior risco de aspergilose e a psoríase em indivíduos chineses (Yu *et al.*, 2018; Zhong *et al.*, 2022). É importante salientar que juntamente com o gene *NLRP3*, o *CARD8* se torna um importante alvo para análises de interação e associação em doenças infecciosas. Segundo Ito; Hara; Kubota (2014), o *CARD8* regula negativamente a expressão e montagem do *NLRP3* e que mais estudos são necessários para investigar o papel dos dois genes e seus respectivos *loci* polimórficos em doenças infecciosas e outras patologias. Além disso, SNPs localizados no *CARD8* foram associados a elevados níveis de IL-6 em indivíduos com tuberculose (TB) comparados com aqueles sem TB. Ainda, SNPs em *CARD8* foram associados a níveis elevados de IL-1 β em indivíduos com tuberculose extrapulmonar (EP-TB) e a níveis elevados de IL-33 em indivíduos TB-HIV (De Sá *et al.*, 2022). É importante destacar que SNPs presentes em genes de citocinas associadas a via do inflamassoma, como IL-1 β podem ter papel crucial na expressão da proteína e interações intermoleculares. O genótipo G/A-rs1143634 (*IL-1B*) já tem sido associado também ao risco de TB entre PLWH no Brasil (De Sá *et al.*, 2022). O mesmo SNP também foi associado a elevados níveis de IL-33 em indivíduos TB com ou sem infecção por HIV, o que denota a importância da influência que os SNPs podem possuir nas interações moleculares (De Sá *et al.*, 2022).

Outros elementos da via do inflamassoma possuem SNPs que podem desempenhar papéis cruciais em outras doenças infecciosas, como os SNPs rs12150220 A>T (pLeu155His - *NLRP1*), rs455060 (*NLRC4*) e o rs2276405 (*AIM2*). Leal *et al.* (2022) encontraram associação entre o genótipo T/T-rs12150220 e o desfecho grave da COVID-19 em indivíduos do Brasil. Ainda, foi encontrada associações também com internação em UTI e insuficiência respiratória. Importante salientar que dentro do modelo de análise, diabetes e hipertensão foram incluídos, o que sustenta a importância da associação mútua genética, desfecho e comorbidades. Neste estudo, rs12150220 foi associado ao ganho de função do *NLRP1*, ou seja, intensificando sua ativação durante a infecção por SARS-CoV-2 e consequentemente tornando a liberação de IL-1 β mais intensa conduzindo a quadros inflamatórios graves (Leal *et al.*, 2022). O SNP rs12150220 está localizado entre a região amino-terminal PYD e o domínio central NACHT que é especificamente a região alvo de ligação de proteases virais, como já antes estudadas, as proteases 3CL e NSP5 (Planès *et al.*, 2022). Ainda nesse contexto, Vasseur *et al.* (2012) destacaram a rápida evolução na detecção de epidemias virais na Europa, já que a frequência de rs12150220 alcança aproximadamente 50% no continente.

O rs455060 ainda é pouco estudado em relação às doenças virais, no entanto, possui importante papel de reconhecimento em regiões mucosas do pulmão, estômago e intestino

(Bauer; Rauch, 2020). Gresnigt *et al.* (2018) têm mostrado que rs455060 participa de um perfil haplotípico (ACTT – rs212704, rs455060, rs7562653 e rs385076) que pode possuir um papel crucial de suscetibilidade à colonização por *A. fumigatus*. Além disso, o SNP rs212704 - G/G têm sido associado à colonização por *A. fumigatus* em indivíduos com fibrose cística (Iannitti *et al.*, 2016). SNPs do receptor NLRC4 necessitam de estudos mais aprofundados e robustos a fim de obter melhores informações a cerca dos papéis regulatórios na via, potenciais efeitos na expressão gênica e conformação proteica.

O SNP rs699 (M268T) do gene *AGT* (cromossomo 1q42.2) é do tipo *missense*, está localizado no éxon 2 e codifica uma variante treonina, a qual já tem sido descrita como associada a níveis elevados de angiotensina (Brand *et al.*, 2002; Corvol; Jeunemaitre, 1997; Sethi; Nordestgaard; Tybjaerg-Hansen, 2003). Além disso, a variante já tem sido associada a níveis elevados de angiotensinogênio plasmáticos e também à hipertensão (Jeunemaitre *et al.*, 1992; Sethi; Nordestgaard; Tybjaerg-Hansen, 2003; Takeuchi *et al.*, 2012). Em relação a COVID-19, o alelo C e o genótipo TC têm sido associados ao risco aumentado de infecção por SARS-CoV-2 em indivíduos iranianos (Kouhpayeh *et al.*, 2021). Em outro estudo, conduzido por Cafiero *et al.* (2021), rs699 foi encontrada expressa em maior frequência em indivíduos COVID-19 sintomáticos da Itália. Além disso, no mesmo estudo, foi encontrada maior frequência do alelo T na população de estudo comparado à frequência da população global obtida pelo Projeto 1000 Genome e GnomAD (Cafiero *et al.*, 2021). Já o genótipo TT, em outros trabalhos, tem sido associado à hipertensão arterial, pressão sistólica e doença arterial coronariana (Giri *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2016). Evidências experimentais, sugerem que variantes do gene *AGT* podem estar correlacionados à hipertensão, insuficiência cardíaca e fatores de risco cardiovascular (Xu; Rong; Zhang, 2021).

O SNP rs1137101 do gene *LEPR* está localizado no éxon 6 e sua alteração envolve a substituição de glutamina por arginina na posição 223 (Gln223Arg) (Consortium *et al.*, 2012; Peelman *et al.*, 2004; Tartaglia *et al.*, 1995). O SNP especificamente impacta o domínio CRH1 do receptor, que possui função importante na ligação à LEP (Peelman *et al.*, 2004). A análise de possíveis relações entre rs1137101 e a COVID-19 ainda se encontra elusivo na literatura, no entanto, o estudo conduzido por Mohamed *et al.* (2023) avaliou a relação entre rs7799039 do gene *LEP*, ligante do *LEPR*, e encontrou associação do genótipo AA com o risco de COVID-19 grave e seus prognósticos. Dentro dessa associação, foi observado que obesidade pré-mórbida foi incluído como fator de risco na análise. O SNP rs1137101 (*LEPR*), bem como níveis aumentados de LEP no plasma, também têm sido associados ao risco de obesidade e isso pode ser relevante em estudos envolvendo desfechos clínicos da COVID-19 (Ali *et al.*, 2009;

Daghestani *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2006; Yiannakouris *et al.*, 2001). Ainda, Supti *et al.* (2024) realizaram uma metanálise em que observaram associação entre rs1137101 e obesidade.

Há poucos estudos que realizaram análises de associação entre SNPs do gene *LEPR* e doenças infecciosas. Li *et al.* (2022) verificaram possíveis associações entre as variantes rs1137100, rs1137101 e rs1805096 e a tuberculose pulmonar (PTB) em população chinesa, porém não encontraram significância estatística. Por outro lado, o haplótipo CAG (rs11761556-rs12706832-rs2167270) do gene *LEP* foi significativamente associada à doença. Ainda no mesmo estudo, a variante rs11761556 foi significativamente associada à febre durante infecção pulmonar em PTB. É importante salientar também que níveis reduzidos de *LEP* durante PTB têm sido associados a uma resposta imune ineficaz contra PTB, o que pode trazer piores desfechos nesse contexto (Maciver *et al.*, 2008). Em relação à doença viral, o estudo conduzido por Tang *et al.* (2020) avaliou a possível relação entre rs1137100 e rs1137101, bem como o haplótipo correspondente, e o desenvolvimento de doenças hepáticas causadas por HBV em uma população chinesa, porém não foi encontrada significância estatística.

A enzima MTHFR é uma das moléculas mais importantes da via da metionina, pois está envolvida em processos fundamentais como reparo do DNA, funções neurotransmissoras e transporte de membrana (Yafei *et al.*, 2012). A variante *missense* C677T (cromossomo 1), cuja troca de aminoácido se dá de uma alanina para uma valina na posição 222 (p.Ala222Val – rs1801133), induz baixo funcionamento da enzima devido a ocorrência de um aumento (~50%) da taxa de dissociação do seu cofator FAD (Liew; Gupta, 2015). Para isso, estudos sugerem a utilização de vitamina B2 (riboflavina) e vitamina B6 como cofatores para reposição da atividade enzimática e consequente homeostase da via (Hustad; Ueland, 2013; Kim *et al.*, 2018; Lakshmi; Ramalakshmi, 2018; McKully, 2007; McNulty *et al.*, 2006; Selhub, 1999). A ausência ou diminuição da atividade enzimática da MTHFR induz o quadro de hiperhomocisteinemia, que se caracteriza pelos altos níveis de homocisteína no soro ultrapassando 16 $\mu\text{mol/L}$ (Ponti *et al.*, 2021).

A frequência mundial da variante homozigótica C677T varia significativamente entre as diferentes populações, sendo estimado em 1% ou menos na África a 20% nos Estados Unidos (Ponti *et al.*, 2021). Entre populações europeias, o alelo homozigoto foi encontrado em maior frequência entre italianos e em menor entre alemães (Adams *et al.*, 1996; Bowen *et al.*, 1998; Markus *et al.*, 1997). Ainda, uma alta prevalência da variante homozigota, em torno de 10-12%, foi descrita para Espanha, França e Hungria. Uma estimativa aproximada foi apontada para britânicos, em torno de 13%, e entre 4-6% para Finlândia e norte da Holanda. Nas Américas, a frequência homozigota variante foi mais elevada no México (32%), intermediário em Atlanta

(11% entre brancos) e mais baixa em Alberta (6%). Para pretos vivendo no Brasil, a frequência estimada foi baixa (em torno de 2%). Para brancos vivendo no Canadá, Brasil e Austrália, a taxa de homozigotidade variou de 10-14% (Arruda *et al.*, 1998; Dilley *et al.*, 1998; Stevenson; Schwartz; Adams, 1997).

Liew; Gupta (2015) têm descrito que indivíduos homozigotos variantes exibem maiores níveis de homocisteína no soro comparados a indivíduos selvagens. Heterozigotos, por sua vez, exibem valores moderados de homocisteína, que estão entre aqueles valores correspondentes aos indivíduos homozigotos variantes e selvagens. Elevados níveis de homocisteína pode conduzir a fatores de risco que podem impactar o desfecho clínico de diversas doenças, como insuficiência renal crônica, hipertensão arterial, insuficiência cardiovascular, hipotireoidismo e tumores malignos como o câncer de mama, ovário e pâncreas (Kim *et al.*, 2018). É importante salientar também que a hiperhomocisteinemia está frequentemente presente em indivíduos do sexo masculino e de idade avançada, que normalmente possuem níveis baixos de ácido fólico e vitamina B12, que culminam no mal funcionamento do metabolismo da metionina (Kim *et al.*, 2018).

No contexto da COVID-19, estudos têm descrito correlação positiva entre o genótipo variante TT e prognóstico grave, bem como mortalidade pela doença (Ponti *et al.*, 2021). Uma hipótese que precisa ser melhor investigada em estudos futuros é que o SARS-CoV-2 pode estar envolvido no mecanismo de metilação do cap 5' do seu RNA utilizando a enzima SAM sobrecarregando a via (Singh *et al.*, 2020). Yang *et al.* (2020) têm destacado a associação entre os altos níveis de homocisteína no soro e a progressão grave da COVID-19, além de sugerir que valores de homocisteína podem ser usados para prever o risco clínico de desfechos graves e achados tomográficos de tórax. Ainda, é importante mencionar a relevante interação entre os altos níveis de homocisteína e a regulação positiva de hormônios andrógenos, que consequentemente estimulam a expressão de ACE em indivíduos do sexo masculino e que podem vulnerabilizá-los à infecção por SARS-CoV-2 (Lott *et al.*, 2023).

O mal funcionamento da enzima MTHFR desencadeado pela presença da variante homozigota *missense* C677T pode gerar o quadro de hipercisteinemia, e esta pode ativar cascatas de reação pró-inflamatória, que culminará na ativação de NF-κB em neutrófilos e macrófagos conduzindo à liberação ampla de ROS (Moretti, 2019). Smits *et al.* (2010) têm demonstrado que a replicação do SARS-CoV-1 pode ser acelerada por ROS produzido a partir da ativação de NF-κB. Em relação ao SARS-CoV-2, esse mecanismo ainda permanece elusivo e mais estudos são necessários para sua elucidação.

Estudos têm alertado a necessidade de uma integração terapêutica preventiva utilizando ácido fólico e vitaminas do complexo B, que com a finalidade de tentar reduzir a prevalência e mortalidade por COVID-19 poderia ter um importante papel no contexto atual (Belcastro *et al.*, 2010; Ibrahimagic *et al.*, 2016; Pepe *et al.*, 1998; Rozen, 1997; Shi *et al.*, 2003). Além disso, é importante mencionar o relevante papel da suplementação da glutatona, tripeptídeo gerado pela via da transsulfuração, que têm sido associada a melhora de sintomas devido ao seu papel antioxidativo durante a doença viral (Horowitz; Freeman; Bruzzese, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a associação entre os SNPs rs3806268 (*NLRP3*), rs4925543 (*NLRP3*), rs12150220 (*NLRP1*), rs455060 (*NLRC4*), rs699 (*AGT*), rs1137101 (*LEPR*), e rs1801133 (*MTHFR*) e o desfecho grave/crítico em pacientes COVID-19 brasileiros.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar o perfil sociodemográfico, clínico e laboratorial de pacientes com diagnóstico confirmado de COVID-19 e casos suspeitos;
- 2) Determinar a frequência dos SNPs rs3806268 (*NLRP3*), rs4925543 (*NLRP3*), rs12150220 (*NLRP1*), rs455060 (*NLRC4*), rs699 (*AGT*), rs1137101 (*LEPR*), e rs1801133 (*MTHFR*) na coorte de pacientes com COVID-19 e suspeitos;
- 3) Avaliar a associação entre os SNPs rs3806268 (*NLRP3*), rs4925543 (*NLRP3*), rs12150220 (*NLRP1*), rs455060 (*NLRC4*), rs699 (*AGT*), rs1137101 (*LEPR*), e rs1801133 (*MTHFR*) e a gravidade da COVID-19;
- 4) Descrever o caso clínico de um paciente com coinfeção tripla por HIV, *Leishmania infantum* e SARS-CoV-2, destacando as implicações clínicas e laboratoriais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 RELATO DE CASO

Um relato de caso descritivo retrospectivo foi realizado a fim de caracterizar aspectos clínico-laboratoriais de uma paciente COVID-19 grave co-infectada com HIV/*L. infantum* que foi admitida nos hospitais Agamenon Magalhães, Alfa e das Clínicas, da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. Para isso, dados clínico-laboratoriais dos prontuários dos três hospitais foram coletados, planilhados e analisados.

4.2 COLETA DE DADOS, COMITÊ DE ÉTICA E DEFINIÇÃO CLÍNICA

Um estudo caso-controle foi conduzido para investigar a associação entre os SNPs rs3806268 (*NLRP3*), rs4925543 (*NLRP3*), rs12150220 (*NLRP1*), rs455060 (*NLRC4*), rs699 (*AGT*), rs1137101 (*LEPR*) e rs1801133 (*MTHFR*) e os desfechos leve/moderado e grave/crítico da COVID-19. A população do estudo consistiu em 100 indivíduos, abrangendo 34 indivíduos negativos para COVID-19, 33 com desfechos leve/moderado e 33 como grave/crítico.

Foram incluídos no estudo pacientes com 18 anos ou mais, com suspeita de COVID-19, abrangendo positivos e negativos, triados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e Hospital Mestre Vitalino. Todos os pacientes inscritos forneceram consentimento informado, e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFPE (número de aprovação 4.150.959, C.A.A.E 33597220.5.0000.5208). Detalhes clínicos e socioepidemiológicos como idade, sexo, cor/raça, comorbidades, sintomas, hemograma, diagnóstico por RT-PCR e achados laboratoriais (ferritina, PCR, AST, ALT e d-dímero); foram coletados de prontuários médicos e planilhados. O material coletado para diagnóstico do SARS-CoV-2 consistiu em aproximadamente 4 mL de sangue total, obtido dos pacientes durante a fase aguda da doença.

Os casos de COVID-19 foram classificados de acordo com as diretrizes da OMS, conforme descrito (OMS, 2021). Após avaliação clínica e laboratorial, 100 casos suspeitos e confirmados de COVID-19 foram estratificados, compreendendo 34 casos negativos para COVID-19, 33 casos graves/críticos e 33 casos leves/moderados.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA, QUANTIFICAÇÃO E PROCESSAMENTO DE DADOS

A extração de DNA genômico de sangue total foi realizada usando o kit PureLink Genomic DNA Mini (Invitrogen®), seguindo as instruções do fabricante. A quantificação do material genômico foi realizada usando o kit Qubit HS dsDNA (Thermo Fisher®), seguida de sequenciamento de nova geração (NGS) do exoma total (Mendelics®) e subsequente processamento de dados.

A filtragem e anotação dos arquivos VCF foram conduzidas usando os softwares VCFtools e wANNOVAR, respectivamente (<http://snpeff.sourceforge.net/index.html>). A seleção dos SNPs e a determinação do genótipo foram baseadas na Frequência do Alelo Variante (VAF). Além disso, os SNPs foram selecionados por terem sido investigados em outros estudos envolvendo outras doenças infecciosas virais, bem como por seus impactos funcionais em suas respectivas proteínas e vias metabólicas.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise descritiva, dados não paramétricos, como o teste de Kruskal-Wallis foi empregado para comparar três amostras, e o teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar duas amostras, ambos conduzidos usando o software Graphpad PRISM v.9.5. A análise de risco bruta (análise bivariada) foi realizada usando o software Jamovi 2.3.21, com o genótipo ancestral considerado como referência para análise. A análise ajustada (regressão logística multivariada) foi conduzida usando o software Jamovi 2.3.28, com ajustes de modelo baseados no Critério de Informação de Akaike (AIC) e no Critério de Informação Bayesiano (BIC). Para determinar a associação entre genótipos e desfechos clínicos da COVID-19, o teste exato de Fisher foi empregado, considerando a razão de chances (OR) encontrada. Valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO 1: COVID-19 GRAVE EM UMA PACIENTE CO-INFECTADA COM HIV/*LEISHMANIA INFANTUM*: UM RELATO DE CASO TRATADO COM SUCESSO. **Fator de**

Impacto: 3,4; **Qualis:** A3

BMC Infectious Diseases

Home About [Articles](#) Submission Guidelines Join The Board Collections

Submit manuscript 

Case Report | [Open access](#) | Published: 23 August 2024

Severe COVID-19 in HIV/*Leishmania infantum* coinfecting patient: a successfully managed case report

Pablo Cantalice Santos Farias , Gilberto Silva Nunes Bezerra, Patrícia Areias Feitosa Neves, Leandro Pimentel Cabral, Walter Lins Barbosa Júnior, Diego Lins Guedes, Amanda Tavares Xavier, Zulma Maria Medeiros, Virgínia Maria Barros Lorena, Paulo Sérgio Ramos Araújo, Valdir de Queiroz Balbino & Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

BMC Infectious Diseases **24**, Article number: 854 (2024) | [Cite this article](#)

Resumo

Introdução: A doença do coronavírus 2019 originou-se na China e rapidamente se espalhou pelo mundo, representando uma ameaça significativa à saúde pública. Causada pelo SARS-CoV-2, manifesta-se como uma doença semelhante à gripe que pode evoluir para a Síndrome Respiratória Aguda Grave, potencialmente resultando em fatalidades. Em países onde o HIV/*Leishmania infantum* é endêmico, a ocorrência de infecções concomitantes SARS-CoV-2/HIV/*Leishmania infantum* é uma realidade, suscitando questionamentos sobre a gestão clínica adequada. **Apresentação do caso:** Apresentamos o caso de uma mulher de 48 anos que foi hospitalizada por 36 dias em três hospitais diferentes no estado de Pernambuco, Brasil. Ela foi diagnosticada com coinfeção por SARS-CoV-2/HIV/*L. infantum*. A paciente apresentou sintomas graves de COVID-19, incluindo febre, tosse produtiva e dispneia. Durante a hospitalização, ela teve níveis de saturação de oxigênio de $\leq 93\%$, além de variações na pressão arterial, taxa respiratória e frequência cardíaca. Seus exames de sangue revelaram linfopenia, leucopenia e neutropenia, enquanto os resultados laboratoriais indicaram níveis anormais de dímero D, AST, ALT, desidrogenase láctica, ferritina e proteína C-reativa. Uma tomografia

computadorizada revelou 75% de comprometimento do parênquima pulmonar com opacidades em vidro fosco. **Conclusão:** Contra todas as probabilidades, a paciente recebeu alta. A leucopenia associada ao HIV/*L. infantum* pode ter desempenhado um papel decisivo. São necessários mais estudos para entender melhor as estratégias diagnósticas e as medidas de manejo clínico para pacientes coinfectados com HIV/*L. infantum* que são suscetíveis à infecção por SARS-CoV-2.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; HIV; Leishmaniose; Co-infecção; Relato de caso.

Introdução

O SARS-CoV-2 é o agente etiológico da Doença do Coronavírus 2019 (COVID-19), declarada pandemia em 11 de março de 2020 [1]. Até 10 de março de 2023, mais de 670 milhões de casos e mais de 6 milhões de mortes foram relatados em todo o mundo [2]. A COVID-19 é caracterizada por disfunção imunológica que pode progredir para uma síndrome hiper-inflamatória, levando à insuficiência respiratória e disfunção de múltiplos órgãos. O período de incubação varia de 2 a 14 dias, após o qual o paciente pode apresentar sintomas semelhantes aos da gripe, como febre ou calafrios, tosse, fadiga, coriza, dor de garganta, mialgia e dificuldade para respirar, ou pode ser assintomático [3]. Na fase aguda da doença, o paciente pode desenvolver insuficiência respiratória, necessitando de oxigênio suplementar, condição conhecida como Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) [4]. Em relação ao hemograma, pacientes com COVID-19 podem apresentar leucopenia, caracterizada por infecção direta dos linfócitos e subsequente imunossupressão funcional, ou leucocitose, que está associada a um pior prognóstico [5]. Por outro lado, também podem ser observados casos de neutropenia, potencialmente contribuindo para um melhor desfecho [6]. Dados laboratoriais podem revelar valores anormais de certos marcadores como proteína C-reativa (PCR), dímero D, ferritina, desidrogenase láctica (LDH), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), que podem servir como preditores de prognóstico severo [7-10]. Em pacientes com HIV ou aqueles com leishmaniose visceral (LV), o hemograma muitas vezes indica leucopenia, acompanhada de linfopenia e neutropenia, como resultado da imunossupressão causada pela infecção direta tanto pelo vírus quanto pelo parasita [11, 12]. Certos biomarcadores laboratoriais também podem ser alterados devido a uma alta carga viral, como PCR e dímero D, respectivamente [13, 14]. Além disso, os níveis de ferritina e LDH estão associados à progressão da doença em pacientes com HIV e LV [15, 16]. Alterações nos níveis de AST e ALT são comuns em pacientes com LV devido ao tropismo de *L. infantum* para células

hepáticas [17]. Vale ressaltar que *L. infantum* é um dos agentes oportunistas da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), e a coinfeção HIV/*L. infantum* representa uma preocupação global de saúde pública. Pacientes com essa coinfeção têm um risco elevado de recaída do parasita, bem como uma maior probabilidade de mortalidade [18]. Dada a ampla transmissão da COVID-19, a possibilidade de múltiplas infecções SARS-CoV-2/HIV/*L. infantum* torna-se uma realidade, particularmente em regiões onde *L. infantum* é endêmico. Além disso, há uma falta de dados publicados sobre o impacto da infecção por SARS-CoV-2 em pacientes coinfectados com HIV/*L. infantum*, incluindo aspectos clínicos, imunológicos e laboratoriais [19]. Portanto, este relato de caso serve para destacar uma coinfeção múltipla por SARS-CoV-2/HIV/*L. infantum* e suas características clínicas, imunológicas e laboratoriais associadas.

Apresentação do Caso

Uma paciente de 48 anos, nascida no estado de Pernambuco, Brasil, foi admitida na enfermaria do Hospital Agamenon Magalhães (HAM), Secretaria de Saúde, no estado de Pernambuco, em 1º de julho. Ela apresentou febre e perda de peso nos últimos quatro meses, junto com tosse produtiva. Nos cinco dias anteriores à admissão, ela apresentou dificuldade respiratória, disúria e taquicardia. Devido ao agravamento dos sintomas respiratórios, um teste de RT-PCR em tempo real (kit BIOMOL OneStep) para SARS-CoV-2 foi realizado em 3 de julho, resultando positivo. Foi iniciado tratamento com ceftriaxona (1 g/dia) e azitromicina (500 mg/dia). No HAM, a paciente foi hospitalizada por quatro dias (de 1º a 5 de julho) e manteve uma saturação média de oxigênio de 97%. Os achados laboratoriais revelaram leucopenia de 3.670 células/mm³, linfopenia de 771 células/mm³ e um nível máximo de proteína C-reativa (PCR) circulante de 7,7 mg/dL (Tabela 1).

Tabela 1- Dados de hemograma, achados laboratoriais e condições clínicas durante as três internações.

	HAM	HA	HC
Hemograma			
Leucócitos (células/mm ³)	3670	2700	1040-3360
Neutrófilos (células/mm ³)	N/A*	N/A	200-1965
Neutrófilos (%)	70	43,2-48,7	22,1-78
Linfócitos (células/mm ³)	771	N/A	200-1000
Linfócitos (%)	21	42.9	10-58.2
Plaquetas (células/mm ³)	128000	174000-214000	128000-189000
Achados laboratoriais			
Tempo de protrombina (sec.)	N/A	N/A	12,5-13,4

D-dímero (ng/mL)	N/A	2470	540
INR	N/A	N/A	0,94-1,02
AST (U/L)	18	35	18,8-325,8
ALT (U/L)	14	35	36,1-365,4
Bilirrubinas totais (mg/dL)	N/A	N/A	0,3-0,6
Bilirrubina direta (mg/dL)	N/A	N/A	0,1-0,4
Creatinina (mg/dL)	N/A	N/A	0,7-1,3
Desidrogenase láctica (U/L)	N/A	470	438,8
Ferritina (ng/mL)	N/A	N/A	465
Proteína C reativa (mg/dL)	7,7	21,8-48,8	0,3-6
Ureia (mg/dL)	19	18	8,4-29,7
Condições clínicas durante hospitalização			
Temperatura (°C)	N/A	35,9	36-39,2
Pressão sanguínea (mmHg)	N/A	110/60-130/80	100/60-190/80
Frequência respiratória (mpm)	N/A	13-20	18-24
Frequência cardíaca (bpm)	N/A	85-120	72-110
Saturação (%)	97,1	96-98	92-99

*Não aplicável – dados faltantes.

Após a confirmação do diagnóstico de COVID-19, a paciente foi transferida em 5 de julho para o hospital de referência para COVID-19, Hospital Alfa (HA), também localizado em Recife, capital do estado de Pernambuco. Na admissão, um novo teste de RT-PCR em tempo real (Protocolo CDC – vírus respiratório- CDC/Atlanta/EUA) para SARS-CoV-2 foi realizado, resultando positivo. Além disso, foram realizadas três baciloscopias para tuberculose, todas com resultados negativos. Ela foi tratada com ceftriaxona (1 g a cada 24 horas), azitromicina (500 mg a cada 24 horas) e sulfametoxazol + trimetoprim (800 mg + 160 mg a cada 24 horas). Além disso, ela recebeu enoxaparina (40 mg a cada 24 horas), paracetamol (750 mg a cada 8 horas) e ondansetrona (2 mg/mL a cada 8 horas). Em 15 de julho, a condição clínica da paciente melhorou, com ausência de dispneia e tosse. Em termos de desfechos clínicos, a temperatura corporal média foi de 36°C, a pressão arterial variou de 110/60 mmHg a 130/80 mmHg, a taxa respiratória variou de 13 a 20 respirações por minuto, a frequência cardíaca variou de 85 batimentos por minuto a 120 batimentos por minuto, e a saturação de oxigênio variou entre 96% e 98%. Os resultados laboratoriais indicaram valores máximos de dímero D de 2.470 ng/mL, desidrogenase láctica (LDH) de 470 U/L e PCR de 48,8 mg/dL (Tabela 1).

Para investigação adicional de episódios anteriores de febre e perda de peso, a paciente foi transferida para a enfermaria do Hospital das Clínicas (HC), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, em 15 de julho, com estado geral regular, consciente, orientada e afebril. Como medicação profilática, foi prescrito sulfametoxazol + trimetoprim (400/80 mg a cada 24

horas), além de enoxaparina (40 mg a cada 24 horas). A investigação para leishmaniose visceral foi iniciada por meio de ultrassonografia abdominal em 21 de julho, que não mostrou alterações no fígado ou baço. No dia seguinte, foi realizado um teste de PCR convencional (GoTaq® Green Master Mix - LITSR/L5.8S) para a detecção de DNA de *L. infantum*, resultando positivo. Assim, foi iniciado o tratamento com anfotericina B (4 mg/kg/dia). No mesmo dia, foi realizada PCR em tempo real para investigação de HIV, com resultado positivo, apresentando uma carga viral de 440.089 cópias/mL, contagem de CD4 igual a 71 células/mm³ e contagem de CD8 de 803 células/mm³.

Além dessas condições infecciosas, a presença de citomegalovírus (CMV) também foi investigada por meio de PCR em tempo real (iCycler iQ) em 24 de julho, resultando positivo com 2.540 cópias/mL detectadas. A paciente apresentou lesões ulceradas pruriginosas na vulva e regiões glúteas com características clínicas sugestivas de herpes e, conseqüentemente, foi iniciado o tratamento com aciclovir (400 mg a cada 8 horas), levando à melhora da condição clínica.

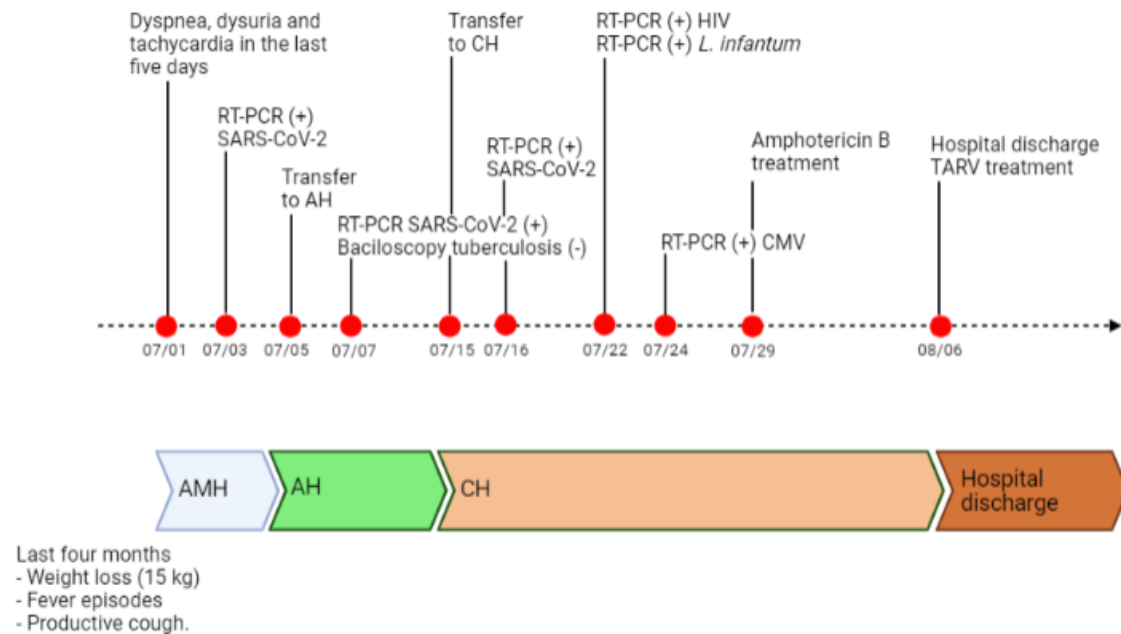
A paciente permaneceu na enfermaria por 22 dias (de 15 de julho a 7 de agosto) e apresentou os seguintes desfechos clínicos: temperatura corporal variando de 36 a 39,2 °C, pressão arterial variando entre 100/60 e 190/80 mmHg, taxa respiratória variando de 18 a 24 respirações por minuto, frequência cardíaca variando de 72 a 110 batimentos por minuto e saturação de oxigênio variando entre 92% e 99%. Durante esse período, foi realizada broncoscopia de escarro para investigar outros potenciais agentes causadores de doença pulmonar, como *Pneumocystis jirovecii*, *Mycobacterium tuberculosis* e CMV; no entanto, os resultados foram negativos. Uma tomografia computadorizada de tórax revelou opacidades em vidro fosco afetando aproximadamente 75% do parênquima pulmonar.

Em relação ao hemograma, foi observada presença notável de leucopenia, com níveis variando de 1.040 a 3.360 células/mm³. Também foi notada neutropenia moderada a grave, com valores variando de 200 a 1.965,6 células/mm³ (22,1%-78%). A linfopenia variou de 200 a 1.000 células/mm³ (20%-58,2%). Os achados laboratoriais indicaram valores de PCR de 6 mg/dL, dímero D de 540 ng/mL, ferritina de 465 ng/mL, LDH de 438,8 U/L, níveis de aspartato aminotransferase (AST) superiores a 51 U/L e níveis de alanina aminotransferase (ALT) superiores a 63 U/L (Tabela 1).

A paciente recebeu alta em 7 de agosto devido à melhora clínica e laboratorial. O tratamento para leishmaniose foi administrado com anfotericina B 50 mg (4 mg/kg/dia) de 29 de julho a 6 de agosto. Além disso, ela iniciou o tratamento antirretroviral (TAR) em 6 de agosto, consistindo em dolutegravir 50 mg/dia, tenofovir 300 mg/dia e lamivudina 300 mg/dia. Um

cronograma mostrando a evolução clínica e laboratorial, bem como os tratamentos administrados, está resumido na Figura 1.

Figura 1.- Principais evolução clínica, achados laboratoriais e tratamentos durante a hospitalização



Discussão e Conclusão

Foi relatado um caso de paciente com COVID-19 grave e coinfeção por HIV/*L. infantum*, admitida em três hospitais diferentes e que recebeu alta após 36 dias de hospitalização. Leucopenia, linfopenia e neutropenia, juntamente com outros achados laboratoriais anormais, foram observados durante as três hospitalizações. De acordo com Qu *et al.* [20], leucopenia e linfopenia são comuns em pacientes com COVID-19, possivelmente devido à infecção de leucócitos pelo SARS-CoV-2. Em casos graves de COVID-19, leucopenia e linfopenia podem ser observadas em mais de 70% dos pacientes em comparação com os controles [21]. A neutropenia observada aqui pode ser um fator importante associado às infecções por HIV e CMV, uma vez que esses vírus podem danificar os progenitores da medula óssea e levar à depleção autoimune [22].

No contexto da coinfeção por HIV/*L. infantum*, a linfopenia é comum devido ao tropismo do HIV pelos linfócitos TCD4 e à replicação do *L. infantum* nos linfócitos TCD4 e TCD8, o que pode levar à imunossupressão severa [11, 23, 24]. Leucopenia e neutropenia também podem ser observadas devido à presença desses dois patógenos juntos. É importante

destacar que os principais mecanismos imunológicos que governam a evolução clínica de pacientes coinfectados com *Leishmania infantum*, HIV e outras infecções permanecem pouco claros. A literatura sugere que pacientes coinfectados com *Leishmania infantum* e HIV têm um prognóstico pior em comparação com aqueles infectados apenas com *Leishmania infantum*, principalmente devido a respostas pró-inflamatórias pronunciadas do sistema reticuloendotelial. Isso também pode explicar as manifestações clínicas pulmonares observadas na paciente deste estudo.

O HIV pode prejudicar a fagocitose dos macrófagos, promovendo assim a replicação intracelular da *Leishmania*. Além disso, o HIV pode induzir os macrófagos a produzirem prostaglandina E2, cicloxigenase 2 e TGF- β , que por sua vez estimulam a replicação da *Leishmania* dentro dessas células. Outro mecanismo envolve a expressão de lipofosfoglicano (LPG) na superfície da *Leishmania*, que pode desencadear a expressão de proteínas LTR do DNA proviral do HIV nas células T via a via NF-kB. Além disso, é notável que o TNF- α , induzido pela infecção por *Leishmania*, pode aumentar a replicação do HIV (Casado *et al.*, 2015 [25]; Guedes *et al.*, 2018 [26]; Okwor & Uzonna, 2013 [27]).

No presente caso, a infecção por SARS-CoV-2 ocorreu após a imunossupressão causada por HIV/*L. infantum*. A literatura sugere que pacientes imunossuprimidos pelo HIV com COVID-19 têm maior propensão a desenvolver um curso clínico grave, pois o SARS-CoV-2 pode se propagar mais facilmente no corpo na ausência de uma resposta imune rápida para a eliminação viral [24]. Além disso, pacientes imunossuprimidos pelo HIV podem potencialmente agir como fontes para cargas virais aumentadas e o surgimento de variantes [24]. Indivíduos HIV-positivos também têm uma alta taxa de hospitalização devido à sua maior vulnerabilidade a infecções oportunistas e outras complicações [24].

Os achados laboratoriais podem desempenhar um papel importante na complexa interação entre SARS-CoV-2, HIV e *L. infantum*. Neste caso, os níveis de PCR, dímero D, ferritina, LDH, AST e ALT estavam alterados. Durante a COVID-19, os níveis de PCR podem refletir a extensão do dano pulmonar e a gravidade da doença [7]. A PCR funciona como um complemento para os sistemas imune inato e adaptativo, e sua expressão é induzida em resposta a fatores secretados por macrófagos, particularmente IL-1, IL-6 e TNF [28-30]. Neste caso, a paciente exibiu um pico de nível de PCR de 48,8 mg/dL e 75% de envolvimento do parênquima pulmonar. Além disso, é notável que o valor mais alto de PCR em nosso caso foi observado no nono dia da doença, que corresponde ao estágio de progressão da doença, geralmente ocorrendo entre 4 a 12 dias, e pode ser classificado como um preditor severo [30]. Níveis elevados de PCR também podem ser observados em pacientes com leishmaniose visceral (LV), pois serve como

um marcador de reações inflamatórias e ativação de citocinas [31]. Em pacientes HIV-positivos, os níveis de PCR são elevados apenas durante o uso de TAR ou infecções não intercorrentes [14]. Neste relato, a coinfeção por HIV é evidente, tornando *L. infantum* e SARS-CoV-2 potenciais indutores de altos níveis séricos de PCR.

O dímero D é outro marcador sérico importante no presente contexto. Ele resulta da degradação da fibrina, uma proteína importante para a formação de coágulos. Níveis elevados de dímero D circulante estão associados a alterações no processo de coagulação e à possibilidade de formação de trombose [32]. Neste caso, os valores de dímero D atingiram 2.470 ng/mL, sugerindo anormalidades no processo de coagulação. Até um aumento de nove vezes nos níveis de dímero D, juntamente com a presença de linfopenia, foi associado à mortalidade por COVID-19 em pacientes moderada e criticamente enfermos hospitalizados em Wuhan, China [33]. Além disso, o valor de corte para prever mortalidade durante a hospitalização foi determinado como 2000 ng/mL [33]. Os níveis de dímero D também aumentam na leishmaniose visceral e estão associados à ativação da coagulação intravascular, particularmente em sua forma grave [34]. Em pacientes com HIV, níveis elevados de dímero D resultam de altos níveis de RNA viral circulante e da ausência de tratamento antirretroviral (TAR), bem como de altos níveis de PCR e IL-6. Particularmente em mulheres, altas taxas de dímero D em uma idade precoce também podem estar relacionadas a doenças oportunistas do HIV [13]. Neste caso, os altos níveis de dímero D podem estar relacionados ao RNA viral circulante do HIV, bem como às infecções concomitantes, como SARS-CoV-2 e *L. infantum*, e níveis elevados de PCR.

Outro marcador importante é a ferritina, uma proteína envolvida na homeostase do ferro e que serve como um marcador sérico das reservas de ferro do corpo [35]. O ferro é considerado tóxico para as células devido à sua capacidade de induzir espécies reativas, que podem danificar o DNA e proteínas celulares. A ferritina desempenha um papel crucial no armazenamento de ferro, evitando assim esse dano. Em nossa paciente, os níveis de ferritina estavam elevados, atingindo 465 ng/mL. De acordo com Abbaspour *et al.* [36], a ferritina é uma proteína chave na desregulação imunológica, pois seus altos níveis séricos resultam de processos pró-inflamatórios e contribuem para a formação da tempestade de citocinas. Níveis elevados de ferritina sérica durante a admissão e hospitalização de pacientes com COVID-19 foram associados a doença moderada e grave, respectivamente [37]. No entanto, o estudo de Carubbi *et al.* [38] sugere uma associação apenas entre níveis elevados de ferritina e envolvimento pulmonar grave, destacando a ausência de diferença nas anormalidades pulmonares encontradas em tomografias computadorizadas entre pacientes que receberam alta e aqueles que morreram.

Níveis elevados de ferritina sérica também são evidentes em pacientes imunocompetentes com leishmaniose visceral (LV) e pacientes com HIV, à medida que a doença progride e a contagem de linfócitos TCD4 diminui [39, 40].

A LDH é uma enzima encontrada nos tecidos que pode indicar níveis de lesão e também é importante em doenças infecciosas. Níveis elevados de LDH foram observados no presente estudo. Altos níveis de LDH estão associados a danos teciduais em várias doenças, bem como em distúrbios pulmonares, que podem levar à insuficiência respiratória [41]. Consequentemente, os níveis de LDH também têm sido associados à gravidade em pacientes com COVID-19 [9, 42]. Além disso, a LDH demonstrou alta sensibilidade e especificidade na previsão de gravidade e mortalidade [39]. Além disso, os níveis de LDH podem estar alterados em pacientes com leishmaniose visceral (LV) e HIV [15, 16].

Aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), por outro lado, refletem a função hepática e são enzimas séricas que podem servir como preditores de gravidade da COVID-19. No estudo de Tian e Yen [10], pacientes graves apresentaram níveis elevados de AST e ALT. Isso poderia indicar o grau de comprometimento hepático devido à infecção por SARS-CoV-2 nos colangiócitos, que têm maior expressão de ACE2 [10]. Da mesma forma, Wang *et al.* [43] demonstraram anormalidades nos níveis de AST e ALT entre pacientes graves de COVID-19. Importante, *L. infantum* apresenta tropismo por células hepáticas e, em conjunto com a infecção por SARS-CoV-2, pode sobrecarregar o órgão induzindo hiperinflação [17]. No presente caso, os níveis elevados de AST e ALT observados podem resultar da coinfeção por SARS-CoV-2 e *L. infantum* no fígado, mas mais estudos são necessários para avaliar esses mecanismos.

Tomados em conjunto, esses achados laboratoriais fornecem marcadores importantes que podem ajudar a prever a gravidade da COVID-19 no contexto de coinfeções. É notável que os níveis de PCR, dímero D, ferritina, LDH, AST e ALT estavam elevados, indicando a possibilidade de exacerbação da doença através de vários mecanismos. No entanto, um desfecho grave não ocorreu, o que pode ser atribuído à interação com HIV/*L. infantum* no contexto da resposta celular, onde cada patógeno provoca um perfil específico.

Este é o primeiro relato de caso sobre uma infecção múltipla envolvendo SARS-CoV-2, HIV e *L. infantum*. Acreditamos que este trabalho fornece informações úteis para uma melhor compreensão dos desfechos clínicos, o que pode levar a estratégias diagnósticas aprimoradas e guiar a implementação de medidas de manejo para pacientes co-infectados por HIV/*L. infantum* suscetíveis à infecção por SARS-CoV-2, contribuindo assim para um prognóstico positivo da doença. A interação entre HIV e *L. infantum* pode ter desempenhado um papel importante aqui

e merece investigação adicional para elucidar a imunopatogênese desse processo infeccioso múltiplo.

Lista de Abreviações

AMH – Hospital Agamenon Magalhães;

AH – Hospital Alfa;

CH – Hospital das Clínicas

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação, Brasil, pela bolsa concedida a Pablo Cantalice Santos Farias (processo 88887.509082/2020-00). Reginaldo Lima-Neto é bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq, com a bolsa 310414/2022-9.

Contribuições dos Autores

P.C.S.F., V.Q.B. e R.G.L.N. conceituaram e desenharam o estudo. P.C.S.F., P.A.F.N., L.P.C., W.L.B.J., D.L.G. e A.T.X. estiveram envolvidos no trabalho laboratorial. P.S. R.A. acompanhou o paciente. P.C.S.F., G.S.N.B., P.A.F.N., Z.M.M. e V.M.B.L. realizaram a coleta de dados, análise formal e investigação. P.C.S.F. redigiu o manuscrito. G.S.N.B., P.S.R.A., V.Q.B. e R.G.L.N. contribuíram com inserção/remoção de conceitos, correções e sugestões. V.Q.B. e R.G.L.N. obtiveram suporte financeiro. Todos os autores leram e aprovaram a versão final a ser submetida.

Financiamento

Este estudo foi parcialmente apoiado pela bolsa FACEPE 17/2021 APQ-1061-4.01/21.

Disponibilidade de Dados e Materiais

Os autores concordam em disponibilizar gratuitamente todos os dados descritos no manuscrito.

Declarações

Aprovação Ética

Este estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinque, e o protocolo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco sob o protocolo CAAE 33597220.5.0000.5208, e foi aprovado sob o protocolo 4.227.624.

Consentimento para Publicação

Foi obtido consentimento informado por escrito do paciente para a publicação deste relato de caso e de quaisquer imagens associadas. Uma cópia do consentimento por escrito está disponível para revisão pelo Editor-Chefe desta revista.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Referências

1. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. 2023. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>. Accessed 22 Apr 2024.
2. Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. COVID-19 Map. 2023. <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Accessed 22 Apr 2024.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Symptoms of COVID-19. 2022. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>. Accessed 22 Apr 2024.
4. World Health Organization. COVID-19: symptoms and severity. 2022, <https://www.who.int/westernpacific/emergencies/covid-19/information/asymptomatic-covid-19>. Accessed 22 Apr 2024.
5. Remy KE, Mazer M, Striker DA, Ellebedy AH, Walton AH, Unsinger J, *et al.* Severe immunosuppression and not a cytokine storm characterizes COVID-19 infections. JCI Insight. 2020; 5:e140329.
6. Wang Y, Zhang L, Sang L, Ye F, Ruan S, Zhong B, *et al.* Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity. J Clin Invest. 2020; 130: 5235-5244.
7. Wang L. C-reactive protein levels in the early stage of COVID-19. Med Mal Infect. 2020; 50:332-334.

8. Dahan S, Segal G, Katz I, Hellou T, Tietel M, Bryk G, *et al.* Ferritin as a Marker of Severity in COVID-19 Patients: A Fatal Correlation. *Isr Med Assoc J.* 2020; 22:494-500.
9. Han Y, Zhang H, Mu S, Wei W, Jin C, Tong C, *et al.* Lactate dehydrogenase, an independent risk factor of severe COVID-19 patients: a retrospective and observational study. *Aging (Albany NY).* 2020; 12:11245-11258.
10. Tian D, Ye Q. Hepatic complications of COVID-19 and its treatment. *J Med Virol.* 2020; 92:1818-1824.
11. Goto H, Prianti MG. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2009; 51:241-6.
12. Fekene TE, Juhan LH, Mengesha CH, Worku DK. Prevalence of cytopenias in both HAART and HAART naive HIV infected adult patients in Ethiopia: a cross sectional study. *BMC Hematol.* 2018; 18:1-11.
13. Borges AH, O'Connor JL, Phillips AN, Baker JV, Vjecha MJ, Losso MH *et al.* Factors associated with D-dimer levels in HIV-infected individuals. *PLoS One.* 2014; 9:e90978.
14. Noursadeghi M, Miller RF. Clinical value of C-reactive protein measurements in HIV-positive patients. *Int J STD AIDS.* 2005; 166:64-70.
15. Farinacci D, Ciccullo A, Borghetti A, Visconti E, Tamburrini E, Izzi IM, *et al.* People Living with HIV in the COVID-19 Era: A Case Report. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2021; 37:253-254.
16. Mouhoub B, Bensalah M, Berhili A, Azghar A, Malki JE, Mezgueldi IE, *et al.* Visceral leishmaniasis associated with macrophage activation syndrome: Case report and literature review. *IDCases*, vol. 26, pp. e01247, 2021.
17. Shamsian SA, Fata A, Alinezhad R, Mohebbali M, Sadabadi F, Moghaddas E, *et al.* Clinical and Laboratory Findings of Visceral Leishmaniasis in Children Hospitalized in Mashhad, Northeastern Iran: A Twenty-Year Retrospective Study. *Iran J Parasitol.* 2020; 15:495-499.
18. Guedes DL, Justo AM, Júnior WLB, Silva ED, Aquino SR, Junior MSCL, *et al.* Asymptomatic leishmania infection in HIV-positive outpatients on antiretroviral therapy in Pernambuco, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021; 15:e0009067.
19. Sigel K, Swartz T, Golden E, Paranjpe I, Somani S, Richter F, *et al.* Coronavirus 2019 and People Living With Human Immunodeficiency Virus: Outcomes for Hospitalized Patients in New York City. *Clin Infect Dis.* 2020; 71:2933-2938.
20. Qu R, Ling Y, Zhang YHZ, Wei LY, Chen X, Li XM, *et al.* Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19. *J Med Virol.* 2020; 92:1533-1541.
21. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, *et al.* Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature.* 2020; 584:463-469.

22. Penner J, Chan CSY, Burns JE, Ali S, Lyall H. Congenital Cytomegalovirus and Autoimmune Neutropenia: Cause or Coincidence? *Pediatr Infect Dis J*. 2020; 39:336-338.
23. Schriefer A, Wilson ME, Carvalho EM. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008; 21:483-488.
24. Barbera LK, Kamis KF, Rowan SE, Davis AJ, Shehata S, Carlson JJ, *et al*. HIV and COVID-19: review of clinical course and outcomes. *HIV Res Clin Pract*. 2021; 22:102-118.
25. Casado JL, Abad-Fernández M, Moreno S, Pérez-Elías MJ, Moreno A, Bernardino JI, *et al*. Visceral leishmaniasis as an independent cause of high immune activation, T-cell senescence, and lack of immune recovery in virologically suppressed HIV-1-coinfected patients. *HIV Med*. 2015; 16:240-8.
26. Guedes DL, Medeiros Z, Da Silva ED, De Vasconcelos AVM, Da Silva MS, Da Silva MAL, *et al*. Visceral Leishmaniasis in Hospitalized HIV-Infected Patients in Pernambuco, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2018; 99:1541-46.
27. Okwor I, Uzonna JE. The immunology of Leishmania/HIV co-infection. *Immunol Res*. 2013; 56:163-71.
28. Boras E, Slevin M, Alexander MY, Aljohi A, Gilmore W, Ashworth J, *et al*. Monomeric C-reactive protein and Notch-3 co-operatively increase angiogenesis through PI3K signalling pathway. *Cytokine*. 2014; 69:165-179.
29. Shah S, Ma Y, Scherzer R, Huhn G, French A, Plankey M, *et al*. Association of HIV, hepatitis C virus and liver fibrosis severity with interleukin-6 and C-reactive protein levels. *AIDS*. 2015; 29:1325-1333.
30. Tan C, Huang Y, Shi F, Tan K, Ma Q, Chen Y, *et al*. C-reactive protein correlates with computed tomographic findings and predicts severe COVID-19 early. *J Med Virol*. 2020; 92:856-862.
31. Lockwood DNJ. Serological tests for visceral leishmaniasis. *BMJ*. 2006; 333:711-712.
32. Levi M, Toh CH, Thachil J, Watson HG, *et al*. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol*. 2009; 145:24-33.
33. Zhang L, Yan X, Fan Q, Liu H, Liu X, Liu Z, *et al*. D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with Covid-19. *J Thromb Haemost*. 2020; 18:1324-1329.
34. Sakkas LI, Boulbou M, Kyriakou D, Makri I, Sinani C, Germanis A, *et al*. Immunological features of visceral leishmaniasis may mimic systemic lupus erythematosus. *Clin Biochem*. 2008; 41:65-68.
35. Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, Torti SV. Ferritin for the clinician. *Blood Rev*. 2009; 23:95-104.

36. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci.* 2014; 19:164-174.
37. Lino K, Guimarães GMC, Alves LS, Oliveira AC, Faustino R, Fernandes CS, *et al.* Serum ferritin at admission in hospitalized COVID-19 patients as a predictor of mortality. *Braz J Infect Dis.* 2021; 25:101569.
38. Carubbi F, Salvati L, Alunno A, Maggi F, Borghi E, Mariani R, *et al.* Ferritin is associated with the severity of lung involvement but not with worse prognosis in patients with COVID-19: data from two Italian COVID-19 units. *Sci Rep.* 2021; 11:4863.
39. Horrillo L, Castro A, Matía B, Molina L, García-Martínez J, Jaqueti J, *et al.* Clinical aspects of visceral leishmaniasis caused by *L. infantum* in adults. Ten years of experience of the largest outbreak in Europe: what have we learned? *Parasit Vectors.* 2019; 12:359.
40. Riera A, Gimferrer E, Cadafalch J, Remacha A, Martin S. Prevalence of high serum and red cell ferritin levels in HIV-infected patients. *Haematologica.* 1994; 79:165-167.
41. Poggiali E, Zaino D, Immovilli P, Rovero L, Losi G, Dacrema A, *et al.* Lactate dehydrogenase and C-reactive protein as predictors of respiratory failure in CoVID-19 patients. *Clin Chim Acta.* 2020; 509:135-138.
42. Li C, Ye J, Chen Q, Hu W, Wang L, Fan Y, *et al.* Elevated Lactate Dehydrogenase (LDH) level as an independent risk factor for the severity and mortality of COVID-19. *Aging (Albany NY).* 2020; 12:15670-15681.
43. Wang Q, Zhao H, Liu LG, Wang YB, Zhang T, Li MH, *et al.* Pattern of liver injury in adult patients with COVID-19: a retrospective analysis of 105 patients. *Mil Med Res.* 2020; 7:28.

5.2 ARTIGO 2: VARIANTE GENÉTICA DO GENE AGT (RS699-GG) ESTÁ ASSOCIADA À COVID-19 GRAVE EM PACIENTES BRASILEIROS. **Fator de Impacto:** 1,1; **Qualis:** A2

Anais da Academia Brasileira de Ciências



Genetic variant in the AGT gene (rs699-GG) is associated with severe COVID-19 in Brazilian patients

Journal:	Anais da Academia Brasileira de Ciências
Manuscript ID:	AABC-2024-0274.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	28-Jun-2024
Complete List of Authors:	Farias, Pablo; Universidade Federal de Pernambuco Cabral, Leandro; Universidade Federal de Pernambuco Neves, Patrícia; Universidade Federal de Pernambuco Januário, Caio; Universidade Federal de Pernambuco Cordeiro, Beatriz; Universidade Federal de Pernambuco Junior, Wilson José; Universidade Federal de Pernambuco Baseggio, Carolina; Universidade Federal de Pernambuco Júnior, Sérgio; Universidade Federal de Pernambuco Ramos de Araújo, Paulo Sérgio; Instituto Aggeu Magalhães, Departamento de Imunologia Lorena, Virginia Maria; Instituto Aggeu Magalhães, Departamento de Imunologia Balbino, Valdir; Universidade Federal de Pernambuco Lima Neto, Reginaldo; Universidade Federal de Pernambuco, Departamento Medicina Tropical

Resumo

A pandemia de COVID-19 foi a maior pandemia do século passado, e vários fatores genéticos desempenharam um papel significativo nesse contexto. Este estudo teve como objetivo analisar a frequência e a associação entre os SNPs específicos rs3806268 (*NLRP3*), rs4925543 (*NLRP3*), rs12150220 (*NLRP1*), rs455060 (*NLR4*), rs699 (*AGT*), rs1137101 (*LEPR*) e rs1801133 (*MTHFR*) e os desfechos graves/críticos em pacientes brasileiros com COVID-19. Um total de 100 pacientes foi incluído no estudo, compreendendo 66 casos e 34 controles. O DNA foi extraído, sequenciado e genotipado por sequenciamento de nova geração (NGS). Para dados não paramétricos, foram utilizados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. O teste de Fisher e a regressão logística multivariada, considerando os critérios AIC e BIC, foram empregados para a análise de risco. Os Odds Ratios (OR) foram calculados, com significância estabelecida em $p < 0,05$. Entre os sete SNPs avaliados, apenas rs699-GG (*AGT*) (OR=8,07;

$p=0,04$) foi significativamente associado a um aumento no risco de desenvolver COVID-19 grave/crítica. Além disso, uma associação potencialmente protetora foi observada entre rs1801133-GA (*MTHFR*) e o início da COVID-19, embora sem significância estatística. Em conclusão, o SNP rs699-GG (*AGT*) foi associado a um aumento no risco de COVID-19 grave/crítica.

Palavras-chave: Gene *AGT*, COVID-19, Genética humana, SARS-CoV-2, SNPs

Introdução

A Doença por Coronavírus 2019 (COVID-19) começou em Wuhan, China, e foi declarada pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 11 de março de 2020. É considerada a maior e mais mortal pandemia do último século, causada pelo agente etiológico Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARS-CoV-2) (Azarpazhooh *et al.*, 2020). Até junho de 2024, mais de 775 milhões de casos e 7 milhões de mortes foram relatados em todo o mundo, tornando esta doença uma ameaça contínua à saúde global (OMS, 2024).

A COVID-19 pode se manifestar no corpo humano após um período de incubação de 2 a 14 dias após a exposição ao vírus (CDC, 2022). Apresenta um amplo espectro de sintomas, variando de casos assintomáticos e sintomas comuns de gripe (febre, tosse, fadiga, mialgia, dor de cabeça, dor de garganta, anosmia/ageusia, entre outros) até insuficiência respiratória, conhecida como Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), que pode ser fatal. Consequentemente, a COVID-19 possui várias classificações com base em diferentes desfechos clínicos (OMS, 2021). Nesse contexto, vários fatores são conhecidos por contribuir para esses diferentes desfechos, incluindo fatores genéticos humanos, como a influência de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) em genes envolvidos na resposta imune inata, metabolismo energético e sistema circulatório (Aladag *et al.*, 2023; Marei *et al.*, 2023; Pastor *et al.*, 2023).

Os genes *NLRP3* (NLR family pyrin domain containing 3), *NLRP1* (NLR family pyrin domain containing 1) e *NLRC4* (NLR family CARD domain containing 4) desempenham papéis cruciais na resposta imune inata a vírus e outras condições patológicas. Esses genes codificam receptores citoplasmáticos da via do inflamassoma, que estão envolvidos na gravidade de várias doenças (Sutterwala *et al.*, 2014). Além disso, os genes *AGT* (angiotensinogênio) e *MTHFR* (metilenotetrahidrofolato redutase) são importantes para funções vasculares do sistema renina-angiotensina (SRA) e para funções metabólicas, eliminando produtos tóxicos do corpo, respectivamente (Foley *et al.*, 2021; Xi *et al.*, 2016). O gene *LEPR* (Receptor de Leptina) codifica o receptor do hormônio leptina, que é significativo

no metabolismo de gordura e linfopoiese (NCBI, 2023). Além disso, foi identificado como um sinal crucial para angiogênese, proliferação celular e inibição de apoptose celular durante a infecção por SARS-CoV-2 (Rosa *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2013).

O funcionamento de muitos genes, incluindo os descritos acima, pode ser modulado pela ação dos SNPs, que podem desempenhar um papel crucial na regulação da expressão gênica, conformação proteica ou mecanismo de *splicing* (Cafiero *et al.*, 2021; Fahra *et al.*, 2020; Pastor *et al.*, 2023). Para o *NLRP3*, foi observado que o rs3806268 pode ter um papel fundamental em pacientes com COVID-19 com obesidade como uma das comorbidades relacionadas aos desfechos graves (Sá *et al.*, 2022). Além disso, outro SNP no mesmo gene, rs4925543, foi investigado por seu papel na inflamação das vias aéreas em pacientes com asma (Queiroz *et al.*, 2020). A variante missense rs12150220 (*NLRP1* - p.Leu155His) está relacionada ao aumento de IL-1 β em Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs) e foi associada à COVID-19 grave (Levandowski *et al.*, 2013; Leal *et al.*, 2022). A variante missense rs455060 (*NLRC4*) desempenha um papel fundamental nos níveis de IL-18, que são importantes no desfecho clínico da COVID-19 grave (Zeller *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2023). Para o SRA, o SNP rs699 (*AGT*) foi identificado como um potencial alvo genético para prever o risco clínico em pacientes infectados com SARS-CoV-2 (Cafiero *et al.*, 2021). No metabolismo da homocisteína, o SNP rs1801133 (*MTHFR*) foi identificado como um potencial marcador genético que impacta o desfecho da COVID-19 (Farha *et al.*, 2020). Para o gene *LEPR*, alguns SNPs foram estudados em relação a outras doenças infecciosas e patologias do sistema metabólico. Por exemplo, Lys109Arg e Gln223Arg foram associados ao carcinoma hepatocelular (HCC) em indivíduos portadores do vírus da hepatite B (HBV), e rs1137101-G foi associado a um risco reduzido de desenvolver o fenótipo obeso (Tang *et al.*, 2020).

Com base na visão geral mencionada, o presente estudo teve como objetivo investigar a associação entre os SNPs rs3806268 (*NLRP3*), rs4925543 (*NLRP3*), rs12150220 (*NLRP1*), rs455060 (*NLRC4*), rs699 (*AGT*), rs1137101 (*LEPR*) e rs1801133 (*MTHFR*) e os desfechos graves/críticos em pacientes brasileiros com COVID-19.

Materiais e métodos

Coleta de dados, comitê de ética e definição clínica

Um estudo de caso-controle foi conduzido para analisar a associação entre os SNPs rs3806268 (*NLRP3*), rs4925543 (*NLRP3*), rs12150220 (*NLRP1*), rs455060 (*NLRC4*), rs699

(*AGT*), rs1137101 (*LEPR*) e rs1801133 (*MTHFR*) e os desfechos graves/críticos da COVID-19. A população do estudo consistiu em 100 indivíduos, incluindo 34 indivíduos negativos para COVID-19, 33 com sintomas leves/moderados e 33 com sintomas graves/críticos.

Pacientes com 18 anos ou mais, com suspeita de COVID-19 e doença confirmada por RT-PCR, foram triados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE). Todos os pacientes inscritos forneceram consentimento informado, e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFPE (número de aprovação 4.150.959, C.A.A.E 33597220.5.0000.5208). Detalhes clínicos e epidemiológicos coletados incluíram idade, sexo, cor/raça, comorbidades, sintomas, hemograma e achados laboratoriais (ferritina, PCR, AST, ALT e d-dímero), juntamente com o diagnóstico por reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR). O material coletado para diagnóstico do vírus consistiu em aproximadamente 4 mL de sangue total, obtido dos pacientes durante a fase aguda da doença. Os casos de COVID-19 foram classificados de acordo com as diretrizes do National Institutes of Health (NIH), conforme descrito (NIH, 2023). Após avaliação clínica e laboratorial, 100 casos suspeitos ou confirmados de COVID-19 foram estratificados, compreendendo 34 casos negativos para COVID-19, 33 casos graves/críticos e 33 casos leves/moderados.

Extração de DNA, quantificação e processamento de dados

A extração de DNA genômico de sangue total foi realizada usando o kit PureLink Genomic DNA Mini (Invitrogen®), seguindo as instruções do fabricante. A quantificação do material genômico foi realizada usando o kit Qubit de alta sensibilidade para DNA de fita dupla (Thermo Fisher®), seguida de sequenciamento de nova geração (NGS) do exoma (Mendelics®) e subsequente processamento de dados.

Aquisição de dados e seleção de SNPs

A filtragem e anotação dos arquivos VCF foram conduzidas usando os softwares VCFtools e wANNOVAR, respectivamente (<http://snpeff.sourceforge.net/index.html>). A seleção dos SNPs e a determinação do genótipo foram baseadas na Frequência do Alelo Variante (VAF). Além disso, os SNPs foram selecionados por terem sido investigados em outros estudos envolvendo outras doenças infecciosas virais, bem como por seus impactos funcionais em suas respectivas proteínas.

Análise estatística

Para dados não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis foi empregado para comparar três amostras, e o teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar duas amostras, ambos conduzidos usando o software Graphpad PRISM v.9.5. A análise de risco bruto (análise bivariada) foi realizada usando o software Jamovi 2.3.21, com o genótipo ancestral considerado como referência para análise. A análise ajustada (regressão logística multivariada) foi conduzida usando o software Jamovi 2.3.28, com ajustes de modelo baseados no Critério de Informação de Akaike (AIC) e no Critério de Informação Bayesiano (BIC). Para determinar a associação entre genótipos e desfechos clínicos da COVID-19, o teste exato de Fisher foi empregado, considerando a razão de chances (OR) encontrada. Valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

Inicialmente, o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado para os SNPs estudados usando o teste qui-quadrado (χ^2) (Tabela 1). Inicialmente, dados socioepidemiológicos, características clínicas e desfechos dos pacientes foram coletados e analisados. Nossa população de estudo não mostrou diferença significativa na distribuição por sexo ou idades medianas entre os grupos de desfecho ($p > 0,05$). Dados sobre raça/cor e comorbidades também foram coletados, mas não foram identificadas diferenças estatísticas significativas (Tabela 2). Em relação aos sintomas apresentados pelos pacientes, febre, tosse, dispneia e anosmia/ageusia foram significativamente mais frequentes na condição grave/crítica, com valores de p de 0,04, 0,04, 0,0003 e 0,02, respectivamente (Tabela 2). Também é notável que houve um resultado limítrofe para os fatores astenia ($p = 0,05$) e mal-estar ($p = 0,08$), que podem estar relacionados ao desfecho grave/crítico (Tabela 2). Os dados do hemograma mostraram significância estatística para uma maior frequência de linfopenia e neutrofilia em pacientes com desfecho grave/crítico, com $p = 0,04$ (Tabela 2). Biomarcadores laboratoriais alterados para COVID-19 grave/crítica, como dímero-D e ferritina, também foram mais frequentes nesse desfecho, com valores de p de 0,0006 e 0,008, respectivamente (Tabela 2).

Tabela I. Valores qui-quadrado para medida do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Frequência (N=100)	χ^2	p
-----------------------	----------	-----

<i>NLRP3</i> rs3806268				
GG	33 (33)	0.99	0.32	
GA	53 (53)			
AA	14 (14)			
G	86 (56.2)			
A	67 (43.8)			
<i>NLRP3</i> rs4925543				
AA	0 (0)	0.41	0.52	
AG	12 (12)			
GG	88 (88)			
A	12 (10.7)			
G	100 (89.3)			
<i>NLRP1</i> rs12150220				
AA	40 (40)	2.52	0.11	
AT	52 (52)			
TT	8 (8)			
A	92 (60.5)			
T	60 (39.5)			
<i>NLRC4</i> rs455060				
GG	15 (15)	0.17	0.68	
GA	50 (50)			
AA	35 (35)			
G	65 (43.3)			
A	85 (56.7)			
<i>AGT</i> rs699				
AA	18 (18)	0.14	0.71	
AG	51 (51)			
GG	31 (31)			
A	69 (45.7)			
G	82 (54.3)			
<i>LEPR</i> rs1137101				
AA	32 (32)	0.08	0.80	
AG	48 (48)			
GG	20 (20)			
A	80 (54)			
G	68 (46)			
<i>MTHFR</i> rs1801133				
GG	52 (52)	1.22	0.27	
GA	37 (37)			
AA	11 (11)			
G	89 (65)			
A	48 (35)			

Tabela II. Distribuição por dados socioepidemiológicos, características clínicas e evolução do paciente.

	Todos (N = 100)	COVID-19 (-) (N = 34)	Leve/Moderado (N = 33)	Severo/Crítico (N = 33)	p
Mediana idade (intervalo interquartil)	60 (45 - 76)	58.5 (45 - 77)	55 (44 - 71)	68 (48,5 - 77,5)	0,56
Sexo feminino n° (%)	58 (58)	22 (64,7)	19 (57,6)	17 (51,5)	0,32
Idade ≥ 60 anos	51 (51)	16 (47)	14 (42,4)	21 (63,6)	0,14
Raça/cor					
Branca	26 (26)	6 (17,6)	13 (39,4)	7 (21,2)	0,10
Parda	69 (69)	26 (76,5)	20 (60,6)	23 (69,7)	0,19
Preta	3 (3)	2 (5,9)	0 (0)	1 (3)	>0,9
Amarela	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	- ^a
Sem informação ^b	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	- ^a
Comorbidades					

Hipertensão	50 (50)	19 (55,9)	16 (48,5)	15 (45,4)	0,47
Diabetes	9 (9)	2 (5,9)	3 (9,1)	4 (12,1)	0,43
Sintomas					
Febre	54 (54)	17 (50)	14 (42,4)	23 (69,7)	0,04
Tosse	63 (63)	22 (64,7)	16 (48,5)	25 (75,8)	0,04
Dispneia	71 (71)	25 (73,5)	16 (48,5)	30 (90,9)	0,0003
Dor de garganta	10 (10)	3 (8,8)	4 (12,1)	3 (9,1)	0,71
Dor de cabeça	14 (14)	5 (14,7)	2 (6,1)	7 (21,2)	0,15
Astenia	13 (13)	1 (2,9)	6 (18,2)	6 (18,2)	0,05
Mal-estar	18 (18)	8 (23,5)	2 (6,1)	8 (24,2)	0,08
Artralgia	5 (5)	0 (0)	2 (6,1)	3 (9,1)	>0,99
Mialgia	11 (11)	1 (2,9)	5 (15,2)	5 (15,2)	0,11
Dores abdominais	14 (14)	6 (17,6)	5 (15,2)	3 (9,1)	0,48
Diarreia	9 (9)	4 (11,8)	3 (9,1)	2 (6,1)	0,67
Vômito	10 (10)	2 (5,9)	4 (12,1)	4 (12,1)	0,43
Anosmia/ageusia	21 (21)	6 (17,6)	3 (9,1)	12 (36,4)	0,02
Hemograma^c					
Leucocitose	75 (78,1)	25 (75,8)	23 (74,2)	27 (84,4)	0,36
N observações	96	33	31	32	
Linfopenia	56 (56)	15 (75)	17 (73,9)	24 (96)	0,04
N observações	68	20	23	25	
Neutrofilia	50 (75,8)	16 (80)	13 (59,1)	21 (87,5)	0,04
N observações	66	20	22	24	
Trombocitopenia	29 (43,9)	9 (27,3)	9 (29)	11 (34,4)	0,6
N observações	96	33	31	32	
Achados laboratoriais alterados^c					
Ferritina	55 (68,8)	12 (54,5)	17 (58,6)	26 (89,6)	0,008
N observações	80	22	29	29	
PCR	92 (96,8)	32 (100)	28 (90,3)	32 (100)	- ^a
N observações	95	32	31	32	
AST	72 (76,6)	23 (71,9)	24 (80)	25 (78,1)	0,56
N observações	94	32	30	32	
ALT	62 (66)	18 (56,2)	23 (76,7)	21 (65,6)	0,23
N observações	94	32	30	32	
Dímero D	58 (74,4)	13 (50)	19 (79,2)	26 (92,8)	0,0006
N observações	78	26	24	28	

^a A presença de uma categoria com ocorrência nula tornou a análise inviável.

^b Grupo não considerado na análise por poder assumir qualquer uma das características de raça/cor.

^c Os valores de referência adotados aqui seguem o padrão do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Leucócitos: 4000 - 11000 células/mm³, linfócitos: 1000 - 4950 células/mm³, neutrófilos: 2000 - 7700 células/mm³, plaquetas: 150000 - 450000 células/mm³, ferritina: 18 - 323 ng/mL para sexo masculino e 5 - 204 ng/mL para sexo feminino, PCR: 0 - 0.5 ng/dL, AST: <38 U/L para sexo masculino e <32 U/L para sexo feminino, ALT: <41 U/L para sexo masculino e <31 U/L para sexo feminino, e dímero D: 0 - 500 ng/mL.

A partir dos dados de NGS do exoma, os SNPs rs3806268 (*NLRP3*), rs4925543 (*NLRP3*), rs12150220 (*NLRP1*), rs455060 (*NLR4*), rs699 (*AGT*), rs1137101 (*LEPR*) e rs1801133 (*MTHFR*) foram selecionados porque também foram investigados em outros estudos envolvendo outras doenças infecciosas virais e também por seus efeitos funcionais em suas respectivas proteínas. Antes de realizar análises univariadas e multivariadas dos SNPs considerados no presente estudo, uma tabela de frequência foi construída para visualizar o panorama da distribuição alélica e genotípica nos diferentes estratos: COVID-19 (-), COVID-

19 (+) leve/moderado e COVID-19 (+) grave/crítico (Tabela 3). Análises de associação genética foram inicialmente conduzidas de forma bruta entre os diferentes desfechos, mas não foram identificados resultados estatisticamente significativos. Na regressão logística multivariada realizada, apenas o SNP rs699-GG (AGT) mostrou uma associação significativa com a suscetibilidade ao desfecho grave/crítico em comparação com o desfecho leve/moderado, com uma razão de chances (OR) de 8,07 e $p=0,04$ (Tabela 4).

Tabela III. Frequências genotípica e alélica por desfecho clínico e diagnóstico.

	Todos (N=100)	COVID-19 (-) (N=34)	Leve/moderate (N=33)	Grave/crítico (N=33)
<i>NLRP3</i> rs3806268				
GG	33 (33)	12 (35.3)	11 (33.3)	10 (30.3)
GA	53 (53)	19 (55.9)	16 (48.5)	18 (54.5)
AA	14 (14)	3 (8.8)	6 (18.2)	5 (15.2)
G	86 (56.2)	31 (58.5)	27 (55.1)	28 (54.9)
A	67 (43.8)	22 (41.5)	22 (44.9)	23 (45.1)
<i>NLRP3</i> rs4925543				
AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
AG	12 (12)	5 (14.7)	3 (9.1)	4 (12.1)
GG	88 (88)	29 (85.3)	30 (90.9)	29 (87.9)
A	12 (10.7)	5 (12.8)	3 (8.3)	4 (10.8)
G	100 (89.3)	34 (87.2)	33 (91.7)	33 (89.2)
<i>NLRP1</i> rs12150220				
AA	40 (40)	14 (41.2)	13 (39.4)	13 (39.4)
AT	52 (52)	18 (52.9)	18 (54.5)	16 (48.5)
TT	8 (8)	2 (5.9)	2 (6.1)	4 (12.1)
A	92 (60.5)	32 (61.5)	31 (60.8)	29 (59.2)
T	60 (39.5)	20 (38.5)	20 (39.2)	20 (40.8)
<i>NLRC4</i> rs455060				
GG	15 (15)	5 (14.7)	6 (18.2)	4 (12.1)
GA	50 (50)	16 (47.1)	16 (48.5)	18 (54.5)
AA	35 (35)	13 (38.2)	11 (33.3)	11 (33.3)
G	65 (43.3)	21 (42)	22 (44.9)	22 (43.1)
A	85 (56.7)	29 (58)	27 (55.1)	29 (56.9)
<i>AGT</i> rs699				
AA	18 (18)	8 (23.5)	5 (15.2)	5 (15.1)
AG	51 (51)	15 (44.1)	20 (60.6)	16 (48.5)
GG	31 (31)	11 (32.4)	8 (24.2)	12 (36.4)
A	69 (45.7)	23 (46.9)	25 (47.2)	21 (42.8)
G	82 (54.3)	26 (54.1)	28 (52.8)	28 (57.2)
<i>LEPR</i> rs1137101				
AA	32 (32)	11 (32.4)	11 (33.3)	10 (30.3)
AG	48 (48)	12 (35.3)	16 (48.5)	20 (60.6)
GG	20 (20)	11 (32.4)	6 (18.2)	3 (9.1)
A	80 (54)	23 (50)	27 (55.1)	30 (56.6)
G	68 (46)	23 (50)	22 (44.9)	23 (43.4)
<i>MTHFR</i> rs1801133				
GG	52 (52)	16 (47.1)	18 (54.5)	18 (54.5)
GA	37 (37)	16 (47.1)	12 (36.4)	9 (27.3)
AA	11 (11)	2 (5.8)	3 (9.1)	6 (18.2)
G	89 (65)	32 (64)	30 (66.7)	27 (64.3)
A	48 (35)	18 (36)	15 (33.3)	15 (35.7)

Tabela IV. Associação ajustada entre os SNPs estudados e os diferentes estágios clínicos da COVID-19.

SNPs	COVID-19 (-) (N=34) (I)	Leve/moderado (N=33) (II)	Grave/crítico (N=33) (III)	OR ajustada (95% CI) (I vs II)	p	OR ajustada (95% CI) (I vs III)	p	OR ajustada (95% CI) (II vs III)	p	AIC	BIC
<i>NLRP3</i> rs3806268											
GG	12 (35,3)	11 (33,3)	10 (30,3)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-	204	251
GA	19 (55,9)	16 (48,5)	18 (54,5)	0,68 (0,20 – 2,24)	0,52	1,22 (0,35 – 4,24)	0,75	1,81 (0,46 – 7,16)	0,40	202	254
AA	3 (8,8)	6 (18,2)	5 (15,2)	2,45 (0,36 – 16,37)	0,35	2,24 (0,33 – 15,12)	0,41	0,92 (0,15 – 5,44)	0,92		
G	31 (58,5)	27 (55,1)	28 (54,9)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-		
A	22 (41,5)	22 (44,9)	23 (45,1)	2,07 (0,29 – 14,73)	0,47	2,18 (0,32 – 14,85)	0,43	1,05 (0,17 – 6,40)	0,96		
<i>NLRP3</i> rs4925543											
AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-	-	-	-	-	-	202	244
AG	5 (14,7)	3 (9,1)	4 (12,1)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-	198	245
GG	29 (85,3)	30 (90,9)	29 (87,9)	1,72 (0,31 – 9,44)	0,53	0,87 (0,15 – 5,00)	0,88	0,51 (0,07 – 3,74)	0,50		
AG	5 (12,8)	3 (8,3)	4 (10,8)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-		
G	34 (87,2)	33 (91,7)	33 (89,2)	3,33 (0,34 – 32,64)	0,30	1,03 (0,17 – 6,14)	0,97	0,31 (0,03 – 3,51)	0,34		
<i>NLRP1</i> rs12150220											
AA	14 (41,2)	13 (39,4)	13 (39,4)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-	205	252
AT	18 (52,9)	18 (54,5)	16 (48,5)	1,26 (0,40 – 3,89)	0,69	0,60 (0,18 – 2,00)	0,41	0,48 (0,13 – 1,76)	0,27	203	255
TT	2 (5,9)	2 (6,1)	4 (12,1)	0,95 (0,09 – 9,93)	0,97	0,55 (0,07 – 4,52)	0,58	0,59 (0,06 – 5,47)	0,64		
A	32 (61,5)	31 (60,8)	29 (59,2)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-		
T	20 (38,5)	20 (39,2)	20 (40,8)	0,90 (0,09 – 9,07)	0,93	0,56 (0,07 – 4,57)	0,58	0,62 (0,07 – 5,38)	0,66		
<i>NLRC4</i> rs455060											
GG	5 (14,7)	6 (18,2)	4 (12,1)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-	205	252
GA	16 (47,1)	16 (48,5)	18 (54,5)	0,99 (0,20 - 5,02)	0,99	2,43 (0,42 - 13,88)	0,32	2,45 (0,40 - 14,98)	0,33	205	252
AA	13 (38,2)	11 (33,3)	11 (33,3)	0,92 (0,17 - 4,99)	0,92	1,62 (0,27 - 9,90)	0,60	1,77 (0,27 - 11,78)	0,55		
G	21 (42)	22 (44,9)	22 (43,1)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-		
A	29 (58)	27 (55,1)	29 (56,9)	1,09 (0,20 - 5,94)	0,92	1,77 (0,27 - 11,78)	0,55	1,77 (0,27 - 11,78)	0,55		
<i>AGT</i> rs699											
AA	8 (23,5)	5 (15,2)	5 (15,1)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-	201	248
AG	15 (44,1)	20 (60,6)	16 (48,5)	0,76 (0,15 – 3,73)	0,74	1,95 (0,43 – 8,81)	0,38	2,55 (0,49 – 13,33)	0,27	201	248
GG	11 (32,4)	8 (24,2)	12 (36,4)	0,29 (0,04 – 1,87)	0,19	2,34 (0,42 – 12,89)	0,33	8,07 (1,12 – 58,13)	0,04		
A	23 (46,9)	25 (47,2)	21 (42,8)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-		
G	26 (54,1)	28 (52,8)	28 (57,2)	0,29 (0,04 – 1,87)	0,19	2,34 (0,42 – 12,89)	0,33	3,45 (0,53 – 22,28)	0,19		
<i>LEPR</i> rs1137101											
AA	11 (32,4)	11 (33,3)	10 (30,3)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-	202	249
AG	12 (35,3)	16 (48,5)	20 (60,6)	0,94 (0,26 – 3,35)	0,92	1,65 (0,46 – 5,99)	0,44	1,76 (0,47 – 6,63)	0,40		
GG	11 (32,4)	6 (18,2)	3 (9,1)	0,57 (0,13 – 2,51)	0,46	0,28 (0,05 – 1,59)	0,15	0,49 (0,07 – 3,36)	0,47		

A	23 (50)	27 (55,1)	30 (56,6)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-	202	249
G	23 (50)	22 (44,9)	23 (43,4)	0,18 (0,04 – 0,97)	0,46	0,28 (0,05 – 1,59)	0,15	0,49 (0,07 – 3,36)	0,47		
<i>MTHFR</i> rs1801133											
GG	16 (47,1)	18 (54,5)	18 (54,5)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-	98.5	145
GA	16 (47,1)	12 (36,4)	9 (27,3)	0,75 (0,24 – 2,40)	0,63	0,27 (0,07 – 1,01)	0,05	0,36 (0,09 – 1,44)	0,15		
AA	2 (5,8)	3 (9,1)	6 (18,2)	0,91 (0,10 – 7,79)	0,93	0,94 (0,11 – 7,73)	0,95	1,04 (0,14 – 7,44)	0,97		
G	32 (64)	30 (66,7)	27 (64,3)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-	202	249
A	18 (36)	15 (33,3)	15 (35,7)	0,91 (0,10 – 7,79)	0,93	0,94 (0,11 – 7,73)	0,96	1,04 (0,14 – 7,44)	0,97		

Discussão

Este estudo é a primeira investigação caso-controle a identificar uma associação entre o SNP rs699 (*AGT*) e desfechos graves/críticos em pacientes brasileiros suspeitos ou confirmados com COVID-19. Os pacientes suspeitos com diagnóstico negativo para COVID-19 foram usados como grupo controle. Dados socioepidemiológicos, incluindo faixa etária, sexo e raça/cor, também foram coletados e analisados para associações; no entanto, não foram observados resultados significativos (Tabela 2). Compreender esse contexto é crucial para elucidar quais estratos epidemiológicos a doença afeta (Islam *et al.* 2020). Dados sobre comorbidades como hipertensão e diabetes mellitus tipo 2 também foram coletados para avaliar possíveis associações, mas não foram identificados resultados estatisticamente significativos (Tabela 2). Por outro lado, Angulo-Aguado *et al.* (2022) encontraram associações estatísticas significativas entre hipertensão, diabetes mellitus tipo 2 e piores desfechos em uma população sul-americana. Além disso, a literatura existente demonstra consistentemente a associação entre hipertensão, diabetes e desfechos graves na COVID-19 em outras populações (Kouhpayeh *et al.* 2021; Feng *et al.* 2022).

No presente estudo, observamos que os sintomas de febre ($p=0,04$), tosse ($p=0,04$), dispneia ($p=0,0003$) e anosmia/ageusia ($p=0,02$) foram significativamente mais frequentes em indivíduos graves/críticos, indicando um efeito associativo (Tabela 2). Outro estudo sobre pacientes latino-americanos também encontrou uma associação entre os sintomas de febre, tosse e dispneia e a gravidade da COVID-19, corroborando nossos achados (Angulo-Aguado *et al.* 2022). Sintomas que indicam condições precárias no trato respiratório inferior são frequentemente associados à COVID-19 grave, pois apontam para o envolvimento pulmonar (Angulo-Aguado *et al.* 2022). Além disso, a literatura relata que a anosmia pode estar diretamente relacionada à gravidade da infecção (Mazzatenta *et al.* 2020).

Em relação aos dados do hemograma, encontramos que a linfopenia está significativamente associada a desfechos graves/críticos ($p=0,04$, Tabela 2). Revisões sistemáticas e meta-análises mostraram que pacientes com piores desfechos têm níveis de linfócitos significativamente mais baixos em comparação com pacientes com desfechos leves na COVID-19 (Huang & Pranata 2020; Zhao *et al.* 2020). Além disso, os níveis de neutrófilos desempenham um papel importante em desfechos graves/críticos em pacientes com COVID-19. Em nosso estudo, encontramos uma associação significativa ($p=0,04$) entre neutrofilia e desfechos graves/críticos (Tabela 2). Sabe-se que a fisiopatologia dos desfechos graves na COVID-19 é marcada por níveis elevados, mudanças fenotípicas e funcionais nos neutrófilos,

e suas assinaturas de ativação são uma característica proeminente nos transcriptomas sanguíneos de pacientes com COVID-19 grave (Reusch *et al.* 2021). Também investigamos possíveis relações entre trombocitopenia, leucocitose e desfechos graves/críticos, mas não foram encontrados resultados estatisticamente significativos (Tabela 2). No entanto, a literatura fornece achados importantes sobre a associação entre trombocitopenia, leucocitose e COVID-19 grave/crítica (Lippi *et al.* 2020; Yamada *et al.* 2020). A trombocitopenia é comum em casos graves, possivelmente relacionada à descompensação fisiológica dos órgãos e ao desenvolvimento de coagulopatia intravascular, que pode evoluir para coagulação intravascular disseminada (CID) (Zarichanski & Houston 2017).

Dados laboratoriais potencialmente preditivos para os piores desfechos na COVID-19 também foram investigados (Tabela 2). Foram observadas associações significativas entre os níveis de ferritina e desfechos graves/críticos da COVID-19 ($p=0,008$, Tabela 2). Outros estudos também identificaram níveis elevados de ferritina como marcadores importantes para desfechos graves da COVID-19 (Kaushal *et al.* 2022). A ferritina é um mediador chave da desregulação imunológica que pode contribuir para a tempestade de citocinas observada em indivíduos com desfechos graves da doença (Abbaspour *et al.* 2014). Outro marcador importante associado a desfechos graves/críticos da COVID-19 neste estudo é o dímero-D ($p=0,0006$). Este achado corrobora outras pesquisas que mostram uma forte associação entre níveis elevados de dímero-D e prognóstico ruim na COVID-19 (Tang *et al.* 2020; Rostami & Mansouritorghabeh 2020). Níveis elevados de dímero-D indicam uma alta resposta inflamatória em doenças graves, muitas vezes manifestando-se como uma tempestade de citocinas, que pode induzir coagulação intravascular disseminada (CID) e a formação de coágulos de fibrina (Rostami & Mansouritorghabeh 2020). No presente estudo, não foram observados resultados significativos para PCR, AST e ALT, apesar da literatura mostrar associações importantes entre esses fatores e COVID-19 grave/crítica (Tan *et al.* 2020; Ceci *et al.* 2023).

O SNP rs699-A/G é uma variante missense localizada no braço longo do cromossomo 1 (1q42-43), exon 2 (códon 268) do gene *AGT*, e envolve a substituição de metionina por treonina (M268T) (El-Garawani *et al.* 2021). O gene *AGT* codifica o precursor da angiotensina, que pode ser clivado pela renina em resposta à baixa pressão arterial (NCBI, 2023). Em nosso estudo, o genótipo rs699-GG foi associado a um aumento no risco de desenvolver COVID-19 grave/crítica (OR=8,07; $p=0,04$, Tabela 4). Segundo Gaspersic & Dolzan (2022), o SNP rs699 (*AGT*) é um dos polimorfismos que podem influenciar a suscetibilidade ao SARS-CoV-2 e a gravidade da COVID-19, como evidenciado por uma pesquisa na literatura e análise de banco de dados (Gaspersic & Dolzan 2022). Além disso, o rs699 (*AGT*) pode servir como uma

ferramenta prognóstica valiosa para pacientes infectados com SARS-CoV-2, pois esse SNP pode estar relacionado a danos internos aos órgãos durante a infecção (Cafiero *et al.* 2020). Outro estudo sobre pacientes iranianos avaliou a associação entre rs699 (*AGT*) e o risco de desenvolver COVID-19, encontrando resultados significativos para o genótipo TC (8,4 vezes) e o alelo C (2,2 vezes) em comparação com o genótipo TT/alelo T (Kouhpayeh *et al.* 2021). É importante notar que o alelo C também está associado ao aumento do angiotensinogênio plasmático e hipertensão, o que pode influenciar a expressão do *TMPRSS2* e, consequentemente, o risco de COVID-19 (Wu *et al.* 2020). Além disso, pesquisas em camundongos C57BL/6J demonstraram que inibir a expressão do *AGT* por 14 dias reduziu significativamente os níveis de expressão do *TMPRSS2* nos pulmões (Wu *et al.* 2020).

Aqui também observamos um resultado limítrofe (OR=0,27; $p=0,05$) para a associação protetora entre rs1801133-GA (*MTHFR*) e desfechos graves/críticos em pacientes com COVID-19 em comparação com indivíduos negativos para COVID-19 (Tabela 4). Este SNP foi identificado como um potencial fator envolvido em distúrbios trombofílicos em indivíduos com COVID-19, indicando a necessidade de estudos mais robustos (Cafiero *et al.* 2020). Além disso, o alelo rs1801133-T tem sido associado a um aumento do risco de desenvolver carcinoma hepatocelular (HCC), um tipo comum de câncer de fígado causado por infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV) (Carvalho *et al.* 2021).

No presente estudo, outros SNPs relevantes de várias vias de resposta imune foram avaliados, mas não foram encontrados resultados significativos. Esses SNPs têm sido investigados por possíveis associações com outras doenças infecciosas e vias inflamatórias (Cafiero *et al.* 2020; Nakanishi *et al.* 2017; Kamada & Pontillo 2014; Zhong *et al.* 2022).

O presente estudo tem algumas limitações, como um tamanho de amostra pequeno e a ausência de certas variáveis que poderiam contribuir para um modelo estatístico multivariado mais robusto. Essas limitações são atribuídas às deficiências nos recursos disponíveis para extração de DNA e sequenciamento NGS. Portanto, sugere-se que pesquisas futuras sejam conduzidas com um tamanho de amostra maior e maior robustez de dados para melhor compreender as associações conjuntas entre os SNPs descritos aqui, dados clínico-laboratoriais e os diferentes desfechos da COVID-19.

Conclusões

Febre, tosse e dispneia foram significativamente mais frequentes em indivíduos com desfechos graves/críticos de COVID-19. No entanto, os sintomas de mal-estar e astenia

mostraram resultados limítrofes interessantes que também podem explicar a progressão da doença. Em termos de hemograma, linfopenia e neutrofilia foram significativamente mais frequentes em casos graves/críticos. Entre os marcadores laboratoriais, os níveis de dímero-D e ferritina também foram mais elevados em pacientes graves/críticos. Em relação ao estudo de associação genética, o SNP rs699-GG (AGT) foi associado a um aumento no risco de desenvolver COVID-19 grave/crítica em comparação com desfechos leves/moderados. Com base nesses resultados, recomenda-se que estudos futuros envolvendo diferentes populações sejam conduzidos para investigar outros perfis associativos. Os SNPs identificados devem ser considerados para elucidar potenciais vias de gravidade da doença e predição, bem como para avaliar possíveis alternativas terapêuticas.

Agradecimentos

Somos gratos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio e financiamento. Também agradecemos ao Dr. Evônio Campello e ao Dr. Igor Wesland por facilitarem o acesso aos pacientes no Hospital das Clínicas da UFPE.

Contribuições dos autores

P.C.S.F escreveu o trabalho; P.C.S.F, L.P.C e P.A.F.N realizaram a coleta de dados; C.A.B.J, B.M.C, W.J.S.J, C.B, S.S.L.P.J, P.S.R.A, V.M.B.L, V.Q.B e R.G.L.N revisaram o manuscrito com correções e sugestões; W.J.S.J organizou os dados de sequenciamento para realizar a genotipagem; P.S.R.A, V.M.B.L, V.Q.B e R.G.L.N aprovaram o projeto e receberam financiamento; V.Q.B e R.G.L.N coordenaram o estudo; R.G.L.N supervisionou o estudo.

Referências

1. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. 2014. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci* 19:164-74.
2. Aladag E *et al.* 2023. Human ACE D/I Polymorphism Could Affect the Clinicobiological Course of COVID-19. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2021: 5509280.
3. Angulo-Aguado M *et al.* 2022. Association Between the LZTFL1 rs11385942 Polymorphism and COVID-19 and Severity in Colombian Population. *Front Med* 9:910098.
4. Azarpazhooh MR *et al.* 2020. COVID-19 Pandemic and Burden of Non-Communicable Diseases: An Ecological Study on Data of 185 Countries. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 29:105089.

5. Cafiero C *et al.* 2020. Pharmacogenomics and Pharmacogenetics: In Silico Prediction of Drug Effects in Treatments for Novel Coronavirus SARS-CoV-2 Disease. *Pharmacogenomics Pers Med* 13:463-484.
6. Cafiero C *et al.* 2021. Angiotensin system polymorphisms' in SARS-CoV-2 positive patients: assessment between symptomatic and asymptomatic patients: a pilot study. *Pharmacogenomics Pers Med* 14:621-629.
7. Carvalho SCR *et al.* 2021. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphisms in Brazilian patients with Hepatitis C virus (HCV)-related hepatocellular carcinoma (HCC). *Clinics (São Paulo)* 76:e2881.
8. Ceci FM *et al.* 2023. Investigating Biomarkers for COVID-19 Morbidity and Mortality. *Curr Top Med Chem* 23:1196-1210.
9. Clinical Spectrum of SARS-CoV-2 Infection. 2023. Disponível em: <https://files.covid19treatmentguidelines.nih.gov/guidelines/section/section_43.pdf> Acesso em 12 mar 2024.
10. COVID-19 Map. 2023. Disponível em: <<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>> Acesso em 12 mar 2024.
11. El-Garawani IM, Shaheen EM, El-Seedi HR, Khalifa SMA, Mersal GAM, Emara MM, Kasemy ZA. 2021. Angiotensinogen Gene Missense Polymorphisms (rs699 and rs4762): The Association of End-Stage Renal Failure Risk With Type 2 Diabetes and Hypertension in Egyptians. *Genes* 12:339.
12. Farha MA *et al.* 2020. Prognostic genetic markers for thrombosis in COVID-19 patients: a focused analysis on D-dimer, homocysteine and thromboembolism. *Front in Pharmacol* 11:587451.
13. Feng S, Song F, Guo W, Tan J, Zhang X, Qiao F, Guo J, Zhang L, Jia X. 2022. Potential Genes Associated with COVID-19 and Comorbidity. *Int J Med Sci* 19:402-415.
14. Foley A, Steinberg BE, Goldenberg NM. 2021. Inflammasome Activation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Front Med (Lausanne)* 8:826557.
15. Gaspersic J, Dolzan V. 2022. Viral and Host Genetic and Epigenetic Biomarkers Related to SARS-CoV-2 Cell Entry, Infection Rate, and Disease Severity. *Biology (Basel)* 11:178.
16. Gene AGT angiotensinogen. 2024. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/183>> Acesso em 12 mar 2024.
17. Huang I, Pranata R. 2020. Lymphopenia in severe coronavirus disease-2019 (COVID-19): systematic review and meta-analysis. *J Intensive Care* 8:36.
18. Islam N, Khunti K, Dambha-Miller H, Kawachi I, Marmot M. 2020. COVID-19 mortality: a complex interplay of sex, gender and ethnicity. *Eur J Public Health* 30:847-848.

19. Kamada AJ, Pontillo A, Guimarães RL, Loureiro P, Crovella S, Brandão LAC. 2014. NLRP3 polymorphism is associated with protection against human T-lymphotropic virus 1 infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109:957-60.
20. Kaushal K *et al.* 2022. Serum ferritin as a predictive biomarker in COVID-19. A systematic review, meta-analysis and meta-regression analysis. *J Crit Care* 67:172-181.
21. Kouhpayeh HR, Tabasi F, Dehvari M, Naderi M, Bahari G, Khalili T, Clark C, Ghavami S, Taheri M. 2021. Association between angiotensinogen (AGT), angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensin-II receptor 1 (AGTR1) polymorphisms and COVID-19 infection and southeast of Iran: a preliminary case-control study. *Transl Med Commun* 6:26.
22. Leal VN *et al.* 2022. A common variant close to the “tripwire” linker region of NLRP1 contributes to severe COVID-19. *Inflamm Res* 72:1933-1940.
23. LEPR leptin receptor [Homo sapiens (human)]. 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3953>>. Acesso em 12 mar 2024.
24. Levandowski CB *et al.* 2013. NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1 β processing via the NLRP1 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:2952-2956.
25. Lippi G, Plebani M, Henry BM. 2020. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. *Clin Chim Acta* 506:145-148.
26. Living guidance for clinical management of COVID-19. 2021. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/349321/WHO-2019-nCoV-clinical-2021.2-eng.pdf>>. Acesso em 12 mar 2024.
27. Marei YES, Bayoumi AA, Nassar HMA, Mansour B, Hamady AB. 2023. The Relation between ACE Gene Polymorphism and the Severity of COVID-19 Infection. *Int J Microbiol* 2023: 4540287.
28. Mazzatenta A *et al.* 2020. Smell and Taste in Severe CoViD-19: Self-Report vs. Testing. *Front Med* 7:589409.
29. Nakanishi H *et al.* 2017. *NLRP3* mutation and cochlear autoinflammation cause syndromic and nonsyndromic hearing loss DFNA34 responsive to anakinra therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 114:E7766-E7775.
30. Pastor AF *et al.* 2023. Human Polymorphisms and Computational Intelligence Approach Revealed a Complex Genomic Signature for COVID-19 Severity in Brazilian Patients. *Viruses* 15:645.
31. Queiroz GDA, Da Silva RR, Pires ADO, Costa RDS, Alcântara-Neves NM, Silva TM, Barreto ML, Oliveira SC, Figueirêdo CA. 2020. New variants in NLRP3 inflammasome genes increase risk for asthma and *Blomia tropicalis*-induced allergy in a Brazilian population. *Cytokine X* 2:100032.

32. Reusch N, Domenico E, Bonaguro L, Schulte-Schrepping J, Babler K, Schultze JL, Aschenbrenner AC. 2021. Neutrophils in COVID-19. *Front Immunol* 12:652470.
33. Rosa BA *et al.* 2021. IFN signaling and neutrophil degranulation transcriptional signatures are induced during SARS-CoV-2 infection. *Commun Biol* 4:290.
34. Rostami M, Mansouritorghabeh H. 2020. D-dimer level in COVID-19 infection: a systematic review. *Expert Rev Hematol* 13:1265-1275.
35. Sá NBR *et al.* 2022. Inflammasome genetic variants are associated with protection to clinical severity of COVID-19 among patients from Rio de Janeiro, Brazil. *BioMed Res Int* 2022:15.
36. Sethi AA, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. 2003. Angiotensinogen Gene Polymorphism, Plasma Angiotensinogen, and Risk of Hypertension and Ischemic Heart Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1269-75.
37. Song JH, Shin SJ, Kim JS. 2013. Leptin: A Multifunctional Role as an Immunomodulator in Mycobacterial Lung Disease. *J Bacteriol Virol* 43:1-8.
38. Sutterwala ES, Haasken S, Cassel SL. 2014. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci* 1319: 82-95.
39. Symptoms of COVID-19. 2022. Available at: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>> Accessed 12 mar 2024.
40. Tan C, Huang Y, Shi F, Tan K, Ma Q, Chen Y, Jiang X, Li X. 2020. C-reactive protein correlates with computed tomographic findings and predicts severe COVID-19 early. *J Med Virol* 92:856-862.
41. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. 2020. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost* 18:844-847.
42. Tang Y, Zhan L, Lu Y, Chen H, Qin S, Liang Z, Li H, Wei W, Li S, Qin X. 2020. Association of LEPR gene polymorphism with the risk of hepatitis B virus-related virus disease in Guangxi Chinese: A case-control study. *Infect Genet Evol* 84:104366.
43. Number of COVID-19 cases reported to WHO (cumulative total). Number of COVID-19 deaths reported to WHO. 2024. Available at: <<https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=o>> Accessed 08 jun 2024.
44. Wu C, Ye D, Mullick AE, Li Z, Danser AHJ, Daugherty A, Lu HS. 2020. Effects of Renin-Angiotensin Inhibition on ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2) and TMPRSS2 (Transmembrane Protease Serine 2) Expression: Insights Into COVID-19. *Hypertension* 76:e29–e30.
45. Xi H *et al.* 2016. Caspase-1 Inflammasome Activation Mediates Homocysteine-Induced Pyrop-Apoptosis in Endothelial Cells. *Circ Res* 118: 1525-39.

46. Yamada T, Wakabayashi M, Yamaji T, Chopra N, Mikami T, Miyashita H, Miyashita S. 2020. Value of leukocytosis and elevated C-reactive protein in predicting severe coronavirus 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *Clin Chim Acta* 509:235-243.
47. Yin M, Marrone L, Peace CG, O'Neil LAJ. 2023. NLRP3, the inflammasome and COVID-19 infection. *QJM* 116:502-507.
48. Zarichanski R, Houston DS. 2017. Assessing thrombocytopenia in the intensive care unit: the past, present and future. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2017:660-666.
49. Zeller T *et al.* 2015. Molecular characterization of the NLRC4 expression in relation to interleukin-18 levels. *Circ Cardiovasc Genet* 8:717-726.
50. Zhao Q, Meng M, Kumar R, Wu Y, Huang J, Deng Y, Weng Z, Yang L. 2020. Lymphopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A systemic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* 96:131-135.
51. Zhong J, Liu L, Lu Y, Gu Y, Zhao J, Chen B, Zhou W, Su X. 2022. NLRP3, NLRC4 and NLRC5 Gene Polymorphisms Associate with Susceptibility of Pulmonary Aspergillosis in Non-Neutropenic Patients. *J Clin Med* 11:1870.

6 CONCLUSÃO

Em relação à co-infecção HIV/*L. infantum* em indivíduos com COVID-19, os achados laboratoriais evidenciam marcadores importantes que podem ajudar a prever a gravidade da COVID-19 no contexto de coinfeções. É notável que os níveis de PCR, dímero D, ferritina, LDH, AST e ALT estiveram elevados, indicando a possibilidade de exacerbação da doença através de diversos mecanismos. No entanto, é necessária a realização de estudos caso-controle, que levem em consideração um tamanho amostral robusto, para a compreensão de possíveis biomarcadores da doença. Este é o primeiro relato de uma co-infecção envolvendo SARS-CoV-2 e infecções prévias por HIV e *L. infantum*.

Em relação ao estudo de associação genética, o SNP rs699-GG (*AGT*) foi associado a predisposição em desenvolver COVID-19 grave/crítica em comparação a desfechos leves/moderados. Além disso, recomenda-se que estudos futuros, envolvendo diferentes populações, sejam conduzidos a fim de compreender as diferentes frequências alélicas e genotípicas do rs699 (*AGT*), e como ocorre a sua interação com os diferentes desfechos da COVID-19. O entendimento dos mecanismos que regem a expressão de *AGT*, bem como a influência do SNP rs699 no contexto da COVID-19 pode elucidar mecanismos fisiopatológicos importantes e consequentemente revelar novas alternativas terapêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM; ABECASIS, G. R. *et al.* An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 56-65, 2012.

ABBASPOUR, N.; HURRELL, R.; KELISHADI, R. Review on iron and its importance for human health. **Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 19, n. 2, p. 164, 2014.

ABIKE, F. *et al.* Human papilloma virus persistence and neopterin, folate and homocysteine levels in cervical dysplasias. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 284, p. 209–214, 2011.

ABU EID, R. *et al.* Akt1 and -2 inhibition diminishes terminal differentiation and enhances central memory CD8(+) T-cell proliferation and survival. **Oncoimmunology**, v. 4, n. 5, p. e1005448, 2015.

ABUEID, R. *et al.* Enhanced therapeutic efficacy and memory of tumor-specific CD8 T cells by ex vivo PI3K-delta inhibition. **Cancer Research**, v. 77, n. 15, p. 4135-4145, 2017. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0267.

ABUEID, R. *et al.* Selective inhibition of regulatory T cells by targeting the PI3K-Akt pathway. **Cancer Immunology Research**, v. 2, n. 11, p. 1080-1089, 2014.

ABU-EID, R.; WARD, M. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: A therapeutic strategy in COVID-19 patients. **Immunology Letters**, v. 240, p. 1-8, 2021.

ADAMS, M. *et al.* Genetic analysis of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for myocardial infarction. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 89, n. 6, p. 437-444, 1996.

ALADAG, E. *et al.* Human ACE D/I Polymorphism Could Affect the Clinicobiological Course of COVID-19. **Journal of Renin Angiotensin Aldosterone System**, p. 1-7, 2021.

ALI, E. M. M. *et al.* Fat mass and obesity-associated (FTO) and leptin receptor (LEPR) gene polymorphisms in Egyptian obese subjects. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 127, n. 1, p. 28-36, fev. 2021.

ALQAHTANI, S.A.; BUTI, M. COVID-19 and hepatitis B infection. **Antivir. Ther.** v.25, p.389–397, 2020.

ANDREWS, S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. **Babraham Bioinformatics**, 2010.

ANGULO, I. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase delta gene mutation predisposes to respiratory infection and airway damage. **Science**, v. 342, n. 6160, p. 866-871, 2013.

ARRUDA, V. R. *et al.* Prevalence of the mutation C677T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. **American Journal of Medical Genetics**, v. 78, n. 4, p. 332-335, 1998.

ASSELTA, R.; PARABOSCHI, E.M.; MANTOVANI, A.; DUGA, S. ACE2 and TMPRSS2 variants and expression as candidates to sex and country differences in COVID-19 severity in Italy. **medRxiv** 2020.

ATLAS, S. A. The renin-angiotensin aldosterone system: Pathophysiological role and pharmacologic inhibition. **Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy**, v. 13, p. 9-20, 2007.

BADER, M. *et al.* Mas and its related G protein–coupled receptors, Mrgprs. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 4, p. 1080–1105, 1 out. 2014.

BAI, Y. *et al.* Presumed Asymptomatic Carrier Transmission of COVID-19. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v.323, n.14, p.1406-1407, 2020.

BARBERA, L. K. *et al.* HIV and COVID-19: review of clinical course and outcomes. **HIV research & clinical practice**, v. 22, n. 4, p. 102-118, 2021.

BAUER, R.; RAUCH, I. The NAIP/NLRC4 inflammasome in infection and pathology. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 76, p. 100863, 2020.

BAUMANN, H. *et al.* The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 8374-8378, 1996.

BEIERWALTES, W. H. The role of calcium in the regulation of renin secretion. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 298, p. F1-F11, 2010.

BELCASTRO, V. *et al.* Hyperhomocysteinemia recurrence in levodopa-treated Parkinson's disease patients. **European Journal of Neurology**, v. 17, n. 5, p. 661-665, 2010.

BELLOMO, R. *et al.* Angiotensin I and angiotensin II concentrations and their ratio in catecholamine-resistant vasodilatory shock. **Critical Care**, v. 24, p. 43, 2020.

BELOVA, L. A. Angiotensin II-generating enzymes. **Biochemistry**, v. 65, p. 1337-1345, 2000.

BOND, K. *et al.* Final Report Post-market validation of three serological assays for COVID-19. 2020.

BORAS, E. *et al.* Monomeric C-reactive protein and Notch-3 co-operatively increase angiogenesis through PI3K signalling pathway. **Cytokine**, v. 69, n. 2, p. 165-179, 2014.

BOULLE A. *et al.* Risk factors for COVID-19 death in a population cohort study from the Western Cape Province, South Africa. **Clin Infect Dis.** v.73, n.7, p.E2005-E2015, 2020.

BOWEN, D. J. *et al.* Factor V Leiden (G1691A), the prothrombin 3'-untranslated region variant (G20210A) and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase (C677T): a single genetic test genotypes all three loci – determination of frequencies in the S. Wales population of the UK. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 79, n. 5, p. 949-954, 1998.

BRAND, E. *et al.* Detection of putative functional angiotensinogen (AGT) gene variants controlling plasma AGT levels by combined segregation-linkage analysis. **European Journal of Human Genetics**, v. 10, n. 11, p. 715-723, 2002.

BRAUNSTEIN SL *et al.* Coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection among people with human immunodeficiency virus in new york city: a population-level analysis of linked surveillance data. **Clin Infect Dis.** v.72, n.12, p.e1021–e1029, 2021.

BYAMBASUREN, O. *et al.* Estimating the Extent of True Asymptomatic COVID-19 and Its Potential for Community Transmission: Systematic Review and Meta-Analysis. **SSRN Electronic Journal**, 2020.

CAFIERO, C. *et al.* Angiotensin system polymorphisms in SARS-CoV-2 positive patients: assessment between symptomatic and asymptomatic patients: a pilot study. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, v. 14, p. 621-629, 2021.

CARPENTER, L. R. *et al.* Enhancing leptin response by preventing SH2-containing phosphatase 2 interaction with Ob receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 6061-6066, 1998.

CARUBBI, F. *et al.* Ferritin is associated with the severity of lung involvement but not with worse prognosis in patients with COVID-19: data from two Italian COVID-19 units. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 4863, 2021.

CASADO, J. L. *et al.* Visceral leishmaniasis as an independent cause of high immune activation, T-cell senescence, and lack of immune recovery in virologically suppressed HIV-1-coinfected patients. **HIV medicine**, v. 16, n. 4, p. 240-248, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Clinical Presentation. 2024. Disponível em: <https://www.cdc.gov/covid/hcp/clinical-care/covid19-presentation.html>. Acesso em: 17 set. 2024b.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Symptom-based strategy to discontinue isolation for persons with COVID-19. website. Disponível em: <. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/community/strategy-discontinue-isolation.html>> Acesso em: 24 out 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Travelers health (COVID-19). 2024. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/infections-diseases/covid-19>. Acesso em: 17 set. 2024a.

CHAN, J. L. *et al.* Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and interventional studies in humans. **Diabetes**, v. 51, p. 2105-2112, 2002.

CHAPPELL, M. C. Biochemical evaluation of the renin-angiotensin system: the good, bad, and absolute? **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 310, p. H137-H152, 2016.

- CHEHAB, F. F.; LIM, M. E.; LU, R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. **Nature Genetics**, v. 12, p. 318-320, 1996.
- CHEN, H. *et al.* Associations of three well-characterized polymorphisms in the IL-6 and IL-10 genes with pneumonia: A meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1–6, 24 fev. 2015.
- CHEN, H. *et al.* Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. **The Lancet**, v. 395, n. 10226, p. 809–815, 7 mar. 2020.
- CHEN, H. *et al.* Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. **Cell**, v. 84, p. 491-495, 1996.
- CHEN, N. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507–513, 15 fev. 2020.
- CHOI, S. W.; MASON, J. B. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 129–132, 2000.
- CHONG, W. P. *et al.* The interferon gamma gene polymorphism +874 A/T is associated with severe acute respiratory syndrome. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 82, 4 maio 2006.
- CHU, D. K. *et al.* Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 395, n. 10242, p. 1973–1987, 2020.
- CHUA, S. C. Jr. *et al.* Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. **Genomics**, v. 45, p. 264-270, 1997.
- CLINCKEMALIE, L. *et al.* Androgen Regulation of the TMPRSS2 Gene and the Effect of a SNP in an Androgen Response Element. **Molecular Endocrinology**, v. 27, n. 12, p. 2028–2040, 1 dez. 2013.
- COLOMBA, C. *et al.* Leishmania infection in psoriasis. **Journal of Infection**, v. 80, n. 5, p. 578-606, 2020.
- COLOMBA, C. *et al.* Mucosal Relapse of Visceral Leishmaniasis in a Child with SARS-CoV-2 Infection. **Pathogens**, v. 12, n. 9, p. 1127, 2023.
- COLOMBA, C. *et al.* Third case of visceral Leishmaniasis in COVID-19: mini review article. **Pathogens**, v. 11, n. 8, p. 913, 2022.
- CORVOL, P.; JEUNEMAITRE, X. Molecular genetics of human hypertension: role of angiotensinogen. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 5, p. 662-677, 1997.
- COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, p. 2959-2963, 2008.

- CUI, X. *et al.* Analysis of MTHFR, CBS, Glutathione, Taurine, and Hydrogen Sulfide Levels in Retinas of Hyperhomocysteinemic Mice. **Investigative of Ophthalmology & Visual Science**, v. 58, p. 1958-1963, 2017.
- CUADRADO-PAYÁN E. *et al.* SARS-CoV2 and influenza virus co-infection. **Lancet**. v.395, p. e84, 2020.
- CUSATO, J. *et al.* COVID-19: A possible contribution of the MAPK pathway. **Biomedicines**, v. 11, n. 5, p. 1459, 2023.
- DAGHESTANI, M. *et al.* Molecular dynamic (MD) studies on Gln233Arg (rs1137101) polymorphism of leptin receptor gene and associated variations in the anthropometric and metabolic profiles of Saudi women. **PLoS One**, v. 14, n. 2, p. e0211381, 14 fev. 2019.
- DANECEK, P. *et al.* The variant call format and VCFtools. **Bioinformatics**, v. 27, n. 15, p. 2156–2158, ago. 2011.
- DASHRAATH, P. *et al.* Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic and pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 222, n. 6, p. 521–531, 1 jun. 2020.
- DA SILVA, S. J. R. *et al.* Clinical and Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2, the Virus Causing COVID-19. **ACS Infectious Diseases**. v.6, n.9, p.2319-2336, 2020.
- DE JONGE, L. *et al.* Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 113, p. 2284-2289, 2009.
- DE LUCA, C. *et al.* Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific LEPR-B transgenes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 3484-3493, 2005.
- DE MELLO, W. C. Local Renin Angiotensin Aldosterone Systems and Cardiovascular Diseases. **Medical Clinics of North America**, v. 101, p. 117-127, 2017.
- DEMINICE, R. *et al.* Plasma homocysteine levels in HIV-infected men with and without lipodystrophy. **Nutrition**, v. 29, n. 11–12, p. 1326–1330, 2013.
- DE SÁ, R. *et al.* Inflammasome genetic variants are associated with tuberculosis, HIV-1 infection, and TB/HIV-immune reconstitution inflammatory syndrome outcomes. **Journal of Infectious Diseases**, 2022.
- DESCHEPPER, C. F. Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. **Kidney International**, v. 46, p. 1561-1563, 1994.
- DIAO, B. *et al.* Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease (COVID-19). **medRxiv**, 2020.
- DILLEY, A. *et al.* Relation of three genetic traits to venous thrombosis in an African-American population. **American Journal of Epidemiology**, v. 147, n. 1, p. 30-35, 1998.

- DI SPIEZIO, A. *et al.* The Lepr-mediated leptin transport across brain barriers controls food reward. **Molecular Metabolism**, v. 8, p. 13-22, 2018.
- DOCHERTY, A. B. *et al.* Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: Prospective observational cohort study. **The BMJ**, v. 369, 2020.
- DONG, E.; DU, H.; GARDNER, L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. **The Lancet Infect Dis.** v.20, n.5, p.533-534, 2020.
- DUAN, C.; LI, M.; RUI, L. SH2-B promotes insulin receptor substrate 1 (IRS1)- and IRS2-mediated activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in response to leptin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 43684-43691, 2004.
- DUARTE, S. F. *et al.* p.Q223R leptin receptor polymorphism associated with obesity in Brazilian multiethnic subjects. **American Journal of Human Biology**, v. 18, n. 4, p. 448-453, 2006.
- DUJARDIN, A. *et al.* Case report: leishmania and HIV co-diagnosis: how to understand medical history?. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 669723, 2021.
- DUNN, S. L. *et al.* Feedback inhibition of leptin receptor/Jak2 signaling via Tyr1138 of the leptin receptor and suppressor of cytokine signaling 3. **Molecular Endocrinology**, v. 19, p. 925-938, 2005.
- DURAND, P. *et al.* Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. **Laboratory Investigation**, v. 81, p. 645–672, 2001.
- ELLINGHAUS, D. *et al.* Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. **The New England journal of medicine**, 2020.
- FARIAS, P. C. S. *et al.* Severe COVID-19 in HIV/*Leishmania infantum* coinfecting patient: a successfully managed case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 24, p. 854, 2024.
- FARINACCI, D. *et al.* People living with HIV in the COVID-19 era: a case report. **AIDS research and human retroviruses**, v. 37, n. 4, p. 253-254, 2021.
- FAVI, E. *et al.* Epidemiology, clinical characteristics, diagnostic work up, and treatment options of leishmania infection in kidney transplant recipients: a systematic review. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 10, p. 258, 2022.
- FEEHAN, J.; APOSTOLOPOULOS, V. Is COVID-19 the worst pandemic? **Maturitas**, v. 149, p. 56-58, 2021. DOI: 10.1016/j.maturitas.2021.02.001.
- FOLEY, A.; STEINBERG, B. E.; GOLDENBERG, N. M. Inflammasome activation in pulmonary arterial hypertension. **Frontiers in Medicine**, v. 8, p. 826557, 2022.
- FONG, T. M. *et al.* Localization of leptin binding domain in the leptin receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 53, p. 234-240, 1998.

FRANCHINI, M. *et al.* ABO blood group and von Willebrand factor: Biological implications. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v.52, n.9, p.1273-1276, 2014.

GARAZZINO, S. *et al.* Epidemiology, clinical features and prognostic factors of pediatric SARS-CoV-2 infection: Results from an Italian multicenter study. **Front. Pediatr.** v.9, p.649358, 2021.

GARG, S. *et al.* Hospitalization Rates and Characteristics of Patients Hospitalized with Laboratory-Confirmed Coronavirus Disease 2019 — COVID-NET, 14 States, March 1–30, 2020. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 69, n. 15, p. 458–464, 17 abr. 2020.

GIANNINI, E. *et al.* Leptin levels in nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. **Hepatogastroenterology**, v. 46, p. 2422-2425, 1999.

GIRI, A. *et al.* Trans-ethnic association study of blood pressure determinants in over 750,000 individuals. **Nature Genetics**, v. 51, n. 1, p. 51-62, 2019.

GOEL, S. *et al.* SARS-CoV-2 switches ‘on’ MAPK and NFkappaB signaling via the reduction of nuclear DUSP1 and DUSP5 expression. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 631879, 2021.

GOTO, H.; PRIANTI, M. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 241-246, 2009.

GOYETTE, P. *et al.* Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). **Nature Genetics**, v. 9, p. 652-656, 1998.

GRAHAM, I. M. *et al.* Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project. **JAMA**, v. 277, n. 22, p. 1775–1781, 1997.

GRASSELLI, G. *et al.* Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected with SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 16, p. 1574–1581, 28 abr. 2020.

GRESNIGT, M. S. *et al.* Genetic deficiency of NOD2 confers resistance to invasive aspergillosis. **Nature Communications**, v. 9, p. 2636, 2018.

GUAN, W.J. *et al.* China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. **N Engl J Med**. v.382, n.18, p.1708-1720, 2020.

GUEDES, D. L. *et al.* Visceral leishmaniasis in hospitalized HIV-infected patients in Pernambuco, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 6, p. 1541, 2018.

GUO, L. *et al.* Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 778–785, 2020.

GUO, Y. H. *et al.* Diet-induced hyperhomocysteinemia exacerbates vascular reverse remodeling of balloon-injured arteries in rat. **Chinese Medical Journal**, v. 121, n. 22, p. 2265–2271, 2008.

HADI, Y. *et al.* Characteristics and outcomes of COVID-19 in patients with HIV: a multicentre research network study. **Aids**, v. 34, n. 13, p. F3-F8, 2020.

HAN J, GATHERAL T, WILLIAMS C. Procalcitonin for patients stratification and identification of bacterial co-infection in COVID-19. **Clin Med (Lond)**. v.20, n.3, p.e47, 2020.

HAN, H. *et al.* Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. **Emerging Microbes & Infections**. v.9, p.1123-1130, 2020.

HAN, Y. *et al.* Lactate dehydrogenase, an independent risk factor of severe COVID-19 patients: a retrospective and observational study. **Aging (Albany NY)**, v. 12, n. 12, p. 11245, 2020.

HEIL, M. *et al.* Is mutated serine hydroxymethyltransferase (SHMT) involved in the etiology of neural tube defects? **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 73, p. 164-172, 2001.

HE, J. Q. *et al.* Associations of IL6 polymorphisms with lung function decline and COPD. **Thorax**, v. 64, n. 8, p. 698–704, 1 ago. 2009.

HE, X. *et al.* Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 5, p. 672–675, 1 maio 2020.

HELMS, J. *et al.* Neurologic Features in Severe SARS-CoV-2 Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 23, p. 2268–2270, 4 jun. 2020.

HENDREN, N. S. *et al.* Description and Proposed Management of the Acute COVID-19 Cardiovascular Syndrome. **Circulation**, v. 141, n. 23, p. 1903–1914, 9 jun. 2020.

HEURICH, A. *et al.* TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. **J Virol**. 2014;88(2):1293–307.

HOFFMANN, 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, n. 2, p. 271- 280.e8, 2020.

HOROWITZ, R. I.; FREEMAN, P. R.; BRUZZESE, J. Efficacy of glutathione therapy in relieving dyspnea associated with COVID-19 pneumonia: a report of 2 cases. **Respiratory Medicine Case Reports**, v. 30, p. 101063, 2020.

HORRILLO, L. *et al.* Clinical aspects of visceral leishmaniasis caused by *L. infantum* in adults. Ten years of experience of the largest outbreak in Europe: what have we learned?. **Parasites & vectors**, v. 12, p. 1-11, 2019.

HOU, Y. *et al.* New insights into genetic susceptibility of COVID-19: An ACE2 and TMPRSS2 polymorphism analysis. **BMC Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–8, 2020.

HUANG, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 15 fev. 2020.

HUANG, L.; WANG, Z.; LI, C. Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 6343-6349, 2001.

HUSTAD, S. S. J.; UELAND, P. M. Riboflavin and methylenetetrahydrofolate reductase. In: MADAME CURIE BIOSCIENCE DATABASE [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience, 2000-2013. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6527/>.

IANNITTI, R. G. *et al.* IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent inflammation in murine and human cystic fibrosis. **Nature Communications**, v. 7, p. 10791, 2016.

IBRAHIMAGIC, O. *et al.* Hyperhomocysteinemia and its treatment in patients with Parkinson's disease. **Materia Socio-Medica**, v. 28, n. 4, p. 303-306, 2016.

ITO, S.; HARA, Y.; KUBOTA, T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 1, p. R52, 2014.

JAKUBOWSKI, H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 6, p. 1741–1749, 2006.

JOSHI, N.; FASS, J. sickle - A windowed adaptive trimming tool for FASTQ files using quality. (Version 1.33), 2011.

KAIIVOLA, J.; NYMAN, T. A.; MATIKAINEN, S. Inflammasomes and SARS-CoV-2 infection. **Viruses**, v. 13, n. 12, p. 2513, 2021.

KEIDAR, S.; KAPLAN, M.; GAMLIEL-LAZAROVICH, A. ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1-7). **Cardiovascular Research**, v.73, n.3, p.463-469, 2007.

KANTZANO, M. *et al.* Prevalence of visceral leishmaniasis among people with HIV: A systematic review and meta-analysis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 42, n. 1, p. 1-12, 2023.

KARST, M.; HOLLENHORST, J.; ACHENBACH, J. Life-threatening course in coronavirus disease 2019 (COVID-19): is there a link to methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism and hyperhomocysteinemia? **Medical Hypotheses**, v. 144, p. 110234, 2020.

KESKIN, O. *et al.* Homocysteine as a marker for predicting disease severity in patients with COVID-19. **Biomarkers in Medicine**, v. 16, n. 7, p. 559-568, 2022.

KIM, J. *et al.* Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance. **Archives of Pharmacal Research**, v. 41, p. 372-383, 2018.

KISHORE, R. *et al.* COVID-19: Possible cause of Induction of relapse of Plasmodium vivax infection. **Indian J. Pediatr.** v.87, p.751–752, 2020.

KLOK, F. A. *et al.* Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. **Thrombosis Research**, v. 191, p. 145–147, 1 jul. 2020.

KREITMANN L *et al.* Early bacterial co-infection in ARDS related to COVID-19. **Intensive Care Med.** v.46, n.9, p.1787–9, 2020.

KRON, K.J *et al.* TMPRSS2-ERG fusion co-opts master transcription factors and activates NOTCH signaling in primary prostate cancer. **Nature Genetics**, v.49, p. 1336–1345, 2017.

KUBA, K. *et al.* A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. **Nature Medicine**, v. 11, n. 8, p. 875–879, 10 ago. 2005.

KUCIRKA, L. M. *et al.* Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. **Annals of internal medicine**. v.173, n.4, p.262-267, 2020.

LACASAÑA, M. *et al.* Effect on risk of anencephaly of gene–nutrient interactions between methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and maternal folate, vitamin B12 and homocysteine profile. **Public Health Nutrition**, v. 15, p. 1419-1428, 2012.

LAI, C. C. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.55, n.3, p.105924, 2020.

LAKSHMI, A. V.; RAMALAKSHMI, B. A. Effect of pyridoxine or riboflavin supplementation on plasma homocysteine levels in women with oral lesions. **National Medical Journal of India**, v. 11, p. 171-172, 1998.

LALONDE, E.; *et al.* RNA sequencing reveals the role of splicing polymorphisms in regulating human gene expression. **Genome Research**, v. 21, n. 4, p. 545-554, 2011.

LAM, Q. L.; LU, L. Role of leptin in immunity. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 4, p. 1-13, 2007.

LAMBERT, D. W. *et al.* Calmodulin interacts with angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) and inhibits shedding of its ectodomain. **FEBS Letters**, v. 582, n. 2, p. 385–390, 23 jan. 2008.

LAMBERT, D. W. *et al.* Tumor necrosis factor- α convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 34, p. 30113–30119, 26 ago. 2005.

LAUER, S. *et al.* The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. **Ann Int Med.** v.172, n.9, p.577-582, 2020.

LEAL, C. *et al.* A common variant close to the “tripwire” linker region of NLRP1 contributes to severe COVID-19. **Inflammation research**, v.72, n.10-11, p.1933-1940, 2022.

LE BALC'H, P *et al.* Herpes simplex virus and cytomegalovirus reactivations among severe COVID-19 patients. **Crit. Care**. v.24, n.530, p.1-3, 2020.

LECHIEN, J. R. *et al.* Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 277, p. 13, 2020.

LEE, P. H.; SHATKAY, H. F-SNP: computationally predicted functional SNPs for disease association studies. **Nucleic Acids Research**, v. 36, suppl. 1, p. D820-D824, 2008.

LEVI, M. *et al.* Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. **The Lancet Haematology**, v.7, n.6, p.438-440, 1 jun. 2020.

LI, C. *et al.* Elevated lactate dehydrogenase (LDH) level as an independent risk factor for the severity and mortality of COVID-19. **Aging (Albany NY)**, v. 12, n. 15, p. 15670, 2020.

LI, C.; FRIEDMAN, J. M. Leptin receptor activation of SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 modulates Ob receptor signal transduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 9677-9682, 1999.

LIEW, S. C.; GUPTA, S. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases. **European Journal of Medical Genetics**, v. 58, p. 1-10, 2014.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 26, n. 5, p. 589–595, 15 jan. 2010.

LIN, C. S.; PAN, C. H. Regulatory mechanisms of atrial fibrotic remodeling in atrial fibrillation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.65, n.10, p.1489-1508, 2008.

LINO, K. *et al.* Serum ferritin at admission in hospitalized COVID-19 patients as a predictor of mortality. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, p. 101569, 2021.

LI, S.; *et al.* SARS-CoV-2 triggers inflammatory responses and cell death through caspase-8 activation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 235, 2020.

LINNIK, J. E.; EGLI, A. Impact of host genetic polymorphisms on vaccine induced antibody response. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**. v.12, n.4, p.907-915, 2020.

LIU, C. *et al.* Meta-analysis identifies common and rare variants influencing blood pressure and overlapping with metabolic trait loci. **Nature Genetics**, v. 48, n. 10, p. 1162-1170, 2016.

LOKTIONOV, A. V. *et al.* GWAS-significant loci and severe COVID-19: analysis of associations, link with thromboinflammation syndrome, gene-gene, and gene-environmental interactions. **Frontiers in Genetics**, v. 15, p. 1434681, 2024.

LONG, B. *et al.* Cardiovascular complications in COVID-19. **American Journal of Emergency Medicine**, v.38, n.7, p.1504-1507, 1 jul. 2020.

LOTT, N. *et al.* Sex hormones in SARS-CoV-2 susceptibility: key players or confounders? **Nature Reviews Endocrinology**, v. 19, p. 217-231, 2023.

LU, H. *et al.* Structure and functions of angiotensinogen. **Hypertension Research**, v. 39, p. 492, 2016.

LUCAS, C. L. *et al.* Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3)K catalytic subunit p110delta result in T cell senescence and human immunodeficiency. **Nature Immunology**, v. 15, n. 1, p. 88-97, 2014.

LUND, I. K. *et al.* Mechanism of protein tyrosine phosphatase 1B-mediated inhibition of leptin signalling. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, p. 339-351, 2005.

MACDOUGALD, O. A. *et al.* Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 9034-9037, 1995.

MACIVER, N. J. *et al.* Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, p. 949-957, 2008.

MADGE, S *et al.* Descriptive account of 18 adults with known HIV infection hospitalised with SARS-CoV-2 infection. **Sexually Transmitted Infections**, v. 97, n. 5, p. 392-393, 2021.

MAGRO, C.; *et al.* Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: a report of five cases. **Translational Research**, v. 220, p. 1-13, 2020.

MAO, R. *et al.* Manifestations and prognosis of gastrointestinal and liver involvement in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, n. 7, p. 667–678, 2020.

MAREI, Y. E. S. *et al.* The Relation between ACE Gene Polymorphism and the Severity of COVID-19 Infection. **International Journal of Microbiology**, p. 1-7, 2023.

MARKUS, H. S. *et al.* A common polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene, homocysteine, and ischemic cerebrovascular disease. **Stroke**, v. 28, n. 9, p. 1739-1743, 1997.

MARTENS, N. *et al.* Suppressor of cytokine signaling 7 inhibits prolactin, growth hormone, and leptin signaling by interacting with STAT5 or STAT3 and attenuating their nuclear translocation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 13817-13823, 2005.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, 2011.

MARTINEZ-OCAÑA, J. *et al.* Plasma cytokine levels and cytokine gene polymorphisms in Mexican patients during the influenza pandemic A(H1N1)pdm09. **Journal of Clinical Virology**, v. 58, n. 1, p. 108–113, 1 set. 2013.

MARTINS, L. P. A. *et al.* Severe visceral leishmaniasis and COVID-19 coinfection in an immunosuppressed patient. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 64, p. e21, 2022.

MARTYNIK, A.; TOMASIK, J. A new perspective on the renin-angiotensin system. **Diagnostics (Basel)**, v.13, n. 1, p. 16, 2022.

MASIÁ, M. *et al.* Oxidative stress predicts all-cause mortality in HIV-infected patients. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153456, 2016.

MCCULLY, K. S. Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, p. 1563S-1568S, 2007.

MCNULTY, H. *et al.* Riboflavin lowers homocysteine in individuals homozygous for the MTHFR 677C->T polymorphism. **Circulation**, v. 113, p. 74-80, 2006.

MEHRA, M. R. *et al.* Cardiovascular disease, drug therapy, and mortality in COVID-19. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 25, p. E102, 2020.

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

MIDDELDORP, S. *et al.* Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 8, p. 1995–2002, 1 ago. 2020.

MOHAMED, A. A. *et al.* The impact of LEP rs7799039 polymorphism and obesity on the severity of coronavirus disease-19. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity**, v. 16, p. 515-522, 2023.

MOUHOUB, B. *et al.* Visceral leishmaniasis associated with macrophage activation syndrome: Case report and literature review. **IDCases**, v. 26, p. e01247, 2021.

MORAES, P. L. *et al.* Cardiovascular effects of small peptides of the renin angiotensin system. **Physiological Reports**, v. 5, p. e13505, 2017.

MORETTI, R. Homocysteine: new aspects of an ancient enigma. **Cardiology**, v. 144, p. 36-39, 2019.

MURRAY, G. P.; POST, S. R.; POST, G. R. ABO blood group is a determinant of von Willebrand factor protein levels in human pulmonary endothelial cells. **Journal of Clinical Pathology**, v. 73, n. 6, p. 347–349, 1 jun. 2020.

MYERS, L. C. *et al.* Characteristics of Hospitalized Adults with COVID-19 in an Integrated Health Care System in California. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v.323, n.21, p.2195-2198, 2 jun. 2020.

NANJAPPA, V. *et al.* A comprehensive curated reaction map of leptin signaling pathway. **Journal of Proteomics & Bioinformatics**, v. 4, p. 184-189, 2011.

NATIONAL HEALTH COMMISSION OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA. Disponível em: <<http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqtb/202002/67e6c59a84bd4f07b6ca4a4c5ffabb79.shtml>> Acesso em: 20 out 2020.

NATTERMANN, J. *et al.* Effect of the interleukin-6 C174G gene polymorphism on treatment of acute and chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus coinfecting patients. **Hepatology**, v. 46, n. 4, p. 1016–1025, 1 out. 2007.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. LEPR leptin receptor [Homo sapiens (human)]. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3953>. Acesso em: 12 mar. 2024.

NEIRA-GOULART, M. *et al.* Inflammasome genes polymorphisms are associated with progression to mechanical ventilation and death in a cohort of hospitalized COVID-19 patients in a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Gene**, v. 865, p. 147325, 2023.

NIETO-TORRES, J. L.; *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. **Virology**, v. 485, p. 330-339, 2015.

NOR RASHID, N. *et al.* Angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) downregulation during coronavirus infection. **Molecular Biotechnology**, p. 1-13, 2024.

NOVAKOVIC, B. *et al.* Effects of folate deficiency on gene expression in the apoptosis and cancer pathways in colon cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 27, p. 916-924, 2006.

OKWOR, I.; UZONNA, J. E. The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. **Immunologic research**, v. 56, p. 163-171, 2013.

OLIVEIRA, E. *et al.* Homocysteine-lowering exercise effect is greater in hyperhomocysteinemic people living with HIV: a randomized clinical trial. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 44, n. 11, p. 10–20, 2023.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Transmissão do SARS-CoV-2: implicações para as precauções de prevenção de infecção. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52472/OPASWBACOV-1920089_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 24 out. 2020.

PANIRI, A., HOSSEINI, M. M., & AKHAVAN-NIAKI, H. (2020). First comprehensive computational analysis of functional consequences of TMPRSS2 SNPs in susceptibility to SARS-CoV-2 among different populations. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**(just-accepted), 1-18. doi.org/10.1080/07391102.2020.1767690.

PASTOR, A. F. *et al.* Human Polymorphisms and Computational Intelligence Approach Revealed a Complex Genomic Signature for COVID-19 Severity in Brazilian Patients. **Viruses**, v. 15, p. 1-15, 2023.

- PATRA, T. *et al.* SARS-CoV-2 spike protein promotes IL-6 trans-signaling by activation of angiotensin II receptor signaling in epithelial cells. **PLoS Pathogens**, v. 16, p. e1009128, 2020.
- PEELMAN, F. *et al.* Mapping of the leptin binding sites and design of a leptin antagonist. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 39, p. 41038-41046, 2004.
- PEPE, G. *et al.* Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. **American Journal of Human Genetics**, v. 63, n. 3, p. 917-920, 1998.
- PINHEIRO, D. S. *et al.* The combination of ACE I/D and ACE2 G8790A polymorphisms reveals susceptibility to hypertension: A genetic association study in Brazilian patients. **PLOS ONE**, v. 14, n. 8, p. e0221248, 20 ago. 2019.
- PLANÈS, R.; *et al.* Human NLRP1 is a sensor of pathogenic coronavirus 3CL proteases in lung epithelial cells. **Molecular Cell**, v. 82, n. 13, p. 2385-2400.e9, 2022.
- PONTI, G. *et al.* COVID-19 spreading across the world correlates with C677T allele of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene prevalence. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 35, p. e23798, 2021.
- QUEIROZ, G. *et al.* New variants in NLRP3 inflammasome genes increase risk for asthma and *Blomia tropicalis*-induced allergy in a Brazilian population. **Cytokine: X**, v. 2, n. 3, p. 100032, 2020.
- RAMACHANDRAN, S. V. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. **Circulation**, v. 113, p. 2335–2362, 2006.
- RICHARDSON, S. *et al.* Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. **JAMA**, v. 323, n. 20, p. 2052, 26 maio 2020.
- RIERA, A. *et al.* Prevalence of high serum and red cell ferritin levels in HIV-infected patients. **Haematologica**, v. 79, n. 2, p. 165-167, 1994.
- ROBLIN, X. *et al.* Steatosis, chronic hepatitis virus C infection and homocysteine. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, v. 31, n. 4, p. 415–420, 2007.
- RODRIGUES, T. S. *et al.* Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 3, p. e20201707, 2020.
- RODRIGUEZ-MORALES, A. J. *et al.* Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. **Travel Medicine and Infectious Disease**. v.34, p.1-13, 2020.
- ROONEY, M. The interaction of B-vitamins with MTHFR genotype concerning blood pressure and vascular health. 2020. Doctoral dissertation, Ulster University, 2020.

ROZEN, R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). **Thrombosis and Haemostasis**, v. 78, n. 1, p. 523-526, 1997.

SAKKAS, L. I. *et al.* Immunological features of visceral leishmaniasis may mimic systemic lupus erythematosus. **Clinical biochemistry**, v. 41, n. 1-2, p. 65-68, 2008.

SANDERS, J. M. *et al.* Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 18, p. 1824–1836, 2020.

SANTOS, R. A. S. *et al.* Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8258–8263, 8 jul. 2003.

SCHIRCH, L.; PETERSON, D. Purification and properties of mitochondrial serine hydroxymethyltransferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, p. 7801–7806, 1980.

SCHRIEFER, A.; WILSON, M. E.; CARVALHO, E. M. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 21, n. 5, p. 483-488, 2008.

SCIALO, F. *et al.* ACE2: the major cell entry receptor for SARS-CoV-2. **Lung**, v. 198, p. 867-877, 2020.

SELHUB, J. Homocysteine metabolism. **Annual Review of Nutrition**, v. 19, p. 217-246, 1999.

SETHI, A. A.; NORDESTGAARD, B. G.; TYBJÆRG-HANSEN, A. Angiotensinogen gene polymorphism, plasma angiotensinogen, and risk of hypertension and ischemic heart disease: a meta-analysis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 7, p. 1269-1275, 2003.

SETHURAMAN, N.; JEREMIAH, S. S.; RYO, A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. **JAMA - Journal of the American Medical Association**. v.323, n.22, p.2249-2251, 2020.

SHAH, S. *et al.* Association of HIV, hepatitis C virus and liver fibrosis severity with interleukin-6 and C-reactive protein levels. **Aids**, v. 29, n. 11, p. 1325-1333, 2015.

SHANE, B. Folylpolyglutamate synthesis and role in the regulation of one-carbon metabolism. **Vitamins & Hormones**, v. 45, p. 263–335, 1989.

SHAROV, KS. HIV/SARS-CoV-2 co-infection: T cell profile, cytokine dynamics and role of exhausted lymphocytes. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 102, p. 163-169, 2021.

SHAW, G. M. *et al.* 118 SNPs of folate-related genes and risks of spina bifida and conotruncal heart defects. **BMC Medical Genetics**, v. 10, p. 2009.

SHI, H. *et al.* Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 4, p. 425–434, 2020.

SHI, M. *et al.* Genotype frequencies and linkage disequilibrium in the CEPH human diversity panel for variants in folate pathway genes MTHFR, MTHFD, MTRR, RFC1, and GCP2. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 67, n. 8, p. 545–549, 2003.

SHIMIZU, M. Clinical Features of Cytokine Storm Syndrome. **Cytokine Storm Syndrome**. p. 31–41. 2019.

SINGH, Y. *et al.* RAAS blockers in hypertension posing a higher risk toward the COVID-19. **Dermatology Therapy**, v.33, n.4, p. e13501, 2020.

SIU, K. L.; *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF3a protein activates the NLRP3 inflammasome by promoting TRAF3-dependent ubiquitination of ASC. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 8, p. 8865, 2019.

SMITH, N. L. *et al.* Genetic predictors of fibrin d-dimer levels in healthy adults. **Circulation**, v. 123, n. 17, p. 1864–1872, 3 maio 2011.

SMITS, S. L. *et al.* Exacerbated innate host response to SARS-CoV in aged non-human primates. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 2, p. e1000756, 2010.

SOLÉ-VIOLÁN, J. *et al.* Genetic variability in the severity and outcome of community-acquired pneumonia. **Respiratory Medicine**, v. 104, n. 3, p. 440–447, 1 mar. 2010.

SOLINSKI, H. J.; GUDERMANN, T.; BREIT, A. Pharmacology and signaling of MAS-related G protein-coupled receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 3, p. 570–597, 1 jul. 2014.

SPINATO, G. *et al.* Alterations in Smell or Taste in Mildly Symptomatic Outpatients with SARS-CoV-2 Infection. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 20, p. 2089–2090, 2020.

SQUILLACE, N *et al.* HIV and SARS-CoV-2 Co-Infection: What are the Risks? **Infection and Drug Resistance**. v.14, p.3991–4014, 2021.

STEBBENS, W. E. Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 77, n. 2, p. 121–132, 2004.

STEVENSON, R. E. *et al.* Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies between Whites and Blacks. **American Journal of Human Genetics**, v. 60, n. 1, p. 229–230, 1997.

SUN, J. *et al.* Prolonged persistence of SARS-CoV-2 RNA in body fluids. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 8, p. 1834–1838, 1 ago. 2020.

SUNGNACK, W. *et al.* SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. **Nature medicine**. v. 26, p.681–695, 2020.

- SUTTERWALA, F. S.; HAASKEN, S.; CASSEL, S. L. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1319, n. 1, p. 82-95, 2014.
- TAN, C. *et al.* C-reactive protein correlates with computed tomographic findings and predicts severe COVID-19 early. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 7, p. 856-862, 2020.
- TANG, N. *et al.* Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 4, p. 844–847, 2020.
- TANG, Y. *et al.* Association of LEPR gene polymorphisms with the risk of hepatitis B virus-related liver disease in Guangxi Chinese: a case-control study. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 84, p. 104366, 2020.
- TARTAGLIA, L. A. *et al.* Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, n. 7, p. 1263-1271, 1995.
- THACHIL, J. *et al.* ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 5, p. 1023–1026, 1 maio 2020.
- THOMPSON, M. R. *et al.* Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection. **Viruses**, v. 3, n. 6, p. 920–940, 23 jun. 2011.
- TIAN, D.; YE, Q. Hepatic complications of COVID-19 and its treatment. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 10, p. 1818-1824, 2020.
- TOLOMEO, M. *et al.* Good's syndrome and recurrent leishmaniasis: A case report and review of literature. **Heliyon**, v. 6, n. 9, 2020.
- TSUKALOV, I.; *et al.* NFκB and NLRP3/NLRC4 inflammasomes regulate differentiation, activation and functional properties of monocytes in response to distinct SARS-CoV-2 proteins. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 2100, 2024.
- VAN DOREMALEN, N. *et al.* Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. **New England Journal of Medicine**. Massachusetts Medical Society, , 16 abr. 2020. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc2004973>>. Acesso em: 24 out. 2020
- VASSEUR, E. *et al.* The evolutionary landscape of cytosolic microbial sensors in humans. **American Journal of Human Genetics**, v. 91, p. 27-37, 2012.
- VIANA, L. *et al.* Combined diagnostic methods identify a remarkable proportion of asymptomatic Leishmania (Leishmania) chagasi carriers who present modulated cytokine profiles. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 6, p. 548-555, 2008.

- WANG, M. *et al.* One case of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in a patient co-infected by HIV with a low CD4⁺ T-cell count. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 96, p. 148-150, 2020.
- WAN, S. *et al.* Clinical Features and Treatment of COVID-19 Patients in Northeast Chongqing. **Journal of Medical Virology**, v.92, n.7, p.797-806, 2020.
- WANG, Q. *et al.* Pattern of liver injury in adult patients with COVID-19: a retrospective analysis of 105 patients. **Military Medical Research**, v. 7, p. 1-8, 2020.
- WANG, W. *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. **JAMA - Journal of the American Medical Association**. v.323, n.18, p.1843-1844, 2020.
- WANG, Z.; *et al.* Clinical features of 69 cases with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 769-777, 2020.
- WEI, W. E. *et al.* Presymptomatic Transmission of SARS-CoV-2 — Singapore, January 23–March 16, 2020. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 69, n. 14, p. 411–415, 10 abr. 2020.
- WEIN, A. N. *et al.* CXCR6 regulates localization of tissue-resident memory CD8 T cells to the airways. **Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 12, p. 2748–2762, 1 dez. 2019.
- WIECH, M. *et al.* Remodeling of T cell dynamics during long COVID is dependent on severity of SARS-CoV-2 infection. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 886431, 2022.
- WIERSINGA, W. J. *et al.* Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 324, n. 8, p. 782–793, 2020.
- WILLIAMS, E. *et al.* Saliva as a non-invasive specimen for detection of SARS-CoV-2. **Journal of Clinical Microbiology**, p.1-5, 2020.
- WÖLFEL, R. *et al.* Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. **Nature**, v. 581, n. 7809, p. 465–469, 28 maio 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance factsheet. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 17 set. 2024c.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. 2024. Disponível em: <https://www.who.int/europe/emergencies/situations/covid-19>. Acesso em: 17 set. 2024a.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO COVID-19 dashboard. 2024. Disponível em: <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?n=o>. Acesso em: 17 set. 2024b.
- WU, C. *et al.* Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA Internal Medicine**, v. 180, n. 7, p. 934, 2020.

WU, D. *et al.* The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. **Int J Infect Dis**, v.94, p.44-48, 2020.

WU, Y.-H. *et al.* The ACE2 G8790A Polymorphism: Involvement in Type 2 Diabetes Mellitus Combined with Cerebral Stroke. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 31, n. 2, p. e22033, 1 mar. 2017.

XI, H.; *et al.* Caspase-1 inflammasome activation mediates homocysteine-induced pyroptosis in endothelial cells. **Circulation Research**, v. 118, n. 10, p. 1525-1539, 2016.

XIA, W. *et al.* Clinical and CT features in pediatric patients with COVID-19 infection: Different points from adults. **Pediatric Pulmonology**, v. 55, n. 5, p. 1169-1174, maio 2020.

XU, Y.; RONG, J.; ZHANG, Z. The emerging role of angiotensinogen in cardiovascular diseases. **Journal of Cellular Physiology**, v. 236, n. 1, p. 68-78, 2021.

YAFEI, W. *et al.* Is the prevalence of MTHFR C677T polymorphism associated with ultraviolet radiation in Eurasia? **Journal of Human Genetics**, v. 57, p. 780-786, 2012.

YALCINDAG, F. N. *et al.* Serum leptin levels in patients with ocular and nonocular Behcet's disease. **Mediators of Inflammation**, v. 2007, p. 31986, 2007.

YANBAEVA, D. G. *et al.* IL6 and CRP haplotypes are associated with COPD risk and systemic inflammation: A case-control study. **BMC Medical Genetics**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 9 mar. 2009.

YANG, X. *et al.* Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 5, p. 475–481, 1 maio 2020.

YANG, Z. *et al.* Predictors for imaging progression on chest CT from coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients. **Aging**, v. 12, n. 7, p. 6037–6048, 2020.

YIANNAKOURIS, N. *et al.* The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage of body weight and body composition variability. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 9, p. 4434-4439, 2001.

YIANNIKOURIS, F. *et al.* Adipocyte-specific deficiency of angiotensinogen decreases plasma angiotensinogen concentration and systolic blood pressure in mice. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n.2, p. R244-R251, 2012.

YU, P. *et al.* Association of NLRP1 and NLRP3 polymorphisms with psoriasis vulgaris risk in the Chinese Han population. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 4714836, 2018.

YUE, Y.; *et al.* SARS-Coronavirus Open Reading Frame-3a drives multimodal necrotic cell death. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 9, p. 904, 2018.

ZENG, L. *et al.* Neonatal Early-Onset Infection with SARS-CoV-2 in 33 Neonates Born to Mothers with COVID-19 in Wuhan, China. **JAMA Pediatrics****American Medical Association**, , 1 jul. 2020. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/>>. Acesso em: 24 out. 2020.

ZHANG, L. *et al.* D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with Covid-19. **Journal of thrombosis and haemostasis**, v. 18, n. 6, p. 1324-1329, 2020.

ZHAO, J. *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. **Clinical infectious diseases**, 2020.

ZHONG, W. *et al.* Meta analysis of angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism as a risk factor for preeclampsia in Chinese women. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 2268–2276, 2012.

ZHONG, X. *et al.* NLRP3, NLRC4 and NLRC5 gene polymorphisms associate with susceptibility to pulmonary aspergillosis in non-neutropenic patients. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 1-11, 2022.

ZHOU, F. *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan , China : a retrospective cohort study. **The Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, 2020.

ZHOU, M.; DAI, W.; CUI, Y.; LI, Y. Estrogen downregulates gp130 expression in HUVECs by regulating ADAM10 and ADAM17 via the estrogen receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2020, 523, 753–758.

ZHOU P, *et al.* Bacterial and fungal infection in COVID-19 patients. A matter of concern. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v.41, n. 9, p.1–2, 2020.

ZHOU, P. *et al.* Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. **Nature**, p. 2020.01.22.914952, 23 jan. 2020.

ZHU, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727-733, 2020.

ZOU, X. *et al.* Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. **Frontiers of Medicine**, v. 14, n. 2, p. 185–192, 2020.

ZUO, J. *et al.* Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. **Nature immunology**, v.22, p.620-626, 2021.

APÊNDICE A – ARTIGO 1: SEVERE COVID-19 IN HIV/LEISHMANIA INFANTUM COINFECTED PATIENT: A SUCCESSFULLY MANAGED CASE REPORT

Accepted for publication in BMC Infectious Diseases. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09691-5>. **Impact factor:** 3.4. **Qualis:** A3

Pablo Cantalice Santos Farias^{1*}, Gilberto Silva Nunes Bezerra², Patrícia Areias Feitosa Neves^{3,7}, Leandro Pimentel Cabral¹, Walter Lins Barbosa Júnior⁴, Diego Lins Guedes^{5,6}, Amanda Tavares Xavier⁴, Zulma Maria Medeiros⁴, Virgínia Maria Barros Lorena⁷, Paulo Sérgio Ramos Araújo³, Valdir de Queiroz Balbino¹ and Reginaldo Gonçalves de Lima Neto³

1. Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil.
2. Department of Nursing & Healthcare, Technological Univeristy of the Shannon: Midlands Midwest, N37 HD68 Athlone, Ireland.
3. Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil.
4. Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Pernambuco, Brasil.
5. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Brasil.
6. Núcleo de Ciências da Vida, Centro Acadêmico do Agreste, Universidade Federal de Pernambuco, Caruaru, Brasil.
7. Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Pernambuco, Brasil.

†Corresponding author address: pablo.cantalice@ufpe.br

Corresponding author contact number: +55 (81) 9 96607879

Abstract

Background: Coronavirus disease 2019 originated in China and swiftly spread worldwide, posing a significant threat to public health. Caused by SARS-CoV-2, it manifests as a flu-like illness that can escalate to Acute Respiratory Distress Syndrome, potentially resulting in fatalities. In countries where HIV/*Leishmania infantum* is endemic, the occurrence of concurrent SARS-CoV-2/HIV/*Leishmania infantum* infections is a reality, prompting inquiries into appropriate clinical management. **Case presentation:** We present the case of a 48-year-old woman who was hospitalized for 36 days across three different hospitals in the state of Pernambuco, Brazil. She was diagnosed with SARS-CoV-2/HIV/*L. infantum* coinfection. The patient exhibited severe COVID-19 symptoms, including fever, productive cough, and dyspnea. Throughout her hospitalization, she experienced oxygen saturation levels of $\leq 93\%$, along with fluctuations in blood pressure, respiratory rate, and heart rate. Her blood tests revealed lymphopenia, leukopenia, and neutropenia, while laboratory results indicated abnormal levels of d-dimer, AST, ALT, lactate dehydrogenase, ferritin, and C-reactive protein. A computed tomography scan revealed 75% involvement of the lung parenchyma with patchy ground-glass opacities. **Conclusion:** Against all odds, the patient was discharged. The leukopenia associated with HIV/*L. infantum* may have played a decisive role. Further studies are necessary to better understand diagnostic strategies and clinical management measures for HIV/*L. infantum* coinfecting patients who are susceptible to SARS-CoV-2 infection.

Keywords: SARS-CoV-2, HIV, Leishmaniasis, Coinfection, Case report

Background

SARS-CoV-2 is the etiological agent of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), declared a pandemic on March 11, 2020 [1]. As of March 10th, 2023, more than 670 million cases and over 6 million deaths have been reported worldwide [2]. COVID-19 is characterized by immune dysregulation that can progress to a hyperinflammatory syndrome, leading to respiratory failure and multiple organ dysfunction. The incubation period ranges from 2 to 14 days, after which the patient may experience flu-like symptoms such as fever or chills, cough, fatigue, runny nose, sore throat, myalgia, and difficulty breathing, or they may be asymptomatic [3]. In the acute phase of the disease, the patient may develop respiratory failure requiring supplemental oxygen, a condition known as Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) [4].

Regarding the hemogram, COVID-19 patients may exhibit leukopenia, characterized by direct infection of lymphocytes and subsequent functional immunosuppression, or leukocytosis, which is associated with a worse prognosis [5]. On the other hand, cases of neutropenia may also be observed, potentially contributing to a better outcome [6]. Laboratory data may reveal abnormal values of certain markers such as C-reactive protein (CRP), d-dimer, ferritin, lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT), which can serve as predictors of severe prognosis [7–10].

In HIV patients or those with visceral leishmaniasis (VL), the hemogram often indicates leukopenia, accompanied by lymphopenia and neutropenia, as a result of immunosuppression caused by the direct infection of both the virus and the parasite [11, 12]. Certain laboratory biomarkers may also be altered due to a high viral load, such as CRP and d-dimer, respectively [13, 14]. Additionally, ferritin and LDH levels are associated with disease progression in HIV and VL patients [15, 16]. Changes in AST and ALT levels are common in VL patients due to the tropism of *L. infantum* for liver cells [17].

It is worth noting that *L. infantum* is one of the opportunistic agents of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), and the coinfection of HIV/*L. infantum* represents a global public health concern. Patients with this coinfection have an elevated risk of parasite relapse, as well as an increased likelihood of mortality [18].

Given the widespread transmission of COVID-19, the potential for multiple SARS-CoV-2/HIV/*L. infantum* infections becomes a reality, particularly in regions where *L. infantum* is endemic. Moreover, there is a lack of published data regarding the impact of SARS-CoV-2 infection on HIV/*L. infantum* coinfecting patients, including clinical, immunological, and laboratory aspects [19]. Therefore, this case report serves to underscore a multiple SARS-CoV-2/HIV/*L. infantum* coinfection and its associated clinical, immunological, and laboratory characteristics.

Case presentation

A 48-year-old female patient, born in the state of Pernambuco, Brazil, was admitted to the ward at Agamenon Magalhães Hospital (AMH), Department of Health, in the state of Pernambuco on July 1st. She presented with fever and weight loss over the past four months, along with a productive cough. In the five days leading up to admission, she experienced respiratory distress, dysuria, and tachycardia. Due to worsening respiratory symptoms, a real-time RT-PCR test (BIOMOL OneStep kit) for SARS-CoV-2 was conducted on July 3rd, which returned positive results. Treatment with ceftriaxone (1 g/day) and azithromycin (500 mg/day) was initiated. At AMH, the patient was hospitalized for four days (from July 1st to July 5th) and maintained an average oxygen saturation of 97%. Laboratory findings revealed leukopenia of 3,670 cells/mm³, lymphopenia of 771 cells/mm³, and a peak circulating C-reactive protein (CRP) level of 7.7 mg/dL (Table 1).

Table 1. Hemogram data, laboratory findings, and clinical condition during three hospital admissions.

	AMH	AH	CH
Hemogram			
Leukocytes (cells/mm ³)	3,670	2,700	1,040-3,360
Neutrophils (cells/mm ³)	N/A*	N/A	200-1,965
Neutrophils (%)	70	43.2-48.7	22.1-78
Lymphocytes (cells/mm ³)	771	N/A	200-1,000
Lymphocytes (%)	21	42.9	10-58.2
Platelets (cells/mm ³)	128,000	174,000-214,000	128,000-189,000
Laboratory findings			
Prothrombin time (sec.)	N/A	N/A	12.5-13.4
D-dimer (ng/mL)	N/A	2,470	540
INR	N/A	N/A	0.94-1.02
AST (U/L)	18	35	18.8-325.8
ALT (U/L)	14	35	36.1-365.4
Total bilirubins (mg/dL)	N/A	N/A	0.3-0.6
Direct bilirubin (mg/dL)	N/A	N/A	0.1-0.4
Creatinine (mg/dL)	N/A	N/A	0.7-1.3
Lactic dehydrogenase (U/L)	N/A	470	438.8
Ferritin (ng/mL)	N/A	N/A	465

C-reactive protein (mg/dL)	7.7	21.8-48.8	0.3-6
Urea (mg/dL)	19	18	8.4-29.7
Clinical condition during hospitalization			
Temperature (°C)	N/A	35.9	36-39.2
Blood pressure (mmHg)	N/A	110/60-130/80	100/60-190/80
Respiratory frequency (mpm)	N/A	13-20	18-24
Heart frequency (bpm)	N/A	85-120	72-110
Saturation (%)	97.1	96-98	92-99

*Not Applicable – indicates missing data.

After confirming the diagnosis of COVID-19, the patient was transferred on July 5th to the designated COVID-19 referral hospital, Alfa Hospital (AH), also located in Recife, the capital of the state of Pernambuco. Upon admission, a new real-time RT-PCR test (CDC Protocol – respiratory virus- CDC/Atlanta/EUA) for SARS-CoV-2 was conducted, yielding a positive result. Additionally, three tuberculosis smear microscopies were performed, all yielding negative results.

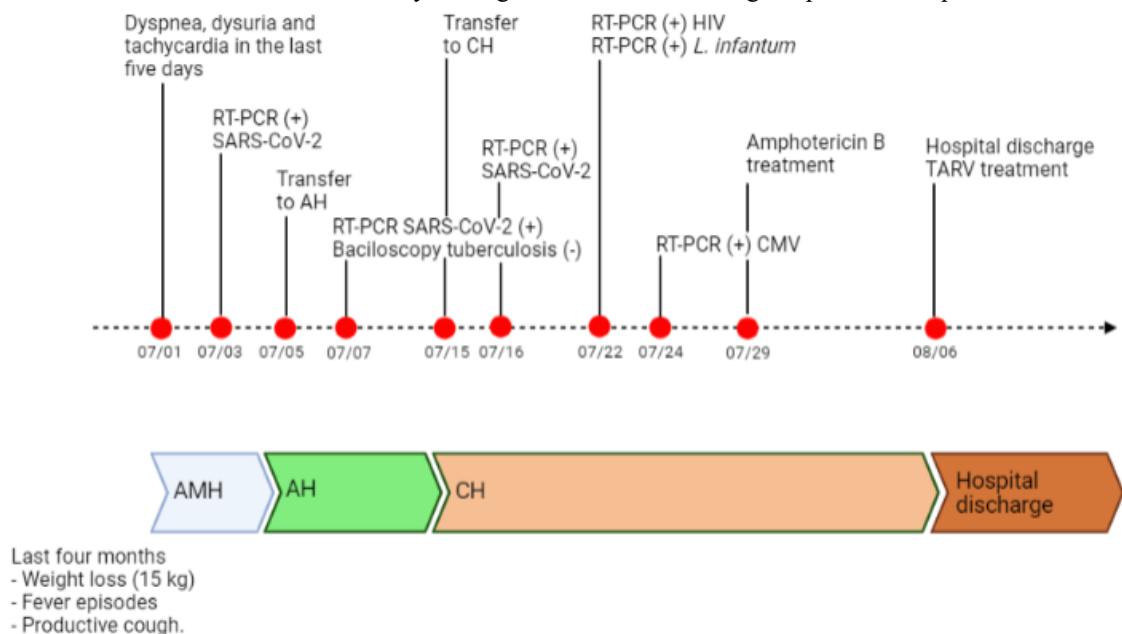
She was initiated on ceftriaxone (1 g every 24 h), azithromycin (500 mg every 24 h), and sulfamethoxazole+trimethoprim (800 mg+160 mg every 24 h). Additionally, she received enoxaparin (40 mg every 24 h), paracetamol (750 mg every 8 h), and ondansetron (2 mg/ mL every 8 h). On July 15th, the patient's clinical condition improved, with the absence of dyspnea and cough. In terms of clinical outcomes, her body temperature averaged 36 °C, blood pressure ranged from 110/60 mmHg to 130/80 mmHg, respiratory rate varied from 13 to 20 breaths per minute, heart rate ranged from 85 beats per minute to 120 beats per minute, and oxygen saturation ranged between 96 and 98%. Laboratory results indicated peak d-dimer values of 2,470 ng/mL; lactate dehydrogenase (LDH) of 470 U/L, and CRP of 48.8 mg/dL (Table 1). For further investigation of previous episodes of fever and weight loss, the patient was transferred to the ward at the Clinical Hospital (CH), Federal University of Pernambuco, Recife, on July 15th, with a regular general condition, conscious, oriented, and afebrile. As Prophylactic medication, sulfamethoxazole + trimethoprim (400/80 mg every 24 h) was prescribed, in addition to enoxaparin (40 mg every 24 h). Investigation for visceral leishmaniasis was initiated by means of abdominal ultrasonography on July 21st, which showed no alterations in the liver or spleen. On the following day, a conventional PCR test (GoTaq® Green Master Mix—LITSR/L5.8S) for the detection of *L. infantum* DNA was performed, yielding a positive result. Thus, treatment with amphotericin B (4 mg/kg/day) was initiated. On the same day, real-time PCR was conducted for HIV investigation, and the result was positive,

with a viral load of 440,089 copies/mL, CD4 count equal to 71 cells/mm³, and CD8 count at 803 cells/mm³.

In addition to these infectious conditions, the presence of cytomegalovirus (CMV) was also investigated through real-Time PCR (iCycler iQ) on July 24th, which yielded a positive result with 2,540 copies/mL detected. The patient presented pruritic burning ulcerated lesions in the vulva and gluteal regions with clinical features suggestive of herpes, and consequently, treatment with acyclovir (400 mg every 8 h) was initiated, leading to improvement in the clinical condition. The patient remained in the ward for 22 days (from July 15th to August 7th) and exhibited the following clinical outcomes: body temperature ranging from 36 to 39.2 °C, blood pressure fluctuating between 100/60 and 190/80 mmHg, respiratory rate varying from 18 to 24 breaths per minute, heart rate ranging from 72 to 110 beats per minute, and oxygen saturation fluctuating between 92 and 99%. During this period, sputum bronchoscopy was performed to investigate other potential causative agents of pulmonary disease, such as *Pneumocystis jirovecii*, *Mycobacterium tuberculosis*, and CMV; however, the results were negative. A chest CT scan revealed ground-glass opacities affecting approximately 75% of the lung parenchyma. Regarding the hemogram, notable presence of leukopenia was observed, with levels ranging from 1,040 to 3,360 cells/mm³. Moderate to severe neutropenia was also noted, with values ranging from 200 to 1,965.6 cells/mm³ (22.1%-78%). Lymphopenia ranged from 200 to 1,000 cells/mm³ (20%-58.2%). Laboratory findings indicated CRP values of 6 mg/dL, d-dimer of 540 ng/mL, ferritin of 465 ng/mL, LDH of 438.8 U/L, aspartate aminotransferase (AST) levels exceeding 51 U/L, and alanine aminotransferase (ALT) levels exceeding 63 U/L (Table 1).

The patient was discharged on August 7th due to clinical and laboratory improvement. Treatment for leishmaniasis was administered with amphotericin B 50 mg (4 mg/kg/day) from July 29th to August 6th. Additionally, she commenced ART treatment on August 6th, consisting of dolutegravir 50 mg/day, tenofovir 300 mg/day, and lamivudine 300 mg/day. A timeline depicting the clinical and laboratory evolution, as well as the treatments administered, is summarized in Fig. 1.

Figura 1- Main clinical evolution, laboratory findings and treatments during the patient's hospitalization



Discussion and conclusion

A severe COVID-19 patient with HIV/*L. infantum* coinfection, admitted to three different hospitals and discharged after 36 days of hospitalization, was reported. Leukopenia, lymphopenia, and neutropenia, along with other abnormal laboratory findings, were observed during the three hospitalizations. According to Qu et al. [20], leukopenia and lymphopenia are common in patients with COVID-19, possibly due to leukocyte infection by SARS-CoV-2. In severe COVID-19 cases, leukopenia, and lymphopenia may be observed in over 70% of patients compared to controls [21]. The neutropenia observed here may be an important factor associated with HIV and CMV infections, as these viruses can damage bone marrow progenitors and lead to autoimmune depletion [22].

In the context of HIV/*L. infantum* coinfection, lymphopenia is common due to the tropism of HIV for TCD4 lymphocytes and the replication of *L. infantum* in TCD4 and TCD8 lymphocytes, which can lead to severe immunosuppression [11, 23, 24]. Leukopenia and neutropenia may also be observed due to the presence of these two pathogens together. It is important to highlight that the primary immunological mechanisms governing the clinical evolution of patients co-infected with *Leishmania infantum*, HIV, and other infections remain unclear. The literature suggests that patients co-infected with *Leishmania infantum* and HIV have a worse prognosis compared to those infected only with *Leishmania infantum*, primarily

due to pronounced pro-inflammatory responses from the reticuloendothelial system. This may also explain the pulmonary clinical manifestations observed in the patient in this study.

HIV can impair macrophage phagocytosis, thereby promoting the intracellular replication of *Leishmania*. Furthermore, HIV can induce macrophages to produce E2 prostaglandin, cyclooxygenase 2, and TGF- β , which in turn stimulate *Leishmania* replication within these cells.

Another mechanism involves the expression of lipophosphoglycan (LPG) on the surface of *Leishmania*, which may trigger the expression of LTR proteins from the HIV proviral DNA in T cells via the NF- κ B pathway. Additionally, it is noteworthy that TNF- α , induced by *Leishmania* infection, may enhance HIV replication (Casado et al., 2015 [25]; Guedes et al., 2018 [26]; Okwor & Uzonna, 2013 [27]).

In the present case, SARS-CoV-2 infection occurred following immunosuppression caused by HIV/*L. infantum*. The literature suggests that HIV-immunosuppressed patients with COVID-19 are more prone to developing a severe clinical course, as SARS-CoV-2 can propagate more readily within the body in the absence of a rapid adaptive immune response for viral clearance [24]. Moreover, HIV-immunosuppressed patients can potentially act as sources for heightened viral loads and the emergence of variants [24]. HIV-positive individuals also have a high hospitalization rate due to their increased vulnerability to opportunistic infections and other complications [24].

Laboratory findings may play an important role in the complex interaction between SARS-CoV-2, HIV, and *L. infantum*. In this case, levels of CRP, d-dimer, ferritin, LDH, AST, and ALT were altered. During COVID-19, CRP levels may reflect the extent of lung damage and disease severity [7]. CRP functions as a complement to the innate and adaptive immune systems, and its expression is induced in response to factors secreted by macrophages, particularly IL-1, IL-6, and TNF [28–30]. In this case, the patient exhibited a peak CRP level of 48.8 mg/dL and 75% involvement of lung parenchyma. Furthermore, it is noteworthy that the highest CRP value in our case was observed on the ninth day of the disease, which corresponds to the stage of disease progression, typically occurring between 4 to 12 days, and can be classified as a severe predictor [30]. Elevated CRP levels can also be observed in patients with visceral leishmaniasis (VL), as it serves as a marker of inflammatory reactions and cytokine activation [31]. In HIV-positive patients, CRP levels are elevated only during ART use or non-intercurrent infections [14].

D-dimer is another important serum marker of note in the present context. It results from the degradation of fibrin, an important protein for clot formation. Elevated circulating levels of d-dimer are associated with alterations in the coagulation process and the possibility of

thrombosis formation [32]. In this case, d-dimer values reached 2,470 ng/mL, suggesting abnormalities in the coagulation process. Up to a nine-fold elevation in d-dimer levels, along with the presence of lymphopenia, has been associated with COVID-19 mortality in moderately and critically ill patients hospitalized in Wuhan, China [33]. Additionally, the cut-off value for predicting mortality during hospitalization was determined to be 2000 ng/mL [33]. D-dimer levels also increase in visceral leishmaniasis and are associated with the activation of intravascular coagulation, particularly in its severe form [34]. In HIV patients, elevated levels of d-dimer result from high levels of circulating viral RNA and the absence of antiretroviral treatment (ART), as well as high levels of CRP and IL-6. Particularly in women, high rates of d-dimer at an early age may also be related to HIV opportunistic diseases [13]. In this case, high levels of d-dimer may be related to circulating HIV RNA, as well as concomitant infections such as SARS-CoV-2 and *L. infantum*, and elevated CRP values.

Another important marker is ferritin, a protein involved in iron homeostasis and serving as a serum marker of body iron stores [35]. Iron is considered toxic to cells due to its ability to induce reactive species, which can damage DNA and cellular proteins. Ferritin plays a crucial role in storing iron, thus preventing this damage. In our patient, ferritin levels were elevated, reaching 465 ng/mL. According to Abbaspour et al. [36], ferritin is a key protein in immune dysregulation, as its high serum levels result from pro-inflammatory processes and contribute to the formation of the cytokine storm. Elevated serum ferritin levels during admission and hospitalization of COVID-19 patients were associated with moderate and severe disease, respectively [37]. However, the study by Carubbi et al. [38] suggests an association only between elevated ferritin levels and severe lung involvement, highlighting the lack of difference in lung abnormalities found on CT scans between discharged patients and those who died. High serum ferritin levels are also evident in immunocompetent patients with visceral leishmaniasis (VL) and HIV patients, as the disease progresses and TCD4 lymphocyte count decreases [39, 40]. LDH is an enzyme found in tissues that can indicate levels of injury and is also important in infectious diseases. Elevated LDH levels were observed in the present study. High LDH levels are associated with tissue damage in various diseases, as well as in pulmonary disorders, which can lead to respiratory failure [41]. Consequently, LDH levels have also been linked to severity in COVID-19 patients [9, 42]. Additionally, LDH has demonstrated high sensitivity and specificity in predicting severity and mortality [39]. Furthermore, LDH levels may be altered in patients with visceral leishmaniasis (VL) and HIV [15, 16].

Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), on the other hand, reflect liver function and are serum enzymes that may serve as predictors of COVID-19 severity.

In the study by Tian and Yen [10], severe patients exhibited high levels of AST and ALT. This could indicate the degree of liver impairment due to SARS-CoV-2 infection in cholangiocytes, which have higher ACE2 expression [10]. Similarly, Wang et al. [43] demonstrated abnormalities in AST and ALT levels among severe COVID-19 patients. Importantly, *L. infantum* exhibits tropism for liver cells and, in conjunction with SARS-CoV-2 infection, can overwhelm the organ by inducing hyperinflammation [17]. In the present case, the elevated AST and ALT levels observed may result from coinfection by SARS-CoV-2 and *L. infantum* in the liver, but further studies are needed to evaluate these mechanisms.

Taken together, these laboratory findings provide important markers that may help predict the severity of COVID-19 in the context of coinfections. It is noteworthy that CRP, D-dimer, ferritin, LDH, AST, and ALT levels were elevated, indicating the possibility of disease exacerbation through various mechanisms.

However, a severe outcome did not occur, which may be attributed to the interaction with HIV/*L. infantum* in the context of the cellular response, where each pathogen elicits a specific profile. This is the first case report of a multiple infection involving SARS-CoV-2, HIV, and *L. infantum*. We believe that this work provides useful information for a better understanding of clinical outcomes, which may lead to improved diagnostic strategies and guide the implementation of management measures for HIV/*L. infantum* coinfecting patients susceptible to SARS-CoV-2 infection, thereby contributing to a positive prognosis of the disease. The present case exhibits important features that could have led to a severe outcome of COVID-19, such as high levels of serum markers, lymphopenia, and a reticuloendothelial immune response. However, leukopenia was also evident, suggesting a possible relation with a severe outcome. The interaction between HIV and *L. infantum* may have played an important role here and deserves further investigation to elucidate the immunopathogenesis of this multiple infectious process.

Abbreviations

AMH Agamenon Magalhães Hospital

AH Alfa Hospital

CH Clinical Hospital

Acknowledgements

The authors are grateful to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) of the Ministry of Education, Brazil for the scholarship of Pablo Cantalice

Santos Farias (process 88887.509082/2020-00). Reginaldo Lima-Neto is a researcher fellow by the CNPq, grant 310414/2022-9.

Authors' contributions

P.C.S.F., V.Q.B and R.G.L.N. conceptualized and designed the study. P.C.S.F., P.A.F.N., L.P.C., W.L.B.J., D.L.G. and A.T.X. were involved in laboratory work. P.S. R.A. followed-up the patient. P.C.S.F., G.S.N.B., P.A.F.N., Z.M.M. and V.M.B.L carried out data collection, formal analysis and investigation. P.C.S.F. drafted the manuscript. G.S.N.B., P.S.R.A., V.Q.B. and R.G.L.N contributed with insertion/deletion of concepts, corrections and suggestions. V.Q.B. and R.G.L.N. obtained funding support. All authors read and approved the final version to be submitted. Funding This study was partially supported by the grant FACEPE 17/2021 APQ-1061–4.01/21.

Availability of data and materials

Availability of data and materials The authors agree to make all data described in the manuscript freely available.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was submitted to the Human Research Ethics Committee (CEP) of the Center for Health Sciences at the Federal University of Pernambuco under protocol CAAE 33597220.5.0000.5208, and it was approved under protocol 4.227.624.

Consent for publication

Written informed consent was obtained from the patient for publication of this case report and any accompanying images. A copy of the written consent is available for review by the Editor-in-Chief of this journal.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author details

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil.

²Department of Nursing & Healthcare, Technological Univeristy of the Shannon: Midlands Midwest, Athlone N37 HD68, Ireland.

³Departamento Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil.

⁴Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Pernambuco, Brasil.

⁵Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Brasil.

⁶Núcleo de Ciências da Vida, Centro Acadêmico Do Agreste, Universidade Federal de Pernambuco, Caruaru, Brasil.

⁷Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Pernambuco, Brasil.

References

1. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. 2023. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus2019>. Accessed 22 Apr 2024.
2. Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. COVID-19 Map. 2023. <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Accessed 22 Apr 2024.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Symptoms of COVID-19. 2022. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>. Accessed 22 Apr 2024.
4. World Health Organization. COVID-19: symptoms and severity. 2022, <https://www.who.int/westernpacifc/emergencies/covid-19/information/asymptomatic-covid-19>. Accessed 22 Apr 2024.
5. Remy KE, Mazer M, Striker DA, Ellebedy AH, Walton AH, Unsinger J, et al. Severe immunosuppression and not a cytokine storm characterizes COVID-19 infections. *JCI Insight*. 2020;5:e140329.
6. Wang Y, Zhang L, Sang L, Ye F, Ruan S, Zhong B, et al. Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity. *J Clin Invest*. 2020;130:5235–44.
7. Wang L. C-reactive protein levels in the early stage of COVID-19. *Med Mal Infect*. 2020;50:332–4.
8. Dahan S, Segal G, Katz I, Hellou T, Tietel M, Bryk G, et al. Ferritin as a Marker of Severity in COVID-19 Patients: A Fatal Correlation. *Isr Med Assoc J*. 2020;22:494–500.

9. Han Y, Zhang H, Mu S, Wei W, Jin C, Tong C, et al. Lactate dehydrogenase, an independent risk factor of severe COVID-19 patients: a retrospective and observational study. *Aging (Albany NY)*. 2020;12:11245–58.
10. Tian D, Ye Q. Hepatic complications of COVID-19 and its treatment. *J Med Virol*. 2020;92:1818–24.
11. Goto H, Prianti MG. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2009;51:241–6.
12. Fekene TE, Juhar LH, Mengesha CH, Worku DK. Prevalence of cytopenias in both HAART and HAART naive HIV infected adult patients in Ethiopia: a cross sectional study. *BMC Hematol*. 2018;18:1–11.
13. Borges AH, O'Connor JL, Phillips AN, Baker JV, Vjecha MJ, Losso MH, et al. Factors associated with D-dimer levels in HIV-infected individuals. *PLoS ONE*. 2014;9:e90978.
14. Noursadeghi M, Miller RF. Clinical value of C-reactive protein measurements in HIV-positive patients. *Int J STD AIDS*. 2005;166:64–70.
15. Farinacci D, Ciccullo A, Borghetti A, Visconti E, Tamburrini E, Izzi IM, et al. People Living with HIV in the COVID-19 Era: A Case Report. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2021;37:253–4.
16. Mouhoub B, Bensalah M, Berhili A, Azghar A, Malki JE, Mezgueldi IE, et al. Visceral leishmaniasis associated with macrophage activation syndrome: Case report and literature review. *IDCases*. 2021;26:e01247.
17. Shamsian SA, Fata A, Alinezhad R, Mohebbi M, Sadabadi F, Moghaddas E, et al. Clinical and Laboratory Findings of Visceral Leishmaniasis in Children Hospitalized in Mashhad, Northeastern Iran: A Twenty-Year Retrospective Study. *Iran J Parasitol*. 2020;15:495–9.
18. Guedes DL, Justo AM, Júnior WLB, Silva ED, Aquino SR, Junior MSCL, et al. Asymptomatic leishmania infection in HIV-positive outpatients on antiretroviral therapy in Pernambuco. *Brazil PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15:e0009067.
19. Sigel K, Swartz T, Golden E, Paranjpe I, Somani S, Richter F, et al. Coronavirus 2019 and People Living With Human Immunodeficiency Virus: Outcomes for Hospitalized Patients in New York City. *Clin Infect Dis*. 2020;71:2933–8.
20. Qu R, Ling Y, Zhang YHZ, Wei LY, Chen X, Li XM, et al. Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19. *J Med Virol*. 2020;92:1533–41.
21. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020;584:463–9.

22. Penner J, Chan CSY, Burns JE, Ali S, Lyall H. Congenital Cytomegalovirus and Autoimmune Neutropenia: Cause or Coincidence? *Pediatr Infect Dis J.* 2020;39:336–8.
23. Schriefer A, Wilson ME, Carvalho EM. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21:483–8.
24. Barbera LK, Kamis KF, Rowan SE, Davis AJ, Shehata S, Carlson JJ, et al. HIV and COVID-19: review of clinical course and outcomes. *HIV Res Clin Pract.* 2021;22:102–18.
25. Casado JL, Abad-Fernández M, Moreno S, Pérez-Elías MJ, Moreno A, Bernardino JJ, et al. Visceral leishmaniasis as an independent cause of high immune activation, T-cell senescence, and lack of immune recovery in virologically suppressed HIV-1-coinfected patients. *HIV Med.* 2015;16:240–8.
26. Guedes DL, Medeiros Z, Da Silva ED, De Vasconcelos AVM, Da Silva MS, Da Silva MAL, et al. Visceral Leishmaniasis in Hospitalized HIV-Infected Patients in Pernambuco, Brazil *Am J Trop Med Hyg.* 2018;99:1541–6.
27. Okwor I, Uzonna JE. The immunology of Leishmania/HIV co-infection. *Immunol Res.* 2013;56:163–71.
28. Boras E, Slevin M, Alexander MY, Aljohi A, Gilmore W, Ashworth J, et al. Monomeric C-reactive protein and Notch-3 co-operatively increase angiogenesis through PI3K signalling pathway. *Cytokine.* 2014;69:165–79.
29. Shah S, Ma Y, Scherzer R, Huhn G, French A, Plankey M, et al. Association of HIV, hepatitis C virus and liver fibrosis severity with interleukin-6 and C-reactive protein levels. *AIDS.* 2015;29:1325–33.
30. Tan C, Huang Y, Shi F, Tan K, Ma Q, Chen Y, et al. C-reactive protein correlates with computed tomographic findings and predicts severe COVID19 early. *J Med Virol.* 2020;92:856–62.
31. Lockwood DNJ. Serological tests for visceral leishmaniasis. *BMJ.* 2006;333:711–2.
- 32 Levi M, Toh CH, Thachil J, Watson HG, et al. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol.* 2009;145:24–33.
33. Zhang L, Yan X, Fan Q, Liu H, Liu X, Liu Z, et al. D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with Covid-19. *J Thromb Haemost.* 2020;18:1324–9.
34. Sakkas LI, Boulbou M, Kyriakou D, Makri I, Sinani C, Germanis A, et al. Immunological features of visceral leishmaniasis may mimic systemic lupus erythematosus. *Clin Biochem.* 2008;41:65–8.

35. Knovich MA, Storey JA, Cofman LG, Torti SV. Ferritin for the clinician. *Blood Rev.* 2009;23:95–104.
36. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci.* 2014;19:164–74.
37. Lino K, Guimarães GMC, Alves LS, Oliveira AC, Faustino R, Fernandes CS, et al. Serum ferritin at admission in hospitalized COVID-19 patients as a predictor of mortality. *Braz J Infect Dis.* 2021;25:101569.
38. Carubbi F, Salvati L, Alunno A, Maggi F, Borghi E, Mariani R, et al. Ferritin is associated with the severity of lung involvement but not with worse prognosis in patients with COVID-19: data from two Italian COVID-19 units. *Sci Rep.* 2021;11:4863.
39. Horrillo L, Castro A, Matía B, Molina L, García-Martínez J, Jaqueti J, et al. Clinical aspects of visceral leishmaniasis caused by *L. infantum* in adults. Ten years of experience of the largest outbreak in Europe: what have we learned? *Parasit Vectors.* 2019;12:359.
40. Riera A, Gimferrer E, Cadafalch J, Remacha A, Martin S. Prevalence of high serum and red cell ferritin levels in HIV-infected patients. *Haematologica.* 1994;79:165–7.
41. Poggiali E, Zaino D, Immovilli P, Rovero L, Losi G, Dacrema A, et al. Lactate dehydrogenase and C-reactive protein as predictors of respiratory failure in CoVID-19 patients. *Clin Chim Acta.* 2020;509:135–8.
42. Li C, Ye J, Chen Q, Hu W, Wang L, Fan Y, et al. Elevated Lactate Dehydrogenase (LDH) level as an independent risk factor for the severity and mortality of COVID-19. *Aging (Albany NY).* 2020;12:15670–81.
43. Wang Q, Zhao H, Liu LG, Wang YB, Zhang T, Li MH, et al. Pattern of liver injury in adult patients with COVID-19: a retrospective analysis of 105 patients. *Mil Med Res.* 2020;7:28.

APÊNDICE B – ARTIGO 2: GENETIC VARIANT IN THE AGT GENE (RS699-GG) IS ASSOCIATED

WITH SEVERE COVID-19 IN BRAZILIAN PATIENTS

Accepted for publication in Anais da Academia Brasileira de Ciências. doi 10.1590/0001-3765202420240274. **Impact factor:** 1.1, **Qualis:** A2

Pablo Cantalice Santos Farias^{1*}, pablo.cantalice@ufpe.br, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8734-3468>

Leandro Pimentel Cabral², leandro.pcabral@ufpe.br, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4094-1345>

Patrícia Areias Feitosa Neves^{3,4}, patriciaareiasf@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-8152-3827>

Caio Andrey Bezerra Januário¹, caio.andreyj@ufpe.br, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8916-9165>

Beatriz Melo Cordeiro¹, beatrizcmeloo@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-5089-319X>

Wilson José da Silva Júnior¹, wilson.jsjunior@hotmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0217-7665>

Carolina Baseggio¹, carolina.baseggio@ufpe.br, ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-1958-7043>

Sérgio de Sá Leitão Paiva Júnior¹, sslpaiva@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9938-6673>

Paulo Sérgio Ramos de Araújo⁴, paulo.raraujo@ufpe.br, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7839-0737>

Virgínia Maria Barros de Lorena³, virginia.lorena@fiocruz.br, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0663-236X>

Valdir de Queiroz Balbino¹, valdir.balbino@ufpe.br, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4319-3952>

Reginaldo Gonçalves de Lima Neto⁴, reginaldo.limant@ufpe.br, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8846-877X>

1. Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. da Engenharia - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

2. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Professor Moraes Rego, S/N - Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

3. Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, 50740-465, Recife, Pernambuco Brasil.

4. Departamento Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego - s/n. 50670-420 - Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

*Corresponding author:

Pablo Cantalice Santos Farias

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. da Engenharia - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil. Phone number: +55 (81) 996607879

Email address: pablo.cantalice@ufpe.br

Abstract: The COVID-19 pandemic has been the largest pandemic of the past century, and various genetic factors have played a significant role in this context. This study aimed to analyze the frequency and association between specific SNPs rs3806268 (*NLRP3*), rs4925543 (*NLRP3*), rs12150220 (*NLRP1*), rs455060 (*NLRC4*), rs699 (*AGT*), rs1137101 (*LEPR*), and rs1801133 (*MTHFR*) and severe/critical outcomes in Brazilian patients with COVID-19. A total of 100 patients were included in the study, comprising 66 cases and 34 controls. DNA was extracted, sequenced, and genotyped via next-generation sequencing (NGS). For non-parametric data, the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used. Fisher's test and multivariate logistic regression, considering AIC and BIC criteria, were employed for risk analysis. Odds Ratios (OR) were calculated, with significance set at $p < 0.05$. Among the seven evaluated SNPs, only rs699-GG (*AGT*) (OR=8.07; $p=0.04$) was significantly associated with an increased risk of developing severe/critical COVID-19. Moreover, a borderline protective association was noted between rs1801133-GA (*MTHFR*) and the disease, although lacking statistical significance. In conclusion, the SNP rs699-GG (*AGT*) was associated with an increased risk of severe/critical COVID-19.

Key words: *AGT* gene, COVID-19, Human genetics, SARS-CoV-2, SNPs.

INTRODUCTION

The Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) pandemic began in Wuhan, China, and was declared a pandemic by the World Health Organization (WHO) on March 11, 2020. It is considered the largest and deadliest pandemic of the last century, caused by the etiological agent Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (Azarpazhooh et al. 2020). As of June 2024, over 775 million cases and 7 million deaths have been reported worldwide, making this disease a continuing major threat to global health (WHO 2024).

COVID-19 can manifest in the human body after an incubation period of 2-14 days following exposure to the virus (CDC 2024). It presents a wide spectrum of symptoms, ranging from asymptomatic cases and common flu-like symptoms (fever, cough, fatigue, myalgia, headache, sore throat, anosmia/ageusia, among others) to respiratory failure, known as Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), which can be fatal. Consequently, COVID-19 has various classifications based on different clinical outcomes (WHO 2021). In this context, several factors are known to contribute to these varying outcomes, including human genetic factors such as the influence of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in genes involved in the innate immune response, energy metabolism, and circulatory system (Aladag et al. 2023, Marei et al. 2023, Pastor et al. 2023).

The genes *NLRP3* (NLR family pyrin domain containing 3), *NLRP1* (NLR Family pyrin domain containing 1), and *NLRP4* (NLR family CARD domain containing 4) play crucial roles in the innate immune response to viruses and other pathological conditions. These genes encode cytoplasmic receptors of the inflammasome pathway, which plays a role in the severity of various diseases (Sutterwala et al. 2014). Additionally, the *AGT* (angiotensinogen) and *MTHFR* (methylenetetrahydrofolate reductase) genes play important roles in vascular function within the renin-angiotensin system (RAS) and one-carbon metabolism, respectively, aiding in the conversion of homocysteine to methionine. (Foley et al. 2021, NCBI 2024, Sethi; Nordestgaard & TYBJÆRG-HANSEN 2003, Xi et al. 2016). The *LEPR* (Leptin Receptor) gene encodes the receptor for the hormone leptin, which is significant in fat metabolism and lymphopoiesis (NCBI 2023). Furthermore, it has been identified as a crucial signal for angiogenesis, cell proliferation, and the inhibition of cell apoptosis during SARS-CoV-2 infection (Rosa et al. 2021, Song et al. 2013).

The functioning of many genes, including those described above, can be modulated by the action of SNPs, which may play a crucial role in regulating gene expression, protein conformation, or the splicing mechanism (Cafiero et al. 2021, Abu-Farha et al. 2020, Pastor et

al. 2023). For *NLRP3*, it was observed that rs3806268 might have a fundamental role in COVID-19 patients with obesity as one of the comorbidities related to severe outcomes (Sá et al. 2022). Furthermore, another SNP in the same gene, rs4925543, has been investigated for its role in airway inflammation in patients with asthma (Queiroz et al. 2020). The missense variant rs12150220 (*NLRP1*- p.Leu155His) is related to increased IL-1 β in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) and has been associated with severe COVID-19 (Levandowski et al. 2013, Leal et al. 2022). The missense variant rs455060 (*NLRC4*) plays a fundamental role in IL-18 levels, which are important in the clinical outcome of severe COVID-19 (Zeller et al. 2015, Yin et al. 2023). For *RAS*, the rs699 SNP (*AGT*) has been identified as a potential gene target to predict clinical risk in patients infected with SARS-CoV-2 (Cafiero et al. 2021). In homocysteine metabolism, the SNP rs1801133 (*MTHFR*) has been found to be a potential genetic marker impacting the outcome of COVID-19 (Abu-Farha et al. 2020). For the *LEPR* gene, some SNPs have been studied in relation to other infectious diseases and metabolic system pathologies. For example, Lys109Arg and Gln223Arg have been associated with Hepatocellular Carcinoma (HCC) in individuals carrying the hepatitis B virus (HBV), and rs1137101-G has been associated with a reduced risk for developing the obese phenotype (Tang et al. 2020b).

Based on the aforementioned overview, the present study aimed to investigate the association between the SNPs rs3806268 (*NLRP3*), rs4925543 (*NLRP3*), rs12150220 (*NLRP1*), rs455060 (*NLRC4*), rs699 (*AGT*), rs1137101 (*LEPR*), and rs1801133 (*MTHFR*) and the severe/critical outcomes in Brazilian COVID-19 patients.

MATERIALS AND METHODS

Data collection, ethics committee and clinical definition

A case-control study was conducted to analyze the association between the SNPs rs3806268 (*NLRP3*), rs4925543 (*NLRP3*), rs12150220 (*NLRP1*), rs455060 (*NLRC4*), rs699 (*AGT*), rs1137101 (*LEPR*), and rs1801133 (*MTHFR*) and the severe/critical outcomes of COVID-19. The study population consisted of 100 individuals, including 34 COVID-19 negative individuals, 33 with mild/moderate symptoms, and 33 with severe/critical symptoms.

Patients aged 18 years and older with suspected COVID-19 and disease confirmed by RT-PCR were screened at the Hospital das Clínicas of the Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) and Hospital Mestre Vitalino. All enrolled patients provided informed consent, and the project was approved by the UFPE Ethics Committee (approval number 4.150.959, C.A.A.E

33597220.5.0000.5208). Clinical and epidemiological details collected included age, sex, color/race, comorbidities, symptoms, blood count, and laboratory findings (ferritin, CRP, AST, ALT, and d-dimer), along with diagnosis by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The material collected for virus diagnosis consisted of approximately 4 mL of whole blood, which was obtained from patients during the acute phase of the disease.

COVID-19 cases were classified according to the guidelines of the World Health Organization, as described (WHO 2021). Following clinical and laboratory evaluation, 100 suspected or confirmed cases of COVID-19 were stratified, comprising 34 COVID-19 negative cases, 33 severe/critical cases, and 33 mild/moderate cases.

DNA extraction, quantification and data processing

The extraction of genomic DNA from whole blood was conducted using the PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen©) following the manufacturer's instructions. The quantification of genomic material was performed using the Qubit high-sensitivity double-stranded DNA kit (Thermo Fisher©), followed by next-generation sequencing (NGS) of the exome (Mendelics©) and subsequent data processing.

Data acquisition and selection of SNPs

The filtering and annotation of VCF files were conducted using the VCFtools and wANNOVAR software, respectively (<http://snpeff.sourceforge.net/index.html>). SNP selection and genotype determination were based on the Variant Allele Frequency (VAF). Moreover, the SNPs were selected because they have also been investigated in other studies involving other viral infectious diseases as well as for their functional impacts on their respective proteins.

Statistical analysis

For non-parametric data, the Kruskal-Wallis test was employed to compare three samples, and the Mann-Whitney test was used to compare two samples, both conducted using Graphpad PRISM v.9.5. Crude (bivariate analysis) risk was performed using Jamovi 2.3.21 software, with the ancestral genotype considered as the reference for analysis. Adjusted (Multivariate logistic regression) analysis was conducted using Jamovi 2.3.28 software, with model adjustments based on the Akaike Information Criterion (AIC) and Bayesian Information Criterion (BIC). To determine the association between genotypes and clinical outcomes of COVID-19, Fisher's

exact test was employed, considering the odds ratio (OR) found. Values were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Initially, Hardy-Weinberg equilibrium was assessed for the studied SNPs using the chi-square test (χ^2) (Table I). Socioepidemiological data, clinical characteristics, and patient outcomes were collected and analyzed. Our study population showed no significant difference in sex distribution or median ages between the outcome groups ($p > 0.05$). Data on race/color and comorbidities were also collected, but no significant statistical differences were identified (Table II). Regarding the symptoms presented by the patients, fever, cough, dyspnea, and anosmia/ageusia were significantly more frequent in the severe/critical condition, with p-values of 0.04, 0.04, 0.0003, and 0.02, respectively (Table II). It is also noteworthy that there was a borderline result for the factors asthenia ($p = 0.05$) and malaise ($p = 0.08$), which may be related to the severe/critical outcome (Table II). Blood count data showed statistical significance for a higher frequency of lymphopenia and neutrophilia in patients with a severe/critical outcome, with $p = 0.04$ (Table II). Altered laboratory biomarkers for severe/critical COVID-19, such as d-dimer and ferritin, were also more frequent in this outcome, with p-values of 0.0006 and 0.008, respectively (Table II).

Table I. Chi-square values and p value for measuring Hardy-Weinberg equilibrium.

	Frequency (N=100)	χ^2	p
<i>NLRP3</i> rs3806268			
GG	33 (33)	0.99	0.32
GA	53 (53)		
AA	14 (14)		
G	86 (56.2)		
A	67 (43.8)		
<i>NLRP3</i> rs4925543			
AA	0 (0)	0.41	0.52
AG	12 (12)		
GG	88 (88)		
A	12 (10.7)		
G	100 (89.3)		
<i>NLRP1</i> rs12150220			
AA	40 (40)	2.52	0.11
AT	52 (52)		
TT	8 (8)		
A	92 (60.5)		
T	60 (39.5)		
<i>NLRC4</i> rs455060			
GG	15 (15)	0.17	0.68
GA	50 (50)		
AA	35 (35)		
G	65 (43.3)		

A	85 (56.7)		
AGT rs699			
AA	18 (18)	0.14	0.71
AG	51 (51)		
GG	31 (31)		
A	69 (45.7)		
G	82 (54.3)		
LEPR rs1137101			
AA	32 (32)	0.08	0.80
AG	48 (48)		
GG	20 (20)		
A	80 (54)		
G	68 (46)		
MTHFR rs1801133			
GG	52 (52)	1.22	0.27
GA	37 (37)		
AA	11 (11)		
G	89 (65)		
A	48 (35)		

Table II. Distribution by socioepidemiological data, clinical characteristics and patient evolution.

	All (N = 100)	COVID-19 (-) (N = 34)	Mild/moderate (N = 33)	Severe/critical (N = 33)	p
Median age (range)	60 (45 - 76)	58.5 (45 - 77)	55 (44 - 71)	68 (48.5 - 77.5)	0.56
Female sex n° (%)	58 (58)	22 (64.7)	19 (57.6)	17 (51.5)	0.32
Age ≥ 60 years	51 (51)	16 (47)	14 (42.4)	21 (63.6)	0.14
Race/color					
White	26 (26)	6 (17.6)	13 (39.4)	7 (21.2)	0.10
Mulatto	69 (69)	26 (76.5)	20 (60.6)	23 (69.7)	0.19
Black	3 (3)	2 (5.9)	0 (0)	1 (3)	>0.9
Yellow	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	_ ^a
No information ^b	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	_ ^a
Comorbidities					
Hipertension	50 (50)	19 (55.9)	16 (48.5)	15 (45.4)	0.47
Diabetes	9 (9)	2 (5.9)	3 (9.1)	4 (12.1)	0.43
Symptoms					
Fever	54 (54)	17 (50)	14 (42.4)	23 (69.7)	0.04
Cough	63 (63)	22 (64.7)	16 (48.5)	25 (75.8)	0.04
Dyspnoea	71 (71)	25 (73.5)	16 (48.5)	30 (90.9)	0.0003
Sore throat	10 (10)	3 (8.8)	4 (12.1)	3 (9.1)	0.71
Headache	14 (14)	5 (14.7)	2 (6.1)	7 (21.2)	0.15
Asthenia	13 (13)	1 (2.9)	6 (18.2)	6 (18.2)	0.05
Malaise	18 (18)	8 (23.5)	2 (6.1)	8 (24.2)	0.08
Arthralgia	5 (5)	0 (0)	2 (6.1)	3 (9.1)	>0.99
Mialgia	11 (11)	1 (2.9)	5 (15.2)	5 (15.2)	0.11
Abdominal pain	14 (14)	6 (17.6)	5 (15.2)	3 (9.1)	0.48
Diarrhea	9 (9)	4 (11.8)	3 (9.1)	2 (6.1)	0.67
Vomiting	10 (10)	2 (5.9)	4 (12.1)	4 (12.1)	0.43
Anosmia/ageusia	21 (21)	6 (17.6)	3 (9.1)	12 (36.4)	0.02
Blood count					
Leukocytosis ^c	75 (78.1)	25 (75.8)	23 (74.2)	27 (84.4)	0.36
N observations	96	33	31	32	
Lymphopenia ^c	56 (56)	15 (75)	17 (73.9)	24 (96)	0.04
N observations	68	20	23	25	
Neutrophilia ^c	50 (75.8)	16 (80)	13 (59.1)	21 (87.5)	0.04
N observations	66	20	22	24	
Thrombocytopenia ^c	29 (43.9)	9 (27.3)	9 (29)	11 (34.4)	0.6
N observations	96	33	31	32	

Altered laboratory findings					
Ferritin ^c	55 (68.8)	12 (54.5)	17 (58.6)	26 (89.6)	0.008
N observations	80	22	29	29	
CRP ^c	92 (96.8)	32 (100)	28 (90.3)	32 (100)	- ^a
N observations	95	32	31	32	
AST ^c	72 (76.6)	23 (71.9)	24 (80)	25 (78.1)	0.56
N observations	94	32	30	32	
ALT ^c	62 (66)	18 (56.2)	23 (76.7)	21 (65.6)	0.23
N observations	94	32	30	32	
D dimer ^c	58 (74.4)	13 (50)	19 (79.2)	26 (92.8)	0.0006
N observations	78	26	24	28	

^aThe presence of a category with zero occurrence made the analysis unfeasible.

^bGroup not considered in the analysis because it can assume any characteristic of the race/color category.

^cThe reference values adopted here follow the standard of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco. Leukocytes: 4000 - 11000 cells/mm³, lymphocytes: 1000 - 4950 cells/mm³, neutrophils: 2000 - 7700 cells/mm³, platelets: 150000 - 450000 cells/mm³, ferritin: 18 - 323 ng/mL for men and 5 - 204 ng/mL for women, CRP: 0 - 0.5 ng/dL, AST: <38 U/L for men and <32 U/L for women, ALT: <41 U/L for men and <31 U/L for women, and d dimer: 0 - 500 ng/mL.

From the NGS data for the exome, the SNPs rs3806268 (*NLRP3*), rs4925543 (*NLRP3*), rs12150220 (*NLRP1*), rs455060 (*NLRP4*), rs699 (*AGT*), rs1137101 (*LEPR*), and rs1801133 (*MTHFR*) were selected because they have also been investigated in other studies involving other viral infectious diseases and also for their functional effects on their respective proteins. Before conducting univariate and multivariate analyses of the SNPs considered in the present study, a frequency table was constructed to visualize the panorama of allelic and genotypic distribution across the different strata: COVID-19 (-), COVID-19 (+) mild/moderate, and COVID-19 (+) severe/critical (Table III). Genetic association analyses were initially conducted in a crude manner between the different outcomes, but no statistically significant results were identified. In the multivariate logistic regression performed, only the SNP rs699-GG (*AGT*) showed a significant association with susceptibility to the severe/critical outcome compared to the mild/moderate outcome, with an odds ratio (OR) of 8.07 and $p=0.04$ (Table IV).

Table III. Genotypic and allele frequency by clinical outcome and diagnosis

	All (N=100)	COVID-19 (-) (N=34)	Mild/moderate (N=33)	Severe/critical (N=33)
<i>NLRP3</i> rs3806268				
GG	33 (33)	12 (35.3)	11 (33.3)	10 (30.3)
GA	53 (53)	19 (55.9)	16 (48.5)	18 (54.5)
AA	14 (14)	3 (8.8)	6 (18.2)	5 (15.2)
G	86 (56.2)	31 (58.5)	27 (55.1)	28 (54.9)
A	67 (43.8)	22 (41.5)	22 (44.9)	23 (45.1)
<i>NLRP3</i> rs4925543				
AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
AG	12 (12)	5 (14.7)	3 (9.1)	4 (12.1)
GG	88 (88)	29 (85.3)	30 (90.9)	29 (87.9)
A	12 (10.7)	5 (12.8)	3 (8.3)	4 (10.8)

G	100 (89.3)	34 (87.2)	33 (91.7)	33 (89.2)
<i>NLRP1</i> rs12150220				
AA	40 (40)	14 (41.2)	13 (39.4)	13 (39.4)
AT	52 (52)	18 (52.9)	18 (54.5)	16 (48.5)
TT	8 (8)	2 (5.9)	2 (6.1)	4 (12.1)
A	92 (60.5)	32 (61.5)	31 (60.8)	29 (59.2)
T	60 (39.5)	20 (38.5)	20 (39.2)	20 (40.8)
<i>NLRC4</i> rs455060				
GG	15 (15)	5 (14.7)	6 (18.2)	4 (12.1)
GA	50 (50)	16 (47.1)	16 (48.5)	18 (54.5)
AA	35 (35)	13 (38.2)	11 (33.3)	11 (33.3)
G	65 (43.3)	21 (42)	22 (44.9)	22 (43.1)
A	85 (56.7)	29 (58)	27 (55.1)	29 (56.9)
<i>AGT</i> rs699				
AA	18 (18)	8 (23.5)	5 (15.2)	5 (15.1)
AG	51 (51)	15 (44.1)	20 (60.6)	16 (48.5)
GG	31 (31)	11 (32.4)	8 (24.2)	12 (36.4)
A	69 (45.7)	23 (46.9)	25 (47.2)	21 (42.8)
G	82 (54.3)	26 (54.1)	28 (52.8)	28 (57.2)
<i>LEPR</i> rs1137101				
AA	32 (32)	11 (32.4)	11 (33.3)	10 (30.3)
AG	48 (48)	12 (35.3)	16 (48.5)	20 (60.6)
GG	20 (20)	11 (32.4)	6 (18.2)	3 (9.1)
A	80 (54)	23 (50)	27 (55.1)	30 (56.6)
G	68 (46)	23 (50)	22 (44.9)	23 (43.4)
<i>MTHFR</i> rs1801133				
GG	52 (52)	16 (47.1)	18 (54.5)	18 (54.5)
GA	37 (37)	16 (47.1)	12 (36.4)	9 (27.3)
AA	11 (11)	2 (5.8)	3 (9.1)	6 (18.2)
G	89 (65)	32 (64)	30 (66.7)	27 (64.3)
A	48 (35)	18 (36)	15 (33.3)	15 (35.7)

Table IV. Adjusted association between the SNPs studied and different clinical stages of COVID-19.

SNPs	COVID-19 (-) (N=34) (I)	Mild/mode rate (N=33) (II)	Severe/criti cal (N=33) (III)	Adjusted OR (95% CI) (I vs II)	<i>p</i>	Adjusted OR (95% CI) (I vs III)	<i>p</i>	Adjusted OR (95% CI) (II vs III)	<i>p</i>	AIC	BIC
<i>NLRP3</i> rs3806268											
GG	12 (35.3)	11 (33.3)	10 (30.3)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-	204	251
GA	19 (55.9)	16 (48.5)	18 (54.5)	0.68 (0.20 - 2.24)	0.52	1.22 (0.35 - 4.24)	0.75	1.81 (0.46 - 7.16)	0.40	202	254
AA	3 (8.8)	6 (18.2)	5 (15.2)	2.45 (0.36 - 16.37)	0.35	2.24 (0.33 - 15.12)	0.41	0.92 (0.15 - 5.44)	0.92		
G	31 (58.5)	27 (55.1)	28 (54.9)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-		
A	22 (41.5)	22 (44.9)	23 (45.1)	2.07 (0.29 - 14.73)	0.47	2.18 (0.32 - 14.85)	0.43	1.05 (0.17 - 6.40)	0.96		
<i>NLRP3</i> rs4925543											
AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-	-	-	-	-	-	202	244
AG	5 (14.7)	3 (9.1)	4 (12.1)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-	198	245
GG	29 (85.3)	30 (90.9)	29 (87.9)	1.72 (0.31 - 9.44)	0.53	0.87 (0.15 - 5.00)	0.88	0.51 (0.07 - 3.74)	0.50		
AG	5 (12.8)	3 (8.3)	4 (10.8)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-		
G	34 (87.2)	33 (91.7)	33 (89.2)	3.33 (0.34 - 32.64)	0.30	1.03 (0.17 - 6.14)	0.97	0.31 (0.03 - 3.51)	0.34		
<i>NLRP1</i> rs12150220											
AA	14 (41.2)	13 (39.4)	13 (39.4)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-	205	252
AT	18 (52.9)	18 (54.5)	16 (48.5)	1.26 (0.40 - 3.89)	0.69	0.60 (0.18 - 2.00)	0.41	0.48 (0.13 - 1.76)	0.27	203	255
TT	2 (5.9)	2 (6.1)	4 (12.1)	0.95 (0.09 - 9.93)	0.97	0.55 (0.07 - 4.52)	0.58	0.59 (0.06 - 5.47)	0.64		
A	32 (61.5)	31 (60.8)	29 (59.2)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-		
T	20 (38.5)	20 (39.2)	20 (40.8)	0.90 (0.09 - 9.07)	0.93	0.56 (0.07 - 4.57)	0.58	0.62 (0.07 - 5.38)	0.66		
<i>NLRC4</i> rs455060											
GG	5 (14.7)	6 (18.2)	4 (12.1)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-	205	252
GA	16 (47.1)	16 (48.5)	18 (54.5)	0.99 (0.20 - 5.02)	0.99	2.43 (0.42 - 13.88)	0.32	2.45 (0.40 - 14.98)	0.33	205	252
AA	13 (38.2)	11 (33.3)	11 (33.3)	0.92 (0.17 - 4.99)	0.92	1.62 (0.27 - 9.90)	0.60	1.77 (0.27 - 11.78)	0.55		
G	21 (42)	22 (44.9)	22 (43.1)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-		
A	29 (58)	27 (55.1)	29 (56.9)	1.09 (0.20 - 5.94)	0.92	1.77 (0.27 - 11.78)	0.55	1.77 (0.27 - 11.78)	0.55		
<i>AGT</i> rs699											
AA	8 (23.5)	5 (15.2)	5 (15.1)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-	201	248
AG	15 (44.1)	20 (60.6)	16 (48.5)	0.76 (0.15 - 3.73)	0.74	1.95 (0.43 - 8.81)	0.38	2.55 (0.49 - 13.33)	0.27	201	248
GG	11 (32.4)	8 (24.2)	12 (36.4)	0.29 (0.04 - 1.87)	0.19	2.34 (0.42 - 12.89)	0.33	8.07 (1.12 - 58.13)	0.04		
A	23 (46.9)	25 (47.2)	21 (42.8)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-		
G	26 (54.1)	28 (52.8)	28 (57.2)	0.29 (0.04 - 1.87)	0.19	2.34 (0.42 - 12.89)	0.33	3.45 (0.53 - 22.28)	0.19		
<i>LEPR</i> rs1137101											
AA	11 (32.4)	11 (33.3)	10 (30.3)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-	202	249
AG	12 (35.3)	16 (48.5)	20 (60.6)	0.94 (0.26 - 3.35)	0.92	1.65 (0.46 - 5.99)	0.44	1.76 (0.47 - 6.63)	0.40		
GG	11 (32.4)	6 (18.2)	3 (9.1)	0.57 (0.13 - 2.51)	0.46	0.28 (0.05 - 1.59)	0.15	0.49 (0.07 - 3.36)	0.47		

A	23 (50)	27 (55.1)	30 (56.6)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-	202	249
G	23 (50)	22 (44.9)	23 (43.4)	0.18 (0.04 - 0.97)	0.46	0.28 (0.05 - 1.59)	0.15	0.49 (0.07 - 3.36)	0.47		
<i>MTHFR</i> rs1801133											
GG	16 (47.1)	18 (54.5)	18 (54.5)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-	98.5	145
GA	16 (47.1)	12 (36.4)	9 (27.3)	0.75 (0.24 - 2.40)	0.63	0.27 (0.07 - 1.01)	0.05	0.36 (0.09 - 1.44)	0.15		
AA	2 (5.8)	3 (9.1)	6 (18.2)	0.91 (0.10 - 7.79)	0.93	0.94 (0.11 - 7.73)	0.95	1.04 (0.14 - 7.44)	0.97		
G	32 (64)	30 (66.7)	27 (64.3)	Ref.	-	Ref.	-	Ref.	-	202	249
A	18 (36)	15 (33.3)	15 (35.7)	0.91 (0.10 - 7.79)	0.93	0.94 (0.11 - 7.73)	0.96	1.04 (0.14 - 7.44)	0.97		

DISCUSSION

This study is the first case-control investigation to identify an association between the rs699 SNP (*AGT*) and severe/critical outcomes in Brazilian patients suspected or confirmed with COVID-19. The suspected patients with a negative diagnosis for COVID-19 were used as the control group. Socio-epidemiological data, including age group, sex, and race/color, were also collected and analyzed for associations; however, no significant results were observed (Table II). Understanding this context is crucial for elucidating which epidemiological strata the disease affects (Islam et al. 2020). Data on comorbidities such as hypertension and type 2 diabetes mellitus were also collected to evaluate possible associations, but no statistically significant results were identified (Table II). Conversely, Angulo-Aguado et al. (2022) found significant statistical associations between hypertension, type 2 diabetes mellitus, and worse outcomes in a South American population. Additionally, existing literature consistently demonstrates the association between hypertension, diabetes, and severe outcomes in COVID-19 in other populations (Kouhpayeh et al. 2021, Feng et al. 2022).

In the present study, we found that the symptoms of fever ($p=0.04$), cough ($p=0.04$), dyspnea ($p=0.0003$), and anosmia/ageusia ($p=0.02$) were significantly more frequent in severe/critical individuals, indicating an associative effect (Table II). Another study on Latin American patients also found an association between the symptoms of fever, cough, and dyspnea and the severity of COVID-19, corroborating our findings (Angulo-Aguado et al. 2022). Symptoms indicating poor conditions in the lower respiratory tract are often associated with severe COVID-19, as they point to lung involvement (Angulo-Aguado et al. 2022). Furthermore, literature reports that anosmia may be directly related to the severity of the infection (Mazzatenta et al. 2020).

Regarding blood count data, we found that lymphopenia is significantly associated with severe/critical outcomes ($p=0.04$, Table II). Systematic reviews and meta-analyses have shown that patients with worse outcomes have significantly lower lymphocyte levels compared to patients with mild outcomes in COVID-19 (Huang & Pranata 2020, Zhao et al. 2020). Additionally, neutrophil levels play an important role in severe/critical outcomes in COVID-19 patients. In our study, we found a significant association ($p=0.04$) between neutrophilia and severe/critical outcomes (Table II). It is known that the pathophysiology of severe outcomes in COVID-19 is marked by elevated levels, phenotypic and functional changes in neutrophils, and their activation signatures are a prominent feature in the blood transcriptomes of severe COVID-19 patients (Reusch et al. 2021). We also investigated possible relationships between thrombocytopenia, leukocytosis, and severe/critical outcomes, but no statistically significant

results were found (Table II). However, literature provides important findings on the association between thrombocytopenia, leukocytosis, and severe/critical COVID-19 (Lippi et al. 2020, Yamada et al. 2020). Thrombocytopenia is common in severe cases, possibly related to the physiological decompensation of organs and the development of intravascular coagulopathy, which can progress to disseminated intravascular coagulopathy (DIC) (Zarichanski & Houston 2017).

Potentially predictive laboratory data for the worst outcomes in COVID-19 were also investigated (Table II). Significant associations were observed between ferritin levels and severe/critical outcomes of COVID-19 ($p=0.008$, Table II). Other studies have also identified high ferritin levels as important markers for severe COVID-19 outcomes (Kaushal et al. 2022). Ferritin is a key mediator of immune dysregulation that can contribute to the cytokine storm observed in individuals with severe disease outcomes (Abbaspour et al. 2014). Another important marker associated with severe/critical COVID-19 outcomes in this study is the d-dimer ($p=0.0006$). This finding corroborates other research showing a strong association between elevated d-dimer levels and poor prognosis in COVID-19 (Tang et al. 2020a, Rostami & Mansouritorghabeh 2020). Elevated d-dimer levels indicate a high inflammatory response in severe disease, often manifesting as a cytokine storm, which can induce disseminated intravascular coagulation (DIC) and the formation of fibrin clots (Rostami & Mansouritorghabeh 2020). In the present study, no significant results were observed for CRP, AST, and ALT, despite the literature showing important associations between these factors and severe/critical COVID-19 (Tan et al. 2020, Ceci et al. 2023).

The rs699-A/G SNP is a missense variant located on the long arm of chromosome 1 (1q42-43), exon 2 (codon 268) of the *AGT* gene, and involves the substitution of methionine for threonine (M268T) (El-Garawani et al. 2021). The *AGT* gene encodes the precursor of angiotensinogen, which can be cleaved by renin in response to low blood pressure (NCBI 2023). In our study, the rs699-GG genotype was associated with an increased risk of developing severe/critical COVID-19 (OR=8.07; $p=0.04$, Table IV). According to Gaspersic & Dolzan (2022), the rs699 SNP (*AGT*) is one of the polymorphisms that can influence susceptibility to SARS-CoV-2 and the severity of COVID-19, as evidenced by a literature search and database analysis (Gaspersic & Dolzan 2022). Furthermore, rs699 (*AGT*) may serve as a valuable prognostic tool for patients infected with SARS-CoV-2, as this SNP may be related to internal organ damage during infection (Cafiero et al. 2020). Another study on Iranian patients evaluated the association between rs699 (*AGT*) and the risk of developing COVID-19, finding significant results for the TC genotype (8.4 times) and the C allele (2.2 times) compared to the

TT genotype/T allele (Kouhpayeh et al. 2021). It is important to note that the C allele is also associated with increased plasma angiotensinogen and hypertension, which may influence the expression of *TMPRSS2* and, consequently, the risk of COVID-19 (Wu et al. 2020). Additionally, research on C57BL/6J mice demonstrated that inhibiting *AGT* expression for 14 days significantly reduced *TMPRSS2* expression levels in the lungs (Wu et al. 2020).

Here also we observed a borderline result (OR=0.27; $p=0.05$) for the protective association between rs1801133-GA (*MTHFR*) and severe/critical outcomes in COVID-19 patients compared to COVID-19-negative individuals (Table IV). This SNP has been identified as a potential factor involved in thrombophilic disorders in individuals with COVID-19, indicating the need for more robust studies (Cafiero et al. 2020). Additionally, the rs1801133-T allele has been associated with an increased risk of developing multinodular hepatocellular carcinoma (HCC), a common type of liver cancer caused by chronic hepatitis C virus (HCV) infection (Carvalho et al. 2021).

In the present study, other relevant SNPs from various immune response pathways were evaluated, but no significant results were found. These SNPs have been investigated for possible associations with other infectious diseases and inflammatory pathways (Cafiero et al. 2020, Nakanishi et al. 2017, Kamada et al. 2014, Zhong et al. 2022).

The present study has some limitations, such as a small sample size and the absence of certain variables that could contribute to a more robust multivariate statistical model. These limitations are attributed to the deficiencies in resources available for DNA extraction and NGS sequencing. Therefore, it is suggested that future research be conducted with a larger sample size and greater data robustness to better understand the joint associations between the SNPs described here, clinical-laboratory data, and the different outcomes of COVID-19.

CONCLUSIONS

Fever, cough, and dyspnea were significantly more frequent in individuals with severe/critical outcomes of COVID-19. However, the symptoms of malaise and asthenia showed interesting borderline results that may also explain the progression of the disease. In terms of blood counts, lymphopenia and neutrophilia were significantly more frequent in severe/critical cases. Among laboratory markers, d-dimer and ferritin levels were also higher in severe/critical patients. Regarding the genetic association study, the SNP rs699-GG (*AGT*) was linked to an increased risk of developing severe/critical COVID-19 compared to mild/moderate outcomes. Based on these results, it is recommended that future studies involving different populations be conducted in order to investigate other associative profiles. The SNPs identified should be considered to

elucidate potential pathways of disease severity and prediction, as well as to evaluate possible therapeutic alternatives.

Acknowledgments

We are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their support and funding. We also thank Dr. Evônio Campello and Dr. Igor Wesland for facilitating access to patients at the Hospital das Clínicas at UFPE.

REFERENCES

- ABBASPOUR N, HURRELL R & KELISHADI R. 2014. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci* 19: 164-174.
- ABU-FARHA MA ET AL. 2020. Prognostic genetic markers for thrombosis in COVID-19 patients: a focused analysis on D-dimer, homocysteine and thromboembolism. *Front in Pharmacol* 11: 1-10.
- ALADAG E ET AL. 2023. Human ACE D/I Polymorphism Could Affect the Clinicobiological Course of COVID-19. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2021: 1-7.
- ANGULO-AGUADO M ET AL. 2022. Association Between the LZTFL1 rs11385942 Polymorphism and COVID-19 and Severity in Colombian Population. *Front Med* 9: 1-15.
- AZARPAZHOOH MR ET AL. 2020. COVID-19 Pandemic and Burden of Non-Communicable Diseases: An Ecological Study on Data of 185 Countries. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 29: 1-9.
- CAFIERO C ET AL. 2020. Pharmacogenomics and Pharmacogenetics: In Silico Prediction of Drug Effects in Treatments for Novel Coronavirus SARS-CoV-2 Disease. *Pharmacogenomics Pers Med* 13: 463-484.
- CAFIERO C ET AL. 2021. Angiotensin system polymorphisms' in SARS-CoV-2 positive patients: assessment between symptomatic and asymptomatic patients: a pilot study. *Pharmacogenomics Pers Med* 14: 621-629.
- CARVALHO SCR ET AL. 2021. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphisms in Brazilian patients with Hepatitis C virus (HCV)-related hepatocellular carcinoma (HCC). *Clinics São Paulo* 76: 1-7.
- CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2024. Symptoms of COVID-19. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>. Accessed on March 12, 2024.
- CECI FM ET AL. 2023. Investigating Biomarkers for COVID-19 Morbidity and Mortality. *Curr Top Med Chem* 23: 1196-1210.

EL-GARAWANI IM, SHAHEEN EM, EL-SEEDI HR, KHALIFA SMA, MERSAL GAM, EMARA MM & KASEMY ZA. 2021. Angiotensinogen Gene Missense Polymorphisms (rs699 and rs4762): The Association of End-Stage Renal Failure Risk With Type 2 Diabetes and Hypertension in Egyptians. *Genes* 12: 1-11.

FENG S, SONG F, GUO W, TAN J, ZHANG X, QIAO F, GUO J, ZHANG L & JIA X. 2022. Potential Genes Associated with COVID-19 and Comorbidity. *Int J Med Sci* 19: 402-415.

FOLEY A, STEINBERG BE & GOLDENBERG NM. 2021. Inflammasome Activation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Front Med (Lausanne)* 8: 1-8.

GASPERSIC J & DOLZAN V. 2022. Viral and Host Genetic and Epigenetic Biomarkers Related to SARS-CoV-2 Cell Entry, Infection Rate, and Disease Severity. *Biology (Basel)* 11: 1-23.

HUANG I & PRANATA R. 2020. Lymphopenia in severe coronavirus disease-2019 (COVID-19): systematic review and meta-analysis. *J Intensive Care* 8: 1-10.

ISLAM N, KHUNTI K, DAMBHA-MILLER H, KAWACHI I & MARMOT M. 2020. COVID-19 mortality: a complex interplay of sex, gender and ethnicity. *Eur J Public Health* 30: 847-848.

KAMADA AJ, PONTILLO A, GUIMARÃES RL, LOUREIRO P, CROVELLA S & BRANDÃO LAC. 2014. NLP3 polymorphism is associated with protection against human T-lymphotropic virus 1 infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109: 957-60.

KAUSHAL K ET AL. 2022. Serum ferritin as a predictive biomarker in COVID-19. A systematic review, meta-analysis and meta-regression analysis. *J Crit Care* 67: 172-181.

KOUHPAYEH HR, TABASI F, DEHVARI M, NADERI M, BAHARI G, KHALILI T, CLARK C, GHAVAMI S & TAHERI M. 2021. Association between angiotensinogen (AGT), angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensin-II receptor 1 (AGTR1) polymorphisms and COVID-19 infection and southeast of Iran: a preliminary case-control study. *Transl Med Commun* 6: 1-10.

LEAL VN ET AL. 2022. A common variant close to the “tripwire” linker region of NLRP1 contributes to severe COVID-19. *Inflamm Res* 72: 1933-1940.

LEVANDOWSKI CB ET AL. 2013. NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1 β processing via the NLRP1 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 2952-2956.

LIPPI G, PLEBANI M & HENRY BM. 2020. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. *Clin Chim Acta* 506: 145-148.

MAREI YES, BAYOUMI AA, NASSAR HMA, MANSOUR B & HAMADY AB. 2023. The Relation between ACE Gene Polymorphism and the Severity of COVID-19 Infection. *Int J Microbiol* 2023: 1-7.

MAZZATENTA A ET AL. 2020. Smell and Taste in Severe CoViD-19: Self-Report vs. Testing. *Front Med* 7: 1-11.

NAKANISHI H ET AL. 2017. *NLRP3* mutation and cochlear autoinflammation cause syndromic and nonsyndromic hearing loss DFNA34 responsive to anakinra therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: E7766-E7775.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2023. LEPR leptin receptor [Homo sapiens (human)]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3953>. Accessed on March 12, 2024.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2024. AGT angiotensinogen. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/183>. Accessed on March 12, 2024.

PASTOR AF ET AL. 2023. Human Polymorphisms and Computational Intelligence Approach Revealed a Complex Genomic Signature for COVID-19 Severity in Brazilian Patients. *Viruses* 15: 1-15.

QUEIROZ GDA, DA SILVA RR, PIRES ADO, COSTA RDS, ALCÂNTARA-NEVES NM, SILVA TM, BARRETO ML, OLIVEIRA SC & FIGUEIRÊDO CA. 2020. New variants in *NLRP3* inflammasome genes increase risk for asthma and *Blomia tropicalis*-induced allergy in a Brazilian population. *Cytokine X* 2: 1-8.

REUSCH N, DOMENICO E, BONAGURO L, SCHULTE-SCHREPPING J, BABLER K, SCHULTZE JL & ASCHENBRENNER AC. 2021. Neutrophils in COVID-19. *Front Immunol* 12: 1-9.

ROSA BA ET AL. 2021. IFN signaling and neutrophil degranulation transcriptional signatures are induced during SARS-CoV-2 infection. *Commun Biol* 4: 1-14.

ROSTAMI M & MANSOURITORGHABEH H. 2020. D-dimer level in COVID-19 infection: a systematic review. *Expert Rev Hematol* 13: 1265-1275.

SÁ NBR ET AL. 2022. Inflammasome genetic variants are associated with protection to clinical severity of COVID-19 among patients from Rio de Janeiro, Brazil. *BioMed Res Int* 2022: 1-15.

SETHI AA, NORDESTGAARD BG & TYBJÆRG-HANSEN A. 2003. Angiotensinogen Gene Polymorphism, Plasma Angiotensinogen, and Risk of Hypertension and Ischemic Heart Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1269-1275.

SONG JH, SHIN SJ & KIM JS. 2013. Leptin: A Multifunctional Role as an Immunomodulator in Mycobacterial Lung Disease. *J Bacteriol Virol* 43: 1-8.

SUTTERWALA ES, HAASKEN S & CASSEL SL. 2014. Mechanism of *NLRP3* inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci* 1319: 82-95.

TAN C, HUANG Y, SHI F, TAN K, MA Q, CHEN Y, JIANG X & LI X. 2020. C-reactive protein correlates with computed tomographic findings and predicts severe COVID-19 early. *J Med Virol* 92: 856-862.

TANG N, LI D, WANG X & SUN Z. 2020. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost* 18: 844-847.

TANG Y ET AL. 2020. Association of LEPR gene polymorphism with the risk of hepatitis B virus-related virus disease in Guangxi Chinese: A case-control study. *Infect Genet Evol* 84: 1-7.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2021. Living guidance for clinical management of COVID-19. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/349321/WHO-2019-nCoV-clinical-2021.2-eng.pdf>. Accessed on March 12, 2024.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2024. Number of COVID-19 cases reported to WHO (cumulative total). Number of COVID-19 deaths reported to WHO. Available at: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=o>. Accessed on June 8, 2024.

WU C, YE D, MULLICK AE, LI Z, DANSER AHJ, DAUGHERTY A & LU HS. 2020. Effects of Renin-Angiotensin Inhibition on ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2) and TMPRSS2 (Transmembrane Protease Serine 2) Expression: Insights Into COVID-19. *Hypertension* 76: e29-e30.

XI H ET AL. 2016. Caspase-1 Inflammasome Activation Mediates Homocysteine-Induced Pyroptosis in Endothelial Cells. *Circ Res* 118: 1525-1539.

YAMADA T, WAKABAYASHI M, YAMAJI T, CHOPRA N, MIKAMI T, MIYASHITA H & MIYASHITA S. 2020. Value of leukocytosis and elevated C-reactive protein in predicting severe coronavirus 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *Clin Chim Acta* 509: 235-243.

YIN M, MARRONE L, PEACE CG & O'NEIL LAJ. 2023. NLRP3, the inflammasome and COVID-19 infection. *QJM* 116: 502-507.

ZARICHANSKI R & HOUSTON DS. 2017. Assessing thrombocytopenia in the intensive care unit: the past, present and future. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2017: 660-666.

ZELLER T ET AL. 2015. Molecular characterization of the NLRC4 expression in relation to interleukin-18 levels. *Circ Cardiovasc Genet* 8: 717-726.

ZHAO Q, MENG M, KUMAR R, WU Y, HUANG J, DENG Y, WENG Z & YANG L. 2020. Lymphopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A systemic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* 96: 131-135.

ZHONG J, LIU L, LU Y, GU Y, ZHAO J, CHEN B, ZHOU W & SU X. 2022. NLRP3, NLRC4 and NLRC5 Gene Polymorphisms Associate with Susceptibility of Pulmonary Aspergillosis in Non-Neutropenic Patients. *J Clin Med* 11: 1-11.