



Anosmia e ageusia em pacientes com COVID-19: o perfil de citocinas nas vias aéreas superiores

André L. L. Bachi^{1,2}, Juliana M. B. Santos³, Fernanda R. Monteiro^{1,4}, Marcelo Rossi¹, Jônatas B. Amaral¹, Camila P. Soares⁵, Camila A. Valério⁵, Vanessa N. Chalup⁵, Gabriela F. Leite⁵, Flavia J. Almeida⁶, Marco A. Palazzi Sáfiadi⁶, Beatriz N. M. Paiatto⁶, Anna C. M. Barrientos⁷, Aline G. Fevereiro⁷, Milena De Paulis⁸, Lilian F. Passadore⁹, Theresa Ramalho¹⁰, Rodolfo P. Vieira^{3,11,12,13}, Edison L. Durigon^{5,14,15}, Danielle B. L. Oliveira^{5,15,16}, Norma O. Penido^{1#}

¹ENT Laboratório de pesquisa. Departamento de Otorrinolaringologia-Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Universidade Federal de São Paulo. ²Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Santo Amaro (UNISA). ³Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano e da Reabilitação, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). ⁴Método Faculdade de São Paulo (FAMESP). ⁵Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). ⁶HSCM-Departamento de Pediatria. Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. ⁷HIMJ-Serviço de Controle de Infecção, Hospital Municipal da Criança Menino Jesus. ⁸HU-Hospital Universitário, Divisão de Pediatria, Universidade de São Paulo. ⁹Divisão de Laboratório Clínico, Departamento de Farmácia e Laboratório Clínico, Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. ¹⁰Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. ¹¹Programa de Pós-graduação em Bioengenharia e Engenharia Biomédica, Universidade Brasil. ¹²Escola de Medicina. ¹³Instituto Brasileiro de Ensino e Pesquisa em Imunologia Pulmonar e do Exercício (IBEPIPE). ¹⁴Plataforma Científica Pasteur USP. ¹⁵Desenvolvimento e inovação.

RESUMO

OBJETIVO

COVID-19 é uma doença sistêmica que afeta múltiplos órgãos, além do sistema respiratório. Embora os sintomas neurosensoriais, incluindo anosmia e ageusia, tenham sido frequentemente associados a formas mais leves de infecção por SARS-CoV-2, o mecanismo patogênico e sua relação com a imunomodulação oromucosa permanecem pouco conhecidos. Portanto, o objetivo principal deste estudo piloto foi fornecer algumas evidências sobre o padrão de citocinas na mucosa das vias aéreas superiores em pacientes com COVID-19 com e sem anosmia e / ou ageusia.

MÉTODOS

Amostras de swabs nasofaríngeos / orofaríngeos foram obtidas de 12 pacientes com diagnóstico de COVID-19. Os pacientes foram separados em dois grupos: com anosmia e / ou ageusia (A / A, n = 4) e um grupo controle com pacientes sem anosmia e / ou ageusia (NA / A, n = 8).

RESULTADOS

A concentração de citocinas na mucosa foi determinada por ELISA. Os níveis de IFN- γ , IL-6 e IL-10 na mucosa das vias aéreas superiores foram semelhantes entre os grupos. Além disso, não foram encontradas diferenças significativas na proporção de IFN- γ / IL-6, IFN- γ / IL-10 e IL-10 / IL-6 entre os dois grupos. No entanto, usando o coeficiente de correlação de Pearson encontramos correlações positivas significativas entre IL-6 e IFN- γ , IL-10 e IFN- γ , e também IL-10 e IL-6 no grupo controle (NA / A), enquanto a correlação negativa significativa entre IL-10 e IFN- γ foi encontrada no grupo A / A.

CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que pacientes com formas leves de COVID-19, apresentando anosmia e / ou ageusia, apresentam alteração da resposta imune da mucosa das vias aéreas superiores.

DESCRITORES

SARS-CoV-2. Sintomas neurosensoriais. IL-6. IL-10. IFN-gama.

Corresponding author:

Norma de Oliveira Penido

Departamento de Otorrinolaringologia -Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Universidade Federal de São Paulo. Rua Napoleão de Barros, 590, São Paulo - SP, Brasil.

E-mail: nopenido@terra.com.br ORCID ID: 0000_0003_3496_410X**Copyright:** This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons

Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original author and source are credited.

INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, o Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2), um novo coronavírus, surgiu na China, associado a grupos relatados de pacientes com pneumonia na cidade de Wuhan, província de Hubei¹. A doença coronavírus 2019 (COVID-19) se espalhou globalmente, tornando-se a primeira pandemia global causada por um coronavírus. Em 07 de setembro de 2020, COVID-19 afetou quase todos os países e regiões, com 27.500.000 casos confirmados e 895.000 mortes, representando uma das mais graves e desafiadoras crises de saúde pública enfrentadas por esta geração^{1,2}.

É amplamente aceito que a COVID-19 é uma doença sistêmica que afeta múltiplos órgãos e sistemas, além do sistema respiratório. Nesse contexto, disfunção olfatória e gustativa, incluindo anosmia e disgeusia, foram considerados sintomas comuns, isolados ou com outras manifestações, fortemente associados ao COVID-19. A análise encontrou uma taxa significativamente maior de disfunção olfatória usando avaliações quantitativas em comparação com a perda de olfato auto-relatada³. Curiosamente, estudos preliminares descobriram que a anosmia relacionada ao COVID-19 estava associada a formas mais leves da doença^{4,6}.

Com base no estudo de Lechien et al.⁷, entre 417 pacientes com COVID-19 que apresentavam manifestações não graves da doença, 86% tinham perda ou diminuição evidente do olfato e 88% tinham alterações do paladar. Além disso, os mesmos autores também relataram que esses dois distúrbios ocorreram, de forma geral, concomitantemente com os sintomas clínicos mais comuns observados nos pacientes com COVID-19 (perda de apetite, tosse, febre e dores musculares), também assim como os sintomas otorrinolaringológicos (nariz entupido e dor facial) também característicos da infecção por SARS-CoV-2. Vale ressaltar também que foi demonstrado que alguns pacientes apresentaram a ocorrência de anosmia e ageusia antes (12% dos casos) ou após (23% dos casos) o aparecimento de outros sintomas e que quase metade dos pacientes se recuperou seu olfato dentro de duas semanas após o desaparecimento de outros sintomas^{7, 8}.

Embora a patogênese por trás da disfunção olfatória permaneça obscura, é plausível que o SARS-CoV-2 apresente comportamento semelhante a outros vírus respiratórios, desencadeando uma resposta imune inata nas vias aéreas superiores, que inclui a produção e liberação de imunoglobulina A secretora e também de citocinas. Nesse sentido, diferentes padrões de citocinas, que estão relacionados a respostas imunes distintas, como Th1, Th2 e Th17, podem ser desencadeados por infecções respiratórias, a fim de gerar imunidade mucosa eficiente contra esses patógenos 9-13. Portanto, a possibilidade de determinar um padrão de citocinas preditivo de desfechos graves, bem como de identificar uma definição específica do tipo de resposta imune desencadeada pelas diferentes infecções virais respiratórias, pode ter implicações significativas no manejo clínico dos pacientes.

Nesse contexto, o melhor entendimento da modulação das citocinas, tanto pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias, presentes na mucosa das vias aéreas superiores de pacientes com COVID-19 também parece ser de suma importância. Até onde sabemos, são muito escassos os dados que mostram na

literatura o padrão de citocinas na mucosa das vias aéreas superiores de pacientes com COVID-19 com disfunção olfatória, incluindo anosmia e / ou ageusia. Portanto, o objetivo principal deste estudo piloto foi fornecer algumas evidências sobre o padrão de citocinas na mucosa das vias aéreas superiores entre pacientes com COVID-19 com ou não anosmia e / ou ageusia.

MÉTODOS**Assuntos do estudo**

O presente estudo foi realizado com amostras para o teste RT-PCR SARS-CoV-2 coletadas por swab nasofaríngeo ou orofaríngeo em um dos três hospitais da cidade de São Paulo: 1. Hospital Universitário (HU-USP); 2. Hospital da Santa Casa de São Paulo (HSCM); 3. Hospital Municipal Infantil Menino Jesus (HMIMJ). As amostras de swabs de nasofaringe / orofaringe foram obtidas em até 5 dias após o início dos sintomas e foram mantidas em tampão conservador durante o transporte da amostra até o laboratório. Todos os pacientes foram classificados como casos leves e com base na presença de anosmia e / ou ageusia foram divididos em dois grupos: o grupo de pacientes com anosmia e / ou ageusia (A / A, n = 4), e o grupo controle com pacientes sem anosmia e / ou ageusia (NA / A, n = 8). A definição da ocorrência de anosmia e / ou ageusia foi baseada na avaliação clínica dos pacientes que relataram a perda do olfato e / ou paladar. As características demográficas e clínicas são apresentadas na Tabela 1.

Todos os sujeitos inscritos neste estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (número CAAE: 36011220.0.0000.0081). É importante destacar que tanto o estudo como todos os experimentos foram realizados de acordo com a Declaração de Helsinque.

Tabela 1. Características demográficas e clínicas apresentadas pelos pacientes do COVID-19 com anosmia e / ou ageusia (A / A) e o grupo controle (NA / A). O nível de significância foi estabelecido em 5% (* p < 0,05).

Características	Pacientes (n=12)		p value
	NA/AG (n=8)	A/AG (n=4)	
Idade (ano)	38.5 (14.2)	39 (14.9)	ns
Mulheres (n)	6	3	ns
Homens (n)	2	1	ns
W/M relação	3:1	3:1	ns
Sintomas clínicos (n)*			
Anosmia	0	4	<0.05
Ageusia	0	1	ns
Febre	2	1	ns
Tosse	2	2	ns
Coriza	5	2	ns
Dor de garganta	1	0	ns
Dispneia	1	1	ns
Fadiga	1	0	ns
Dor corporal	1	2	ns
Mialgia	2	1	ns
Dor de cabeça	1	1	ns
Calafrio	1	1	ns

número de indivíduos. Ns: não-significativo. A/AG: grupo de pacientes COVID-19 com anosmia e / ou ageusia. NA/AG: Grupo de controle de pacientes COVID-19 (sem anosmia e / ou ageusia)

Extração de RNA e determinação de infecção viral por qRT-PCR

Os ácidos nucleicos totais foram extraídos na plataforma NUCLEIENS® easyMag (bioMérieux, Massachusetts, EUA) e a PCR em tempo real para 15 vírus sazonais e Sars.CoV-2 foi realizada na máquina de PCR em tempo real ABI 7500, utilizando o AgPath-ID Kit master mix RT-PCR de uma etapa (ambos Applied Biosystems Inc., EUA). Todos os extratos foram testados para o gene RNase P humano por RT-PCR para confirmar a qualidade da amostra. Os protocolos usados para SARS-CoV-2¹⁴, Vírus Sincicial Respiratório (RSV-A e -B), Metapneumovírus Humano (hMPV), Vírus Influenza (Flu-A e -B), Vírus Parainfluenza (hPIV-1, -2, -3 e -4), Rinovírus (RV), Enterovírus (EV), pan-Adenovírus (AdV) e Coronavírus sazonal no Brasil (CoV-229E, -OC43, -NL63, -HKU1) foi publicado anteriormente¹⁵⁻¹⁷. Selecionamos amostras positivas para SARS.CoV-2 sem coinfeções com outro vírus testado.

Determinação de citocinas

As concentrações de citocinas foram determinadas nas amostras de esfregaço oro / nasofaríngeo pelo teste de ELISA. Os biomarcadores foram: interferon (IFN) - γ (PeproTech, NJ, EUA), interleucina (IL) -6 e IL-10 (Invitrogen da Thermo Fisher Scientific, Viena, Áustria), seguindo as instruções do fabricante. A concentração dessas citocinas foi calculada por meio de curvas padrão apropriadas, que mostraram a faixa de coeficientes de correlação de 0,95 a 0,99, além dos coeficientes de variância intraensaio entre 3-5% e coeficientes de variância interensaio entre 8-10%. Além disso, o limite inferior de detecção para cada citocina foi calculado comparando-se com o valor de referência fornecido pelo fabricante do kit acima de 2,5 desvios-padrão desses valores. Após realizada a determinação de cada citocina, seus valores de concentração foram normalizados pela concentração de proteína total determinada pelo método de Bradford¹⁸.

Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo foram inicialmente testados contra a hipótese de normalidade pelo procedimento de teste de Shapiro-Wilk. A variável idade é apresentada por meio de valores de média e desvio padrão. As diferenças entre as concentrações de citocinas encontradas nos grupos de pacientes foram analisadas pelo teste t de Student e o coeficiente de correlação produto-momento de Pearson foi aplicado às medidas de teste da relação estatística entre eles. O número absoluto e a proporção de gênero, bem como os sintomas clínicos, foram analisados pelo teste Exato de Fisher, com correção post-hoc de Bonferroni. A significância estatística adotada foi ao nível de 5,0% ($p \leq 0,05$), com análises estatísticas realizadas pelo software GraphPad Prism 8.1.2.

RESULTADOS

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, tanto a média de idade quanto a proporção de mulheres e homens em cada grupo foram comparáveis.

Níveis semelhantes de IFN- γ (Figura 1A), IL-6 (Figura 1B) e IL-10 (Figura 1C) foram encontrados em ambos os grupos.

Conforme mostrado na Figura 2, não foram encontradas diferenças significativas na proporção das três citocinas avaliadas neste estudo (Figura 2A - IFN-g / IL-6, Figura 2B - IFN-g / IL-10 e Figura 2C - IL-10 / IL-6) em ambos os grupos.

Com o objetivo de melhorar o entendimento de como essas citocinas podem impactar a ocorrência de anosmia e ageusia em pacientes com COVID-19, realizamos a análise de correlação pelo método do coeficiente de correlação de Pearson. Conforme mostrado na Figura 3, enquanto o grupo controle de pacientes sem anosmia e / ou ageusia (grupo NA / A) apresentou correlações positivas significativas entre IL-6 e IFN- γ (Figura 3A), IL-10 e IFN- γ

(Figura 3C), e também entre IL-10 e IL-6 (Figura 3E), o grupo de pacientes com anosmia e / ou ageusia (grupo A / A) apresentou correlação negativa significativa entre os níveis de IL-10 e IFN- γ (Figura 3B). Não foram encontradas correlações significativas entre os níveis de IL-10 e IFN- γ (Figura 3D) e entre IL-10 e IL-6 (Figura 3F) no grupo A / A.

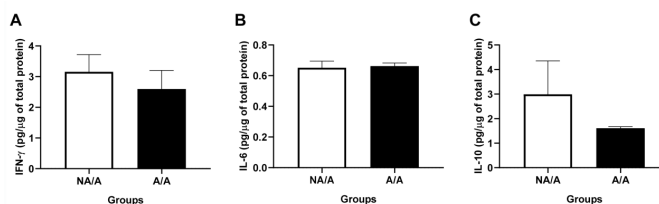


Figura 1. Comparação dos níveis de IFN- γ (A), interleucina (IL) -6 (B) e IL-10 (C) entre pacientes COVID-19 com anosmia e / ou ageusia (A / A) e o grupo controle (NA / A). Os valores são apresentados em média e desvio padrão. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

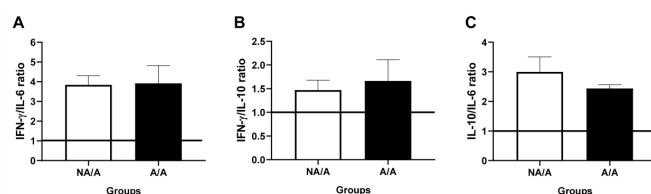


Figura 2. Comparação da razão de IFN- γ / IL-6 (A), IFN- γ / IL-10 (B) e IL-10 / IL-6 (C) entre pacientes COVID-19 com anosmia e / ou ageusia (A / A) e o grupo controle (NA / A). Os valores são apresentados em média e desvio padrão (DP). O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

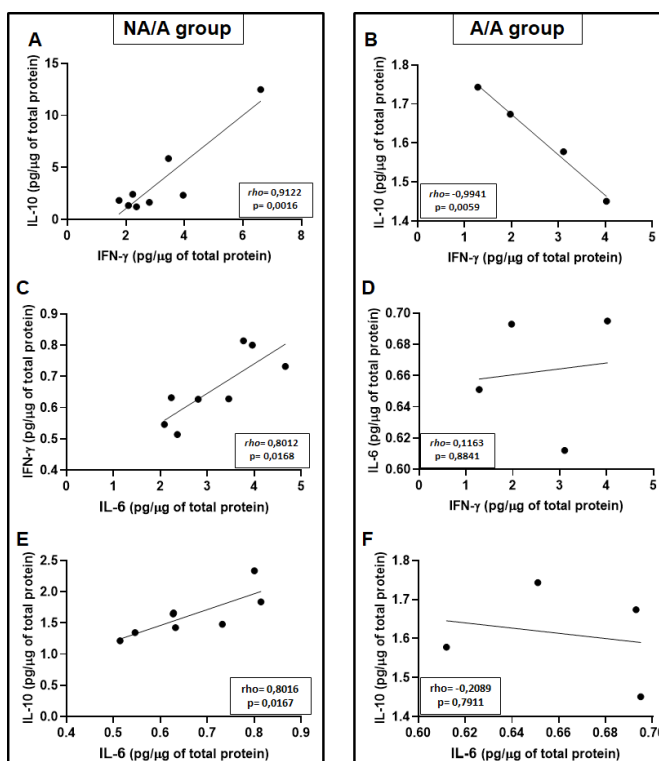


Figura 3. Coeficiente de correlação de Pearson (rho) entre os níveis de IFN- γ e IL-10 (A e B), IFN- γ e IL-6 (C e D), e também entre IL-10 e IL-6 (E e F) no grupo de pacientes com COVID-19 com anosmia e / ou ageusia (A / A) e no grupo controle (NA / A). O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Neste estudo, pudemos demonstrar que os pacientes com COVID-19 que apresentaram anosmia e ageusia apresentaram

alteração significativa no padrão de citocinas da mucosa das vias aéreas superiores, principalmente no que se refere à correlação entre IFN- γ e IL-10. Nesse sentido, esses pacientes apresentaram correlação negativa significativa, em oposição à correlação positiva encontrada nos pacientes com anosmia não-presente e ageusia da COVID-19.

Com base em relatos clínicos, uma alta proporção de pacientes com infecção por SARS-CoV-2 apresentou disfunções olfatórias e gustativas, de forma semelhante ao que foi relatado anteriormente entre pacientes com outras infecções por coronavírus^{5, 19, 20}. Também foi destacado que a ocorrência de anosmia e ageusia em pacientes com COVID-19 não está relacionada a sintomas nasais ou de rinite⁵. Esses achados sugerem que o SARS-CoV-2 pode induzir dano direto aos neurônios sensoriais olfatórios e gustativos^{5, 20}. Além disso, a observação de que a recuperação da anosmia relacionada ao COVID, de maneira geral, ocorre ao longo de semanas pode sugerir um padrão específico de infecção por SARS-CoV-2, uma vez que a recuperação da anosmia pós-viral típica ocorre ao longo dos meses²⁰. Ressalta-se que a frequência de perda olfatória em pacientes com COVID-19 é maior do que em pacientes com influenza^{21, 22}.

Embora o mecanismo desencadeado pelo SARS-CoV-2 para induzir distúrbios nos neurônios sensoriais olfatórios e gustativos não seja totalmente compreendido, um estudo recente desenvolvido por Brann e colegas²⁰ mostrou resultados que podem “lançar luz” no desenvolvimento de estudos futuros. Eles foram capazes de demonstrar que diferentes tipos de células não neuronais, como células de suporte, células-tronco e células perivasculares, tanto no epitélio olfatório quanto no bulbo olfatório, expressam o conhecido receptor usado pelo SARS-CoV-2 para entrar nas células, o receptor ACE2. Assim, esses autores sugerem que o SARS-CoV-2 pode infectar esses tipos de células não neuronais na área olfatória e esse fato pode estar intimamente relacionado à indução de anosmia em pacientes com COVID-19²⁰.

Associado a este cenário, admite-se que várias infecções virais (incluindo coronavírus) são capazes de desencadear uma resposta inflamatória local, que pode estar envolvida na alteração transitória da percepção olfatória²⁰. Particularmente em termos de infecção por SARS-CoV, Netland et al²³ demonstraram que camundongos infectados por esse tipo de vírus apresentavam morte neuronal proeminente. Curiosamente, esses autores não observaram nenhum infiltrado inflamatório neuronal e postularam que a morte neuronal por infecção por SARS-CoV foi devido a uma tempestade local de citocinas, especialmente por IL-6²³.

Embora tenha sido relatada a ocorrência de uma “tempestade de citocinas” sistêmica significativa em pacientes com COVID-19 com sintomas graves, é muito importante ressaltar que, com base na literatura, a avaliação sistêmica de citocinas não reflete necessariamente a concentração de citocinas observada no sistema nervoso central (SNC)²⁴⁻²⁶ ou na mucosa das vias aéreas superiores^{27, 28}.

Apesar do papel da anosmia e ageusia indutoras de inflamação em pacientes com COVID-19 ainda estar em debate, os dados apresentados acima podem apoiar a hipótese de que a infecção primária de tipos de células neuronais e / ou diferentes não neuronais por um coronavírus (SARS-CoV e SARS-CoV-2) pode desencadear uma resposta inflamatória local e, tanto os níveis de citocinas quanto seu padrão, podem afetar supostamente a função dos neurônios sensoriais olfatórios e gustativos^{20, 21, 23}.

A melhor prova para tal proposição é que as infecções respiratórias podem eliciar diferentes respostas imunes com o objetivo de gerar uma imunidade protetora¹³.

Em relação ao papel das citocinas na mucosa das vias aéreas superiores, nosso grupo relatou que a maior expressão local de IL-6, uma citocina pró-inflamatória, estava associada à

ocorrência de diferentes sintomas nas vias aéreas superiores²⁸. Além disso, também relatamos que a presença de IL-10, uma citocina antiinflamatória clássica, na mucosa das vias aéreas superiores foi capaz de modular a liberação de IL-6 e, dessa forma, inibir a manifestação de sintomas nas vias aéreas superiores^{28,29}. Mesmo assim, os níveis de IL-6 e IL-10 não foram diferentes entre os grupos com e sem anosmia e / ou ageusia, os resultados da relação IL-10 / IL-6 mostraram que todos os pacientes em ambos os grupos foram capazes de liberar mais IL-10 do que a IL-6, que poderia ajudar a modular a resposta inflamatória da mucosa, a fim de evitar uma resposta pró-inflamatória desequilibrada entre essas citocinas em pacientes com COVID-19 leve. Corroborando essa observação de que uma resposta inflamatória controlada estava presente na mucosa das vias aéreas superiores, os pacientes do grupo sem anosmia e / ou ageusia apresentaram correlação positiva entre os níveis de IL-10 e IL-6. No entanto, no grupo com essas disfunções olfatórias não foi observada correlação, e essa resposta imune local desregulada pode ter impactado no desenvolvimento de anosmia e ageusia.

Além dessas citocinas, também avaliamos os níveis de interferon tipo II (IFN- γ) na mucosa das vias aéreas superiores, uma vez que foi relatado que os níveis desta citocina aumentaram após infecções causadas por outro coronavírus zoonótico, MERS-CoV e SARS-CoV³⁰. É bem conhecido que o interferon é uma citocina clássica associada ao perfil de resposta imune

Th1 e também que está intimamente envolvida na resposta imune contra infecções virais devido à sua forte capacidade de interferir na replicação do vírus, incluindo coronavírus³⁰⁻³².

Em relação aos níveis de IFN- γ , de forma semelhante ao observado para IL-6 e IL-10, não foram encontradas diferenças nos seus níveis, bem como na relação entre os níveis de IFN- γ e IL-6 ou IL-10. No entanto, é importante ressaltar que os dados relacionados à razão entre as citocinas mostraram que os níveis de IFN- γ foram maiores do que as outras duas citocinas, indicando que a infecção por SARS-CoV-2 desencadeou uma resposta imune Th1 na mucosa de vias aéreas superiores, o que pode ser útil para minimizar a gravidade da COVID-19 nesses pacientes. Além disso, é importante destacar que a análise de correlação entre IFN- γ e IL-6 ou IL-10 apresentou resultados muito interessantes nos dois grupos, principalmente no que se refere aos níveis de IL-10 e IFN- γ . Nesse sentido, foi observada correlação negativa significativa entre os níveis de IFN- γ e IL-10 no grupo de pacientes com disfunção olfatória. Em conjunto, esses achados nos permitem sugerir que a ocorrência de anosmia e ageusia pode ser influenciada por um padrão desregulado de modulação inflamatória.

Apesar de uma limitação deste estudo ser o pequeno número de pacientes com disfunção olfatória incluídos na análise e, conseqüentemente, a conclusão estatística pode gerar alguma incerteza, nossos resultados podem lançar luz sobre a possibilidade da ocorrência desses desfechos no COVID-19 pacientes. Este estudo piloto não é prejudicado pelos resultados estatísticos nem pelo erro do tipo II adotado para tal, subestimando a conclusão sobre o perfil de citocinas³³. De acordo com isso, embora possa haver incertezas, as correlações significativas verificadas entre os níveis de IFN- γ e IL-10 no grupo de pacientes podem supostamente mitigar essa desvantagem.

Além disso, é fundamental esclarecer que, de acordo com a literatura, níveis sistêmicos mais elevados de IL-6 e IFN- γ estão relacionados ao desenvolvimento do estado hiperinflamatório denominado “tempestade de citocinas”, que pode ser encontrado principalmente em pacientes com quadros graves COVID-19, assim como em crianças com a síndrome inflamatória multissistêmica (MIS-C)^{34, 35} recentemente descrita. No entanto, estudos que objetivaram avaliar não apenas os níveis dessas citocinas pró-inflamatórias na mucosa das vias aéreas superiores, mas também suas conseqüências em paci-

entes com COVID-19 são muito escassas na literatura. Portanto, os resultados apresentados neste estudo podem aprimorar o conhecimento sobre o COVID-19, principalmente ao apontar alguns aspectos relevantes da resposta imune da mucosa das vias aéreas superiores induzida pela infecção pelo SARS-CoV-2. Além disso, também pode levar outros pesquisadores a desenvolver estudos enfocando as respostas imunes da mucosa em pacientes com COVID-19 que apresentam anosmia e ageusia.

Em conclusão, pudemos mostrar que pacientes com COVID-19 leve apresentando anosmia e ageusia apresentam resposta imune da mucosa das vias aéreas superiores alterada em comparação ao grupo controle de pacientes com COVID-19 sem disfunção olfatória. Novos estudos, incluindo um número maior de pacientes de diferentes faixas etárias, devem ser realizados para reproduzir nossos achados preliminares, a fim de avaliar se esse cenário desregulado está associado à ocorrência de anosmia e ageusia em pacientes com COVID-19.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a todos os voluntários do estudo e Agradecemos a Luciano Matsumiya Thomazelli do LVCM-USP pelo suporte técnico no diagnóstico.

REFERÊNCIAS

1. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic 2020 [Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>].
2. WORLDMETERS. COVID-19 CORONAVIRUS PANDEMIC 2020 [Available from: <https://www.worldmeters.info/coronavirus/>].
3. Moein ST, Hashemian SM, Mansourafshar B, Khorram-Tousi A, Tabarsi P, Doty RL. Smell dysfunction: a biomarker for COVID-19. *International Forum of Allergy & Rhinology*. 2020;10(8):944-50.
4. Heidari F, Karimi E, Firouzifar M, Khamushian P, Ansari R, Mohammadi Ardehali M, et al. Anosmia as a prominent symptom of COVID-19 infection. *Rhinology*. 2020;58(3):302-3.
5. Vaira LA, Salzano G, Deiana G, De Riu G. Anosmia and Ageusia: Common Findings in COVID-19 Patients. *Laryngoscope*. 2020;130(7):1787.
6. Yan CH, Faraji F, Prajapati DP, Ostrander BT, DeConde AS. Self-reported olfactory loss associates with outpatient clinical course in COVID-19. *International Forum of Allergy & Rhinology*. 2020;10(7):821-31.
7. Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, De Siaty DR, Horoi M, Le Bon SD, Rodriguez A, 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. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020;277(8):2251-61.
8. Russell B, Moss C, Rigg A, Hopkins C, Papa S, Van Hemelrijck M. Anosmia and ageusia are emerging as symptoms in patients with COVID-19: What does the current evidence say? *Ecancermedicalscience*. 2020;14:ed98.
9. Liu J, Li S, Liu J, Liang B, Wang X, Wang H, et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine*. 2020;55:102763.
10. Renegar KB, Small PA, Jr., Boykins LG, Wright PF. Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;173(3):1978-86.
11. Béné MC, de Carvalho Bittencourt M, Eveillard M, Le Bris Y. Good IgA Bad IgG in SARS-CoV-2 Infection? *Clinical Infectious Diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2020;71(15):897-8.
12. Moore JB, June CH. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*. 2020;368(6490):473-4.
13. Noda K, Kodama S, Umemoto S, Nomi N, Hirano T, Suzuki M. Th17 cells contribute to nontypeable Haemophilus influenzae-specific protective immunity induced by nasal vaccination with P6 outer membrane protein and α -galactosylceramide. *Microbiology and immunology*. 2011;55(8):574-81.
14. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2020;25(3).
15. Kodani M, Yang G, Conklin LM, Travis TC, Whitney CG, Anderson LJ, et al. Application of TaqMan low-density arrays for simultaneous detection of multiple respiratory pathogens. *J Clin Microbiol*. 2011;49(6):2175-82.
16. Heim A, Ebneth C, Harste G, Pring-Akerblom P. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *Journal of medical virology*. 2003;70(2):228-39.
17. Dare RK, Fry AM, Chittaganpitch M, Sawanpanyalert P, Olsen SJ, Erdman DD. Human coronavirus infections in rural Thailand: a comprehensive study using real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assays. *The Journal of infectious diseases*. 2007;196(9):1321-8.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1):248-54.
19. Meng X, Deng Y, Dai Z, Meng Z. COVID-19 and anosmia: A review based on up-to-date knowledge. *American Journal of Otolaryngology*. 2020;41(5):102581.
20. Brann DH, Tsukahara T, Weinreb C, Lipovsek M, Van den Berge K, Gong B, et al. Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia. *Science Advances*. 2020;6(31):eabc5801.
21. Kanjanaumporn J, Aeumjaturapat S, Snidvongs K, Seresirikachorn K, Chusakul S. Smell and taste dysfunction in patients with SARS-CoV-2 infection: A review of epidemiology, pathogenesis, prognosis, and treatment options. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*. 2020;38(2):69-77.
22. Beltrán-Corbellini Á, Chico-García JL, Martínez-Poles J, Rodríguez-Jorge F, Natera-Villalba E, Gómez-Corral J, et al. Acute-onset smell and taste disorders in the context of COVID-19: a pilot multicentre polymerase chain reaction based case-control study. *Eur J Neurol*. 2020;10.1111/ene.14273.
23. Netland J, Meyerholz DK, Moore S, Cassell M, Perlman S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2. *Journal of virology*. 2008;82(15):7264-75.
24. Pervaiz N, Hoffman-Goetz L. Immune cell inflammatory cytokine responses differ between central and systemic compartments in response to acute exercise in mice. *Exerc Immunol Rev*. 2012;18:142-57.
25. Chakraborty S, Kaushik DK, Gupta M, Basu A. Inflammasome signaling at the heart of central nervous system pathology. *Journal of neuroscience research*. 2010;88(8):1615-31.
26. Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(4):1164-71.
27. Vaisberg M, Paixão V, Almeida EB, Santos JMB, Foster R, Rossi M, et al. Daily Intake of Fermented Milk Containing Lactobacillus casei Shirota (Lcs) Modulates Systemic and Upper Airways Immune/Inflammatory Responses in Marathon Runners. *Nutrients*. 2019;11(7).
28. Vaisberg M, Suguri VM, Gregorio LC, Lopes JD, Bachi AL.

- Cytokine kinetics in nasal mucosa and sera: new insights in understanding upper-airway disease of marathon runners. *Exerc Immunol Rev.* 2013;19:49-59.
29. Santos J, Foster R, Jonckheere AC, Rossi M, Luna Junior LA, Katekaru CM, et al. Outdoor Endurance Training with Air Pollutant Exposure Versus Sedentary Lifestyle: A Comparison of Airway Immune Responses. *International journal of environmental research and public health.* 2019;16(22).
 30. Brzoska J, von Eick H, Hündgen M. Interferons in the Therapy of Severe Coronavirus Infections: A Critical Analysis and Recollection of a Forgotten Therapeutic Regimen with Interferon Beta. *Drug research.* 2020;70(7):291-7.
 31. Kindler E, Thiel V, Weber F. Interaction of SARS and MERS Coronaviruses with the Antiviral Interferon Response. *Advances in virus research.* 2016;96:219-43.
 32. Yao Z, Zheng Z, Wu K, Junhua Z. Immune environment modulation in pneumonia patients caused by coronavirus: SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2. *Aging.* 2020;12(9):7639-51.
 33. Richardson BA, Overbaugh J. Basic statistical considerations in virological experiments. *Journal of virology.* 2005;79(2):669-76.
 34. Zhao Y, Qin L, Zhang P, Li K, Liang L, Sun J, et al. Longitudinal COVID-19 profiling associates IL-1RA and IL-10 with disease severity and RANTES with mild disease. *JCI insight.* 2020;5(13).
 35. Dufort EM, Koumans EH, Chow EJ, Rosenthal EM, Muse A, Rowlands J, et al. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children in New York State. *N Engl J Med.* 2020;383(4):347-58.